

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação Em Parasitologia

Jeferson Kelvin Alves de Oliveira Silva

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOPATOLÓGICAS
INDUZIDAS PELA COINFECÇÃO DE *Leishmania amazonensis* E *Schistosoma
mansoni* EM CAMUNDONGOS BALB/c**

Belo Horizonte

2020

Jeferson Kelvin Alves de Oliveira Silva

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOPATOLÓGICAS
INDUZIDAS PELA COINFECÇÃO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E
SCHISTOSOMA MANSONI EM CAMUNDONGOS BALB/C**

Versão Final

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

Coorientadora: Michelle Carvalho de Rezende

Belo Horizonte

2020

043 Silva, Jeferson Kelvin Alves de Oliveira.
Caracterização das alterações clínicas e imunopatológicas induzida pela
coinfecção de *Leishmania amazonensis* e *Schistosoma mansoni* em camundongos
BALB/c [manuscrito] / Jeferson Kelvin Alves de Oliveira Silva. –
2020.
134 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Déborah Aparecida Negrão-Corrêa. Coorientação: Michelle Carvalho
de Rezende.

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

1. Parasitologia. 2. Coinfecção. 3. Esquistossomose. 4. Leishmaniose. 5. Morbidade. 6.
Resposta Imune. I. Negrão-Corrêa, Déborah Aparecida. II.
Rezende, Michelle Carvalho de. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**
Jeferson Kelvin Alves de Oliveira Silva417/2020/15
entrada
1º/2018
2018683335

Às quatorze horas do dia 30 de novembro do ano de 2020, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://conferenciaweb.rnp.br/events/dissertacao-de-mestrado-jeferson-kelvin-alves-de-oliveira-silva>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "Caracterização das alterações clínicas e imunopatológicas induzidas pela coinfeção de *Leishmania amazonensis* e *Schistosoma mansoni* em camundongos BALB/c" área de concentração: **Imunoparasitologia**. Abrindo a sessão, o(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 arguição 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
Dr. Ricardo Toshio Fujiwara	UFMG	Aprovado
Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor	UFMG	Aprovado
Dra. Michelle Carvalho de Rezende	UFMG	Aprovado

Expedição do resultado final.

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

Exigências	
Recomendações	As recomendações foram apresentadas e discutidas com o candidato durante a defesa e deverão ser consideradas na produção da versão final da dissertação
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(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 30 de novembro de 2020.

Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa
(Orientadora)

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

Dra. Michelle Carvalho de Rezende
(Coorientadora)

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

Prófa. Hêlida Monteiro de Andrade
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
ICB-UFMG - Port:7104-04/10/2021
SIAPE nº 2167747

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS

- **Laboratório de Esquistossomose e Imunologia de Helmintos**
 - Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa
- **Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos**
 - Daniella Castanheira Bartholomeu
 - Lílian Lacerda Bueno
 - Ricardo Toshio Fujiwara
- **Laboratório de Biologia de Leishmania**
 - Maria Norma Melo
- **Mecanismo Geral das Infecções Fúngicas**
 - Ary Corrêa Junior
- **Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias**
 - David Soeiro Barbosa

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)

DEDICATÓRIA

A doença é a zona noturna da vida, uma cidadania mais onerosa. Todos que nascem tem dupla cidadania, no reino dos sãos e no reino dos doentes. Apesar de todos preferirmos só usar o passaporte bom, mais cedo ou mais tarde nos vemos obrigados, pelo menos por um período, a nos identificarmos como cidadãos desse outro lugar.

– Susan Sontag

*A todos aqueles que não possuem voz para
gritar que não existem doenças negligenciadas,
mas sim vidas!*

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha orientadora Dra Deborah Negrão-Corrêa, por todos os momentos que, mesmo de forma inconsciente, foi uma profissional inspiradora; por toda dedicação a mim investida e por confiar este trabalho em minhas mãos. Obrigada por me receber em seu laboratório junto de um parasito que tivemos de aprender, juntos, a manipulá-lo.

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia, que foram importantíssimos na construção deste trabalho e também no meu aperfeiçoamento profissional. Obrigado pelas festinhas e ajuda naqueles “experimentos sem fim”; sem você este trabalho não seria possível.

Aos técnicos José Carlos, Zenir (*in memoriam*), Beth e Soraia que estavam sempre dispostos a oferecer estrutura necessária para a realização dos experimentos.

À minha turma de mestrado, *Degringolados*, por todo companheirismo e momentos de descontração.

Ao Ary Corrêa, e ao pessoal do Laboratório de Imunologia e gênomia de parasitos pela disponibilidade em ceder a estrutura de seus laboratórios para realização deste trabalho

Ao Diogo pela disposição e por tolerar a minha insistência em criar um mapa para dar mais força ao meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, e ao Departamento de de Parasitologia da UFMG, seus professores e funcionários.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa.

Agradeço por fim aos meus pais por me apoiarem em todas as minhas escolhas mesmo sem compreenderem a real importância de tudo isso. Obrigado mãe, obrigado pai. Não foi em vão. Amo vocês!

Começar é sempre a parte mais difícil. É como gaguejar.
Você só tem medo no início. É onde o medo está.
Então você só ga-ga-gagueja no início de uma palavra.
Quando está co-co-co-começando. Ninguém jamais gagueja no final.
Não existe gagueira-ra-ra. Porque já é tarde para ter medo.
Aí restam apenas os arrependimentos.

– *Autor desconhecido*

RESUMO

Aproximadamente um bilhão de pessoas são afetadas pelas Doenças Tropicais Negligenciadas. Dentre as mais de vinte listadas pela OMS, pelo menos doze são causadas por parasitos, incluindo as Leishmanioses e as Esquistossomoses. No Brasil, estas parasitoses juntas foram responsáveis por cerca de 133.100 DALYs (Disability Adjusted Life Years) /100.000 habitantes em 2016. Com base nos dados e mapas de distribuição de casos positivos para Leishmaniose tegumentar e Esquistossomose no Brasil, é perceptível a existência de zonas de coendemicidade. Apesar de vários estudos demonstrarem as alterações provocadas por cada parasito de forma isolada, o efeito da coinfeção de *Schistosoma* e *Leishmania* ainda precisa ser melhor esclarecido, tanto na população, quanto em modelos experimentais. Deste modo, este trabalho se propôs a avaliar as alterações clínicas, imunopatológicas e de carga parasitária associadas à infecção experimental por *Schistosoma mansoni* em camundongos BALB/c previamente infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Para tanto, camundongos BALB/c fêmeas foram aleatoriamente separados em três grupos experimentais: um mono-infectados por *L. amazonensis* (1×10^4 promastigotas metacíclicas), outro por *S. mansoni* (50 cercárias), e o último foi infectado por *L. amazonensis* e após três semanas coinfectado por *S. mansoni*. Os animais foram acompanhados por 15 semanas, sendo avaliados peso corporal, evolução das lesões cutâneas e mortalidade. A partir da quinta semana, foram coletadas fezes de camundongos mono- e coinfectados com *S. mansoni* para estabelecer o período pre-patente da esquistossomose e após 8 (fase aguda) e 12 (fase crônica) semanas da infecção por *S. mansoni*, animais de todos os grupos experimentais foram anestesiados e eutanasiados para avaliação de carga parasitária, alterações patológicas e na resposta imune. Os dados revelam que, mesmo após o estabelecimento da Leishmaniose, a infecção por *S. mansoni* reduziu a inflamação no sítio da infecção e modulou a resposta imune inflamatória nos tecidos pulmonares e hepáticos. Por outro lado, a infecção prévia por *L. amazonensis* foi capaz de alterar a susceptibilidade de camundongos a infecção por *S. mansoni* ao reduzir o número de esquistossômulos pulmonares e vermes adultos durante a fase aguda da infecção. Apesar da redução no número de vermes, os animais coinfectados apresentaram mais ovos retidos no fígado durante a fase crônica. Os animais coinfectados não apresentaram mudanças na taxa de mortalidade e lesão hepática, mas foi constatado que a infecção prévia por *L. amazonensis* garantiu um efeito protetor contra à anemia e perda de peso ponderal decorrente da Esquistossomose, na fase aguda infecção. No pulmão dos animais coinfectados foi visto que a infecção pelo protozoário reduziu os níveis de CCL5 e CCL24 na fase aguda e aumentou CXCL2, TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-17 na fase crônica da esquistossomose. Enquanto que no fígado os animais coinfectados apresentaram níveis de IL-22 superiores aos dos monoinfectados por *S. mansoni* com aumento na atividade de eosinófilos, isso resultou em uma diminuição do granuloma perioucular destes animais, atenuando o efeito da Esquistossomose. Os resultados mostram que a coinfeção por *S. mansoni* e *L. amazonensis* reduz a morbidade de ambas as parasitoses, demonstrando a importância de se estudar os modelos de coinfeção, não só para entender os processos imunopatológicos gerais, mas usar destes para inferir em estratégias para a melhoria do manejo destas importantes parasitoses.

Palavras chave: Coinfeção; Esquistossomose; Leishmaniose; Morbidade; Resposta Imune.

ABSTRACT

Approximately, one billion people are affected by Neglected Tropical Diseases. More than twenty of these diseases are listed by the WHO, and at least twelve among them are caused by parasites, including Leishmaniasis and Schistosomiasis. In Brazil, both of them accounted for approximately 133,100 DALYs (Disability Adjusted Life Years) / 100,000 inhabitants in 2016. Based on data and maps of cutaneous Leishmaniasis and Schistosomiasis geographic distribution in Brazil, the existence of mutual transmission areas is clearly noticed. Although several studies have shown the consequences of the infection caused by each parasite, the effect of *Schistosoma* and *Leishmania* coinfection is mostly unknown, both in experimental models and in human population. Thus, this study aimed to evaluate the clinical, immunopathological and parasitic burden changes associated with experimental infection by *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice previously infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Therefore, female BALB/c mice were randomly separated into three experimental groups: one monoinfected by *L. amazonensis* (1×10^4 metacyclic promastigotes), another by *S. mansoni* (50 cercariae), and the last one was infected by *L. amazonensis* and, after three weeks, coinfecting by *S. mansoni*. The animals were evaluated for 15 weeks regarding body weight, evolution of skin lesions and mortality rate were assessed each week. From the fifth week onwards, stool samples were collected from *S. mansoni* mono and coinfecting mice to establish the pre-patent period of schistosomiasis, and after 8 (acute phase) and 12 (chronic phase) weeks of *S. mansoni* infection, animals from all experimental groups were anesthetized and euthanized to assess parasite burden, pathological changes and immune response. Even after the establishment of Leishmaniasis, *S. mansoni* infection was able to reduce the inflammation at the infection site and modulate the inflammatory response in the lung and liver tissues. On the other hand, the previous infection by *L. amazonensis* altered the mice susceptibility to infection by *S. mansoni* by reducing the number of lung-stage schistosomula and adult worms during the acute phase of the infection. Despite the reduction in the number of worms, the coinfecting animals showed more eggs retained in liver during the chronic phase. The coinfecting mice showed no significant changes in the mortality rate or liver damage, but it was found that the previous infection by *L. amazonensis* exerted a protective effect against anemia and weight loss due to acute schistosomiasis. In the lungs of coinfecting animals, it was noticed that the protozoan infection reduced the levels of TNF- α , IL-4, IL-5 and IL-17, but increased the chemokines CCL5, CCL24 and CXCL2, resulting in an increased infiltration of eosinophils and neutrophils. In the liver, the coinfecting animals had higher IL-22 levels than those monoinfected by *S. mansoni*, with increased eosinophil activity. This resulted in a decrease in the periportal granuloma volume in this group, attenuating the granuloma-associated pathological effects of Schistosomiasis. Therefore, the data showed that coinfection with *S. mansoni* and *L. amazonensis* reduced the morbidity associated to both parasites, emphasizing the importance of studying coinfection models, not only to understand general immunopathological processes involved, but also to use them to infer strategies focused on improving the management of these important parasites.

Keywords: Coinfection; Immune response; Leishmaniasis; Morbidity; Schistosomiasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Status da Leishmaniose Tegumentar no Mundo em 2016.....	23
Figura 2 – Casos de Leishmaniose tegumentar segundo município de infecção do Brasil, 2017.....	24
Figura 3 – Ciclo evolutivo dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	27
Figura 4 – Balanço de resposta imune contra <i>Leishmanias</i> spp. e formas clínicas associada.....	32
Figura 5 – Distribuição Global das Esquistossomoses.....	33
Figura 6 - Distribuição de casos positivos de esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos.....	34
Figura 7 – Ciclo de vida do gênero <i>Schistosoma</i> sp.	37
Figura 8: Resposta imune frente à evolução da infecção de <i>S. mansoni</i>	40
Figura 9: Mapa taxa de incidência de Esquistossomose e LTA no Brasil por microrregião 2013-2017.....	47
Figura 10 – Delineamento para acompanhamento da imunopatologia em camundongos monoinfectados por <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> e coinfectados.....	55
Figura 11 – Organograma experimental.....	56
Figura 12 – Evolução do edema plantar e frequência de lesões ulcerativas de Leishmaniose Tegumentar em camundongos monoinfectados por <i>L. amazonensis</i> e coinfectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	70
Figura 13 – Acompanhamento ponderal e taxa de mortalidade de camundongos monoinfectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>S. mansoni</i> , e coinfectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	71
Figura 14 – Perfil hemantimétrico de camundongos monoinfectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>S. mansoni</i> , e coinfectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i> durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose.....	73
Figura 15 – Peso relativo do fígado e concentração plasmática de transaminases em camundongos monoinfectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>S. mansoni</i> , e coinfectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i> durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose.....	74
Figura 16. Carga parasitária de <i>Leishmania amazonensis</i> em camundongos monoinfectados por <i>L. amazonensis</i> e coinfectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	75

Figura 17. Avaliação da carga parasitária de <i>S. mansoni</i> em camundongos mono infectados pelo trematódeo e coinfectados com <i>L. amazonensis</i>	78
Figura 18. Retenção total de ovos e fecundidade das fêmeas do trematódeo em camundongos monoinfectados por <i>S. mansoni</i> e coinfectados por <i>L. amazonensis</i> durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose.	81
Figura 19. Porcentagem de esquistossômulos recuperados do pulmão de camundongos monoinfectados por <i>S. mansoni</i> e coinfectados com <i>L. amazonensis</i>	82
Figura 20. Concentração de citocinas Th-1 e Th-2 no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.	84
Figura 21. Concentração de citocinas de perfil regulatório no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.....	86
Figura 22. Concentração de citocinas Th-1 e Th-17 no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.....	87
Figura 23. Concentração de citocinas Th2 no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> , infectados com <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.....	89
Figura 24. Concentração de citocinas de perfil regulatório no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , com <i>S. mansoni</i> ou os coinfectados.....	90
Figura 25. Concentração de quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.	91
Figura 26 – Determinação indireta de infiltração celular nos tecidos pulmonares de animais monoinfectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.	93
Figura 27. Concentração de quimiocinas no homogenato hepático de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.	94
Figura 28. Concentração de quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.....	95
Figura 29. Concentração de citocinas no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.	96
Figura 30. Concentração de quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.	97

Figura 31 – Determinação indireta de infiltração celular nos tecidos hepático de animais monoinfectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>S. mansoni</i> ou coinfectados.	98
Figura 32 – Cortes histológicos do tecido hepático ilustrativos da lesão esquistossomótica.....	100
Figura 33. Análise morfométrica e de deposição de colágeno no tecido hepático.	101
Figura 34 - Resumo das alterações relativas à Leishmaniose encontradas no modelo de coinfeção de <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	102
Figura 35 – resumo das alterações relativas à Esquistossomose encontradas no modelo de coinfeção de <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	106
Figura 36 – Resumo das alterações relativas à Esquistossomose crônica encontradas no modelo de coinfeção de <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais formas clínicas do espectro tegumentar e espécies de <i>Leishmania</i> causadoras.....	29
Tabela 2 – Principais manifestações clínicas no decorrer da infecção humana por <i>S. mansoni</i>	39
Tabela 3. Acompanhamento do período pré-patente, comparação da frequência de positividade e número de ovos eliminados nas fezes de animais monoinfectados com <i>S. mansoni</i> e coinfectados por <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	74
Tabela 4. Comparação do número de ovos encontrados no cérebro, pulmões, baço e intestinos de animais monoinfectados com <i>S. mansoni</i> e coinfectados por <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i> durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose.....	77

LISTAS DE ABREVIACÕES

ALT – Alanina aminotransferase
ANOVA – Análise de Variância
AST – Aspartato aminotransferase
BSA – Albumina de Soro Bovino
CEBIO – Centro de Bioterismo
DALY'S – *Disability adjusted life years* (anos ajustados por incapacidade)
DTH – *Delay Type Hypersensitivity*
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA – Ensaio imunoenzimático
EPO- Peroxidase de eosinófilo
FBS – *Fetal Bovine Serum*
HSP – *Heat Shock Protein*
HPS – *Haptomonad Parasite Sphere*
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IL – Interleucinas
INF- γ – Interferon gama
iNOS- *induced Nitric Oxide Synthase*
LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
LDPK – Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar
LE – Luís Evangelista
LLA – Grupo experimental apenas infectado por *L. amazonensis*
LLA+SM – Grupo experimental coinfectados
LM – Leishmaniose Mucosa
LT- Leishmaniose Tegumentar
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LV- Leishmaniose Visceral
MP – Membrana Peritrófica
MPO- Mieloperoxidase
NAG- N-acetilglicosaminidase
NTD – *Neglected Tropical Disease*

OMS – Organização Mundial da Saúde
OPD – O-fenilenodiamina
OPG – Gramas por ovos
PAHO – *Pan American Health Organization*
PBS – Salina tamponada “*phosphate buffered saline*”
PCE – Programa de Controle da Esquistossomose
PSG – *Promastigote Secreted Gel*
ROS – *Reactive Oxygens Species*
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*
SEA – Antígeno solúvel de ovo *Schistosoma mansoni*
SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SLA – *Soluble Leishmania Antigen*
SM – Grupo experimental apenas infectado com *S. mansoni*
STAT – Sinal transdutor e ativador de transcrição
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta
Th 1 – Resposta imune do tipo 1
Th17 – Resposta imune do tipo 17
Th2 – Resposta imune do tipo 2
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
Treg – Células TCD4+ designadas reguladoras
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
VP – Vacúolo Parasitóforo
WHO- *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. Leishmaniose Tegumentar Americana	22
2.1.1. O parasito e sua ocorrência.....	22
2.1.2. Biologia de <i>Leishmania</i> sp.	25
2.1.3. Aspectos clínicos e imunopatogênicos	28
2.2. Esquistossomose mansoni	32
2.2.1. O parasito e a sua ocorrência.....	32
2.2.2. Biologia do <i>Schistosoma mansoni</i>	35
2.2.3. Aspectos clínicos e imunopatogênicos	37
2.3. Comorbidades vs <i>S. mansoni</i>	44
3. JUSTIFICATIVA.....	49
4. OBJETIVOS	51
4.1. Objetivo geral.....	51
4.2. Objetivos específicos.....	51
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
5.1. Animais experimentais e Triagem pré-clínica	52
5.2. Parasitos e a infecção experimental	52
5.2.1. Obtenção de antígenos	53
5.3. Delineamento experimental	54
5.3.1. Evolução da morbidade	57
5.3.2. Avaliação da carga parasitária	58
5.3.2.1. Estimativa de <i>L. amazonensis</i> por diluição limitante.....	58
5.3.2.2. Quantificação dos ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes.....	58
5.3.2.3. Recuperação dos vermes adultos pelo sistema porta hepático	59
5.3.2.5. Cálculo da taxa de fecundidade	60
5.3.2.6. Recuperação e quantificação de esquistossômulos pulmonares	60
5.3.3. Avaliação do perfil imunohematológico.....	61
5.3.3.1. Quantificação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de baço	61
5.3.3.2. Quantificação de citocinas e quimiocinas no tecido hepático e pulmonar	62

5.3.3.3. Dosagem de mieloperoxidase (MPO)	63
5.3.3.4. Dosagem de peroxidase de eosinófilo (EPO)	63
5.3.3.5. Dosagem de N-acetilglicosamidade (NAG)	64
5.3.4. Análise Patológica	65
5.3.4.1. Hemograma	65
5.3.4.2. Determinação plasmática de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT).....	65
5.3.4.3. Hidroxiprolina.....	66
5.3.4.4. Percentual de peso hepático	67
5.3.4.5. Análise Histopatológica	67
5.3.5. Análise Estatística	68
6. RESULTADOS.....	69
6.1. Aspectos clínicos e evolução da morbidade da Leishmaniose Tegumentar e Esquistossomose nos animais coinfetados.....	69
6.2. Carga parasitária.....	75
6.3. Avaliação da resposta imune sistêmica e local e das alterações histopatológicas hepática associadas à coinfecção de <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	82
6.3.1. Resposta imune sistêmica	82
6.3.2. Resposta imune pulmonar à infecção por <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	86
6.3.3. Resposta imune e análise histológica hepática à infecção por <i>L. amazonensis</i> e <i>S. mansoni</i>	93
7. DISCUSSÃO	102
8. CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS.....	117
ANEXO – DECISÃO FINAL	135

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (*NTD – Neglected Tropical Diseases*), termo inicialmente utilizado pela fundação Rockefeller e atualmente adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), incluem um grupo diverso de infecções transmissíveis prevalentes em condições tropicais e subtropicais. Estas infecções estão presentes em 149 países e afetam aproximadamente um bilhão de pessoas (BOISSON, *et. al.*, 2016; OLIVEIRA, 2018).

Entre as mais de vinte doenças tropicais negligenciadas listadas pela OMS, pelo menos doze são causadas por parasitos, incluindo as Leishmanioses e as Esquistossomoses. No Brasil em 2016, estas duas parasitoses foram responsáveis por cerca de 133.100 *DALYs* (*Disability Adjusted Life Years*) /100.000 habitantes, do total de 475.410 *DALYs* causados pelas doenças negligenciadas no mesmo ano (MARTINS-MELO *et al.*, 2018).

As Leishmanioses são doenças crônicas causadas pela infecção por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* spp. A classificação desta enfermidade é baseada nas formas clínicas observadas nos indivíduos infectados. Estas, são segregadas em dois grandes espectros clínicos, Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT), de acordo com o tropismo do parasito para determinados órgãos (BURZA, 2018). Estudos realizados entre os anos de 2012 e 2016, baseados no número de casos confirmados de Leishmanioses somados à estimativa de casos assintomáticos e a taxa de subnotificação, estimam uma incidência anual prospectiva que varia de 200.000 a 400.000 para LV e de 700.000 a 1 milhão de casos de LT com uma estimativa de 20.000 a 40.000 óbitos por ano (ALVAR *et al.*, 2012; BURZA, 2018). Em 2017, 20.792 (94%) dos 22.145 novos casos de Leishmanioses confirmados e notificados à OMS, ocorreram em sete países: Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, além do Brasil que sozinho notificou 18.185 casos positivos neste mesmo ano (BRASIL, 2018; WHO, 2018).

A Leishmaniose Tegumentar (LT), é amplamente difundida, principalmente nas Américas, e possui como agente patogênico mais de 20 espécies de *Leishmania* (BURZA, 2018). Este protozoário é transmitido por fêmeas de flebotomíneos infectadas que realizam o repasto sanguíneo em indivíduos susceptíveis e regurgitam, junto com saliva, as formas infectantes do parasito para este hospedeiro. Parte destes parasitos são destruídos, enquanto outros se estabelecem em células da derme e servem de fonte de infecção para outros vetores, perpetuando assim o ciclo (De MENEZES *et al.*, 2016; SERAFIM *et al.*, 2018).

No Brasil, a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a que causa maior impacto na saúde da população, devido a sua ampla área de transmissão e da morbidade dos casos (REITHINGER, 2007; OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012; BRASIL, 2017). No entanto a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tem sido eventualmente associada com manifestações clínicas graves das formas tegumentar difusa, mucocutânea e visceral (BARRAL *et. al*, 1991; ALEIXO *et. al*, 2005; MCGWIRE, 2014; BURZA, 2018).

Estudos em modelos experimentais e em humanos indicam que a evolução clínica da Leishmaniose depende da combinação de fatores associados a espécie do parasito e as características dos hospedeiros, incluindo a espécie do vetor, estado nutricional e resposta imunológica do hospedeiro vertebrado (ASHFORD, 2000; REIS E GONTIJO, 2016; SCOTT E NOVAIS, 2016; BURZA, 2018; LOCKARD, 2019). A deposição das formas promastigotas no tegumento do hospedeiro vertebrado induz o recrutamento de neutrófilos e, posteriormente, macrófagos para o sitio de infecção, estimulando a produção de citocinas de perfil Th-1 e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estes elementos da resposta imune têm sido associados com o controle do crescimento do parasito. Ademais, respostas Th-1 muito intensas, provocam lesões teciduais associadas a morbidade da Leishmaniose Tegumentar (REITHINGER, 2007; NYLÉN & EIDSMO, 2012; DINIZ, 2014; NOVAIS *et. al.*, 2014; TORRES-GUERREIRO *et al.*, 2017; BURZA, 2018).

Por outro lado, a Esquistossomose é considerada a infecção helmíntica de maior importância no contexto de morbimortalidade no mundo (van der WERF, 2003). Estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas estejam infectadas por esta parasitose, que em 2016 foi responsável por 24.068 óbitos no mundo, sendo 21.151 destes casos relatados na África Subsaariana (WHO, 2018). A transmissão desta parasitose ocorre quando indivíduos susceptíveis entram em contato com cursos hídricos contaminados com cercárias, formas larvais do parasito. Estas cercárias penetram na derme, se transformam em esquistossômulos que migram pela circulação e se instalam no sistema circulatório mesentérico, concluindo a maturação dos vermes adultos, acasalamento e produção de ovos, parte dos quais podem ser eliminados nas fezes. Dos ovos que alcançam uma coleção hídrica eclodem miracídios, que podem infectar caramujos susceptíveis do gênero *Biomphalaria*, onde se reproduzem assexuadamente, até a formação e liberação de novas cercárias para o meio aquático (GRYSSELS, 2012; MCMANNUS, *et. al*, 2018).

Entre as seis espécies do gênero *Schistosoma* capazes de infectar seres humanos, somente *Schistosoma mansoni* é responsável pelos casos de esquistossomose humana no

Brasil, sendo estimado que 1,5 a 2 milhões de pessoas estão infectadas no país e outras 25 milhões vivem em áreas com risco de contrair a infecção. No ano de 2016, foram notificados 12.009 novos casos de esquistossomose no país e uma taxa de mortalidade de 0,23 a cada 100.000 habitantes associada a doença (GRYSEELS, 2012; BRASIL, 2018).

A infecção por *S. mansoni* causa alterações imunopatológicas no hospedeiro que estão associadas a fase de desenvolvimento do parasito. No início da interação com o hospedeiro vertebrado, denominada de fase aguda pré-postural, que engloba a migração e maturação do parasito, a resposta imune é predominantemente Th-1, com produção aumentada de TNF- α e INF- γ . Entre a 6^a e a 9^a semana após a infecção, o perfil da resposta imune é alterado para uma resposta predominantemente Th-2, estimulada por antígenos excreto-secretados pelos ovos do parasito, retidos nos tecidos do hospedeiro. A partir da 12^a semana pós infecção tem início a fase crônica da Esquistossomose, que é caracterizada pelo aumento de produção de interleucina 10 (IL-10) e outros mecanismos imunorregulatórios, responsáveis pelo controle da intensidade da resposta Th-1 e Th-2 e pelo controle da patologia, na maioria dos indivíduos infectados (DUNNE & COOKE, 2005; HAMS *et al.*, 2013; COLLEY *et al.*, 2014).

Condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de várias espécies de parasitos e seus vetores, associadas às condições socioeconômicas, de saúde e instrução precárias presentes em vastas regiões da África subsaariana, Ásia e Américas favorecem a exposição e transmissão de várias espécies de parasitos, sendo frequentemente reportado casos de poliparasitismo na população destes locais (HOTEZ, *et al.*, 2008; SUPALI, *et al.*, 2010). A avaliação de mapas de distribuição geográfica de casos de Leishmaniose tegumentar e Esquistossomose, permitem identificar a ocorrência de sobreposição das áreas de transmissão destas parasitoses, especialmente no Brasil (YOSHIDA, 1999; BISANZIO, 2014; MARTINS-MELO, 2016; BRASIL, 2017). Entretanto, apesar de vários estudos demonstram as possíveis alterações provocadas por cada parasito de forma isolada, poucos estudos avaliam o efeito da coinfeção de *Schistosoma* sp. e *Leishmania* sp. na susceptibilidade e morbimortalidade do hospedeiro.

Os escassos estudos realizados em hospedeiros coinfectados por espécies dos gêneros *Schistosoma* e *Leishmania*, tanto em humanos como em modelo experimental murino, indicam que a lesão provocada pelo protozoário pode ser menor nos coinfectados; porém, o tempo necessário para cura parasitológica foi significativamente maior que nos hospedeiros monoinfectados pelo protozoário (LA FLAMME *et al.*, 2002; HASSAN, 2006; O'NEAL *et*

al., 2007; AZEREDO-COUTINHO, 2016). Além disso, trabalhos *in vitro* de células isoladas do sangue periférico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar, estimuladas com antígenos de *S. mansoni*, resultaram na indução de citocinas regulatórias. Interessantemente, quando estas células foram reestimuladas com antígenos de *Leishmania* houve uma redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (BAFICA *et al.*, 2011; BAFICA *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2019).

Apesar dos poucos trabalhos publicados indicarem que a coinfeção do hospedeiro com espécies dos generos *Schistosoma* e *Leishmania* altere o perfil da resposta imune, afetando alguns sinais clínicos da Leishmaniose e a resposta ao tratamento específico, possíveis efeitos desta coinfeção na susceptibilidade e morbidade associada à Esquistossomose não tem sido devidamente avaliada. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, realizado em residentes de Januária-MG, indicaram que entre os indivíduos humanos infectados por *S. mansoni*, aqueles com relato prévio de Leishmaniose Tegumentar, apresentaram redução da resposta pró-inflamatória sistêmica e alteração da susceptibilidade ao trematódeo (MIRANDA, 2018), sugerindo que a coinfeção também afete a evolução da esquistossomose. Isto posto, o presente estudo pretende melhor avaliar o efeito da coinfeção entre *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni*, na carga parasitária, resposta imune e morbidade da esquistossomose em camundongos BALB/c.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

2.1.1. O parasito e sua ocorrência

No século XIX, a presença intracelular de “corpos peculiares” que faziam alusão a uma infecção fúngica foi o primeiro relato, feito por Cunningham em 1885, que contribuiu para a identificação e classificação dos parasitos do gênero *Leishmania*. No entanto, estudos posteriores (WRIGHT, 1903) indicaram que estas estruturas se assemelhavam mais a protozoários, sendo que a classificação correta do gênero do parasito foi proposta por Ross, em 1903, quando este pesquisador observou que os parasitos se assemelhavam bastante aqueles do gênero *Trypanosoma* (ROSS, 1903).

A classificação taxonômica das espécies deste gênero está estruturalmente inserida na família Trypanosomatidae, Doflein 1901, e, atualmente os parasitos do gênero *Leishmania* spp. que acometem os seres humanos estão segregados em dois subgêneros: *Leishmania*, Ross 1903, e *Viannia* Lainson & Shawn 1987 (AKHOUNDI *et al*, 2016). A divisão de subgêneros foi proposta com base na localização das formas promastigotas do parasito no interior do inseto vetor (Lainson *et al*, 1972): espécies de *Leishmania* spp. que se desenvolvem na região anterior do intestino do flebotomíneo foram agrupadas no subgênero *Leishmania*, enquanto que as espécies que se desenvolvem na região posterior do intestino do flebotomíneo foram agrupadas ao subgênero *Viannia* (Lainson, *et al*, 1977).

Dentre as 31 espécies sabidamente capazes de infectar mamíferos, 20 espécies podem parasitar naturalmente seres humanos (REITHINGER, 2007; AKHOUNDI *et al*, 2016). Ademais, esta parasitose pode apresentar-se com um caráter antroponótico ou zoonótico, dependendo das características epidemiológicas de cada região (WHO, 2016). Neste cenário, observa-se que a maior parte da carga da doença humana é relatada em países pobres, não obstante a isso, esta parasitose também é endêmica em vários países do sul da Europa (PACE, 2014). Os casos humanos de Leishmaniose estão presentes em 98 países, onde estima-se de que haja 350 milhões de pessoas vivendo sob condições propícias a contraírem a Leishmaniose, além de 12 milhões já possuírem alguma alteração clínica relacionada a uma infecção pregressa pelo parasito (ALVAR *et al*, 2012; WHO, 2016). Estimativas da OMS (WHO, 2016) indicam que anualmente haja uma incidência aproximada de dois

milhões de novos casos; deste montante, cerca de 500 mil são referentes a Leishmaniose Visceral, enquanto os outros 1,5 milhões são derivados da forma tegumentar. A figura 1 ilustra o número de novos casos de Leishmaniose Tegumentar reportados por países no ano de 2016.

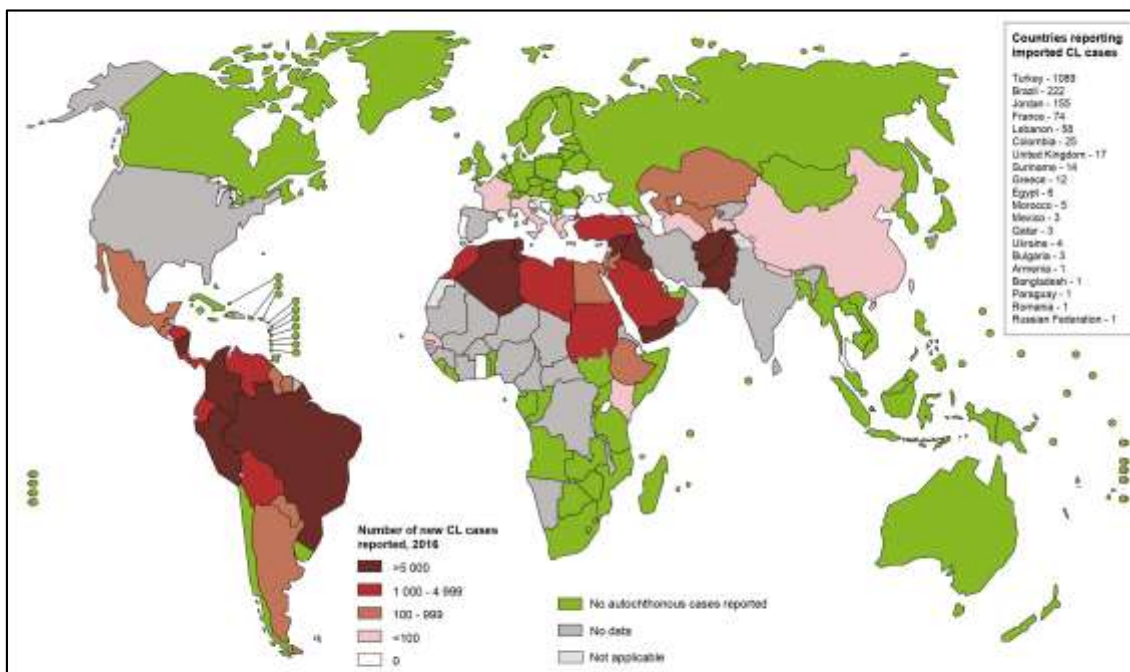


Figura 1 – Status da Leishmaniose Tegumentar no Mundo em 2016. Fonte: WHO, 2016 (https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwid0e_2016_with_imported_cases.pdf?ua=1)

O termo Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é amplamente utilizado pela comunidade científica e órgãos de saúde governamentais para designar os casos autóctones de Leishmaniose Tegumentar notificados pelos países deste continente. As LTA estão presentes em 18, das 20 federações que formam o continente Americano, e, no ano de 2017, um total de 49.959 novos casos de Leishmaniose Tegumentar foram reportados a Organização Pan-Americana de Saúde. Apesar de haver uma redução no número de casos reportados por nove países do continente Americano no ano de 2017, os números de casos nesta região mantiveram-se estáveis em relação ao ano de 2016, devido ao aumento no número de casos reportados em alguns países, como é o caso do Brasil que apresentou um aumento de 38% em relação ao ano anterior (PAHO, 2019).

A distribuição geográfica da Leishmaniose está fortemente ligada a precariedade das condições socioeconômicos encontrada em algumas das regiões tropicais e neotropicais.

Historicamente no Brasil, a Leishmaniose foi considerada uma zoonose transmitida às populações que mantinham alguma atividade rural, e ocasionalmente, eram acometidas por possuírem uma relação próxima com a manutenção do ciclo silvestre (CARDOSO *et. al*, 2019). Em contrapartida, nos dias atuais, a transmissão da Leishmaniose não se restringe somente ao meio rural, devido a regiões de desmatamento e avanço da cidade sobre as matas (SOARES *et. al*, 2013; TELES *et. al*, 2019). O avanço da urbanização associado ao aumento da densidade populacional, formam ambientes semiurbanos que favorecem o surgimento de habitats adequados para a manutenção de alguns reservatórios e vetores, que, por conseguinte, criam zonas convenientes à transmissão da Leishmaniose por potencializarem um maior contato da vida urbana com a silvestre. Assim, o evento da urbanização é um forte fator modificante dos padrões epidemiológicos clássicos da dispersão da Leishmaniose (ASHFORD, 2000; KEVRIC *et. al*, 2015; AKHOUNDI *et al*, 2016; OKWOR & UZONNA, 2016; da COSTA, *et al*, 2018; SALAH *et. al*, 2020).

Em 2016, as Leishmanioses foram responsáveis por 40.967,4 *DALYs* por 100.000 habitante no Brasil, isso corresponde à 8,8% da carga global de morbidade provocada pelas doenças negligenciadas do país. No ano 2017, cinco estados de quatro regiões brasileiras foram responsáveis por notificarem mais de 60% dos novos casos de LT: Pará (18,43%), Bahia (15,17%), Mato Grosso (12,10%), Amazonas (10,26%) e Minas Gerais (7,26%), como observado na FIGURA 2 (BRASIL – Sinan/SVS/MS, 2019).

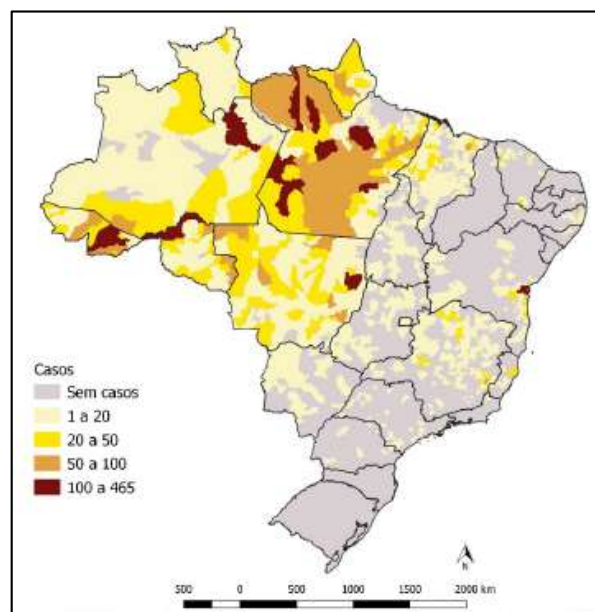


Figura 2 – Casos de Leishmaniose tegumentar segundo município de infecção do Brasil, 2017. Fonte: Sinan/SVS/MS (portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/Leish-2017-novo-layout.pdf)

2.1.2. Biologia de *Leishmania* sp.

Os parasitos do gênero *Leishmania* spp. apresentam um ciclo biológico do tipo heteroxênico, ou seja, necessitam de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado para completarem o ciclo (STECK, 1974). As principais espécies de invertebrados vetores da Leishmaniose são dípteras pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Alguns destes flebotomíneos estão descritos taxonomicamente dentro dos gêneros *Lutzomyia*, que são os principais hospedeiros em regiões do Novo Mundo incluindo a América Latina, e *Phlebotomus*, hospedeiros nas áreas de transmissão do Velho Mundo: Mar Mediterrâneo, Ásia e partes da África (LAINSON & SHAW, 1987; ASHFORD, 2000; AKHOUNDI *et al*, 2016). Enquanto isso, além dos seres humanos, já foram descritos como hospedeiros vertebrados deste parasito: os canídeos, felídeos e equídeos, que apresentam hábitos sinantrópicos (reservatórios não silvestres), além dos roedores, marsupiais, edentados e quirópteros. Pouco se sabe sobre os possíveis reservatórios silvestres da Leishmaniose, devido à escassez de estudos com animais neste ambiente (SHAW, 2003; BRASIL, 2017).

Existem, basicamente, dois estágios evolutivos deste parasito; a forma extracelular flagelada, localizada no tubo digestivo dos flebotomíneos fêmeas, denominada de promastigotas. E a forma intracelular, com flagelo internalizado, encontrada no vacúolo parasitóforo (VP) de células nucleadas de mamíferos [sic] (BATES, 1994b). Alterações de temperatura e pH são fatores determinantes para evolução deste parasito nos seus hospedeiros (BATES, 1994a).

No vertebrado, as promastigotas provenientes da picada de flebotomíneos infectados, aderem principalmente às células com atividade fagocítica bem desenvolvida residentes da derme, como células dendríticas e macrófagos, e neutrófilos recém recrutados por meio dos receptores do complemento, C1 e C2 e a internalização é feita principalmente pela via da fagocitose. O processo de internalização de *Leishmania* origina um compartimento formado pela própria membrana da célula hospedeira, que posteriormente se funde a lisossomos ou endossomos tardios, formando o vacúolo parasitóforo (VP). Este VP possui hidrolases e um pH ácido, nesta condição ocorre a transformação das promastigotas em amastigotas, que se replicam intensamente e disseminam a infecção pelo organismo (STECK, 1974; CHANG,

1983; ALEXANDER & RUSSEL, 1992; ANTOINE *et. al*, 1998; DAVID SIBLEY, 2011; De MENEZES *et. al*, 2016; DEY *et. al*, 2018; SERAFIM *et. al*, 2018).

Naturalmente, a transmissão vetorial deste parasito no ambiente ocorre exclusivamente pelos flebotomíneos. Este evento ocorre quando estes vetores se alimentam de um hospedeiro vertebrado infectado, e ingerem as formas intracelulares presentes nas células da derme deste indivíduo. Após a hematofagia, as amastigotas ingeridas transformam-se em promastigotas procíclicas na membrana peritrófica (MP) do intestino do vetor, e iniciam uma intensa replicação. Progressivamente estas células passam pelo estágio de nectomonas, rompem a MP e migram para o terço anterior do tubo digestório do vetor (HOARE & WALLACE, 1966; LAINSON & SHAW, 1987b; BATES, 1994b ASHFORD, 2000; ROGERS *et. al*, 2004; ROGERS & BATES, 2007).

Em todas as espécies de *Leishmania* spp., a fase final de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado, consiste na colonização por nectomonas da região anterior do intestino médio até a válvula do estomodeu. As promastigostas que sobreviveram ao processo de digestão, e não foram evacuadas, aderem seus flagelos as microvilosidades do intestino médio se multiplicam nos limites do intestino do inseto. Logo após, estas células entram no estágio haptomonado, onde formam uma estrutura esférica e maciça (*Haptomonad Parasite Sphere – HPS*) que oclui a válvula do estomodeu, onde novamente sofrem uma transformação para o estágio de leptomonas como visto na Figura 3 A e B (HOARE & WALLACE, 1966; LAINSON & SHAW, 1987b; PIMENTA *et. al*, 1992; ASHFORD, 2000; BATES & ROGERS, 2004, ROGERS & BATES, 2007; SERAFIM *et. al*, 2018).

As formas remanescentes do parasito, durante o amadurecimento no intestino do vetor, passam por um processo denominado de metaciclogênese e transformam-se em promastigostas metacíclicas. Ocorre então uma migração destas formas para a probóscide do vetor, e são elas, as responsáveis pelo estabelecimento da infecção (SACKS & PERKINS, 1984; BATES, 2007). Até então, acreditava-se que as promastigostas metacíclicas eram o ultimo estágio de diferenciação do parasito no vetor; no entanto, estudos recentes demonstram que, um flebotomíneo já infectado por *Leishmania* sp., após realizar um novo repasto sanguíneo, é capaz de reativar a metaciclogênese exacerbando ainda mais a carga parasitária do vetor (FIGURA 3C) (SERAFIM *et. al*, 2018).

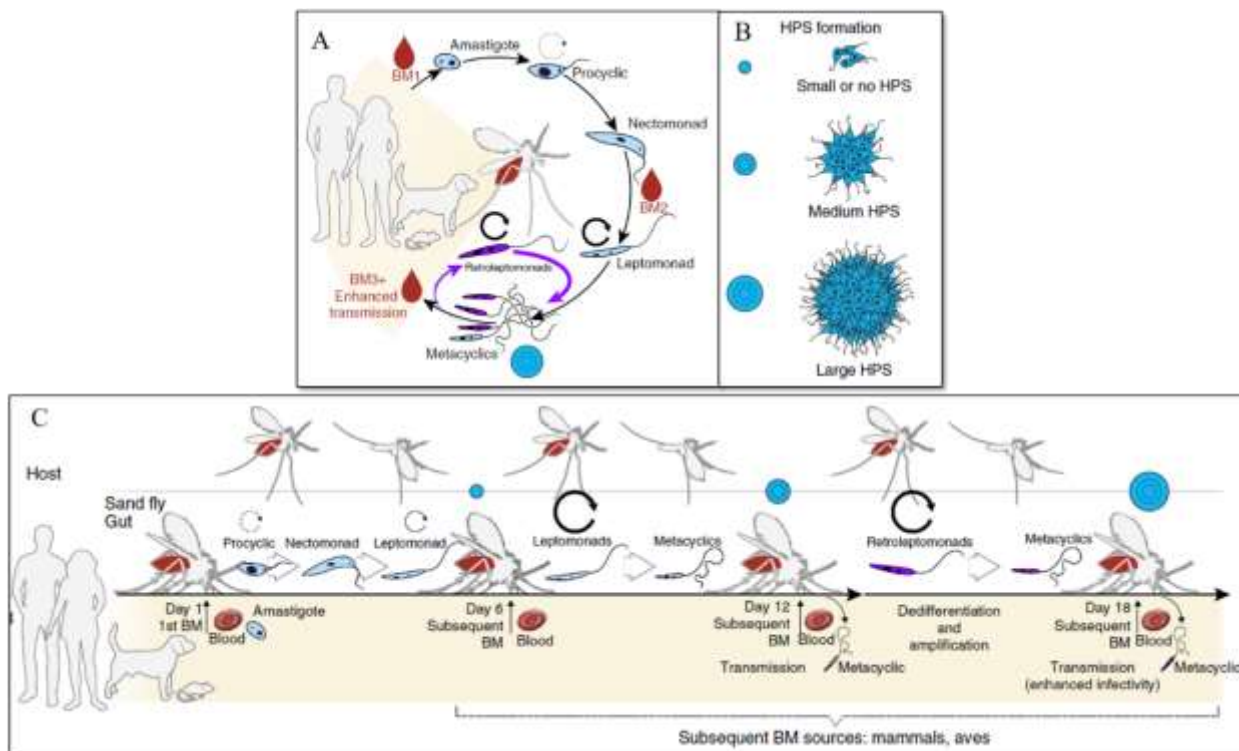


Figura 3 – Ciclo evolutivo dos parasitos do gênero *Leishmania* spp. Representação do ciclo evolutivo do parasito, onde as amastigotas presentes nas células da derme de um hospedeiro vertebrado infectado são ingeridas por um flebotomíneo em um primeiro repasto sanguíneo (BM1) e evoluem para promastigotas procíclicas, seguidas da forma nectomonar. Quando ocorre um segundo repasto sanguíneo (BM2), as formas nectomonares transformam-se em Leptomonas e evoluem para promastigostas metacíclicas. Ao fim de um terceiro repasto sanguíneo (BM3), as promastigostas metacíclicas retornam ao estágio leptomonar onde são chamadas de retroleptomonas, e exacerbam a carga infectiva do flebotomíneo pela intensa multiplicação. A exacerbação da carga parasitaria no inseto vetor é representada pelas esferas azuis, um modelo esquemático da dimensão da replicação do estágio leptomonar. Fonte: Modificado de SERAFIM *et. al*, 2018.

Além disso, estas promastigostas são bem eficazes em produzir um gel (*Promastigote Secretory Gel* – PSG) rico em filamentos proteofosfoglicanos (fPPG). Este gel tem por função obstruir as peças bucais do inseto. Durante a hematofagia, a congestão resultante deste processo faz com que o flebotomíneo regurgite tanto o PSG, quanto as promastigostas metacíclicas, ou seja, um processo de transmissão múltipla que também favorece o estabelecimento do parasito no hospedeiro vertebrado. Estes artificios produzidos pelos parasitos são capazes de aumentar as chances de transmissão e exacerbar a carga infecciosa no inseto, além de promover a cronicidade da infecção e agravar o espectro clínico no hospedeiro vertebrado (ROGERS & BATES, 2007; WILLSON, 2010; ROGERS, 2012; SERAFIM *et. al*, 2018).

2.1.3. Aspectos clínicos e imunopatogênicos

Inicialmente, todos os casos de infecção por *Leishmania* spp. decorrentes de uma transmissão vetorial, assumem caráter clínico inespecífico no hospedeiro vertebrado; entretanto, o prognóstico e manifestações clínicas da síndrome evoluem de maneiras diferentes. Múltiplos fatores estão envolvidos neste processo, tanto ligados ao vetor e ao parasito, como também ao hospedeiro vertebrado. Dessa forma, a combinação variável destes fatores é que determinam as diversas manifestações clínicas da Leishmaniose (CARVALHO *et. al*, 2015; SCOTT & NOVAIS, 2016; TORRES-GUERREIRO, *et. al*, 2017; ANVERSA *et. al*, 2018, LOCKARD *et. al*, 2019).

Neste sentido, as Leishmanioses que causam morbidades cutânea são classificadas como: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), doença causada por um grande número de espécies de *Leishmania*, em sua maioria as de subgênero *Leishmania*, e caracterizada e por apresentar uma ou poucas lesões ulcerativa do tipo crateriforme contendo número moderado de parasitos; Leishmaniose Disseminada (LD) com formação de múltiplas úlceras maculopapulares que se estendem ao longo da derme e, geralmente, tem uma baixa carga parasitaria nas lesões devido a intensa respostas citotóxica no sitio da infecção; Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) que se manifesta através de múltiplas lesões nodulares não ulcerativas repletas de parasitos e com anormalidade na construção de uma resposta imune efetiva. A Leishmaniose Mucocutânea (LM) resulta de uma intensa inflamação local, geralmente envolvendo mucosas com evolução das lesões para um quadro desfigurante e a Leishmaniose Dérmica Pós Kala-azar (LDPK) é uma síndrome muito comum na Índia e países adjacentes, causada principalmente por *L. (L.) donovani*, que é caracterizada por lesões maculopapulares e hipopigmentadas, ou ainda evoluem para forma visceral da doença (TABELA 1) (BARRAL *et. al*, 1986; KEVRIC *et. al*, 2015, GOTO & LAULETTA LINDOSO, 2015; ANVERSA *et. al*, 2018).

Tabela 1 – Principais formas clínicas do espectro tegumentar e espécies de *Leishmania* causadoras. Fonte: Adaptado de Scorza, *et. al*, 2017. (*DTH – *Delay-type Hipersensitivity* ou Hipersensibilidade Tardia)

Forma Clínica	Espécie	Manifestação
Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)	<i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) donovani</i>	Lesão ulcerativa única ou com número limitado, podendo apresentar-se molhada ou seca com características crateriformes e bordas elevadas. Biópsias da borda da lesão revelam moderada carga parasitária; DTH*positiva contra antígenos de <i>Leishmania</i> .
Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (V.) pifanoi</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (L.) major</i>	Múltiplos nódulos de caráter não ulcerativo. Alta carga parasitária nas lesões e ausência de resposta de DTH*, estado de anergia.
Leishmaniose Disseminada (LD)	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	Numerosas lesões papulares de aspecto acneiforme, acometendo duas ou mais partes do corpo não contíguas, geralmente acometendo mucosas. Poucos parasitos na lesão e uma forte resposta de DTH*.
Leishmaniose Mucocutânea (LM)	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	Lesões mucosas de caráter altamente inflamatório, desfigurativo. Raros parasitos na lesão com forte resposta de DTH*.
Leishmaniose Dérmica Pós Kala-azar (LDPK)	<i>L. (L.) donovani</i>	Erupções cutâneas nodulares ou maculopapulares, com regiões hipopigmentadas. Alta resposta de INF- γ a antígenos de <i>Leishmania</i> . Presença de parasitos nas lesões.

Além da grande diversidade de espécies de *Leishmania* sp. responsáveis pelos quadros de LV e LC, outros fatores estão associados à virulência do parasito, sendo estes agrupados em duas categorias principais: fatores que melhoram o desempenho do parasito e sua tolerância ao estresse e fatores associados a invasão do parasito ou sua evasão dos mecanismos de defesa dos hospedeiros. Na primeira categoria encontram-se proteínas responsáveis por regular a sobrevivência e homeostase celular do parasito, tais como proteossomas e chaperonas. Entre elas, as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein*

– *HSP*), principalmente da família HSP70 e HSP100, estão descritas como importantes moléculas controladoras do metabolismo dos protozoários frente variação de temperatura e pH e ao estresse oxidativo desenvolvido pelas células do hospedeiro vertebrado (BIFELD & CLOS, 2015; REQUENA *et. al*, 2015; ATAYDE *et. al*, 2016; TORRES-GUERREIRO, *et. al*, 2017). Os fatores de virulência mais bem estudados em *Leishmania* spp. são lipofosfoglicanos e as leishmanolisina, que modulam o sistema imune para garantir o estabelecimento do parasito. Os lipofosfoglicanos são os glicoconjugados mais abundantemente encontrados na superfície das promastigotas de *Leishmania* sp.; estas moléculas estão intimamente ligadas a resistência destes parasitos à digestão enzimática no intestino do vetor, mas também são capazes de inibir a ativação de macrófagos pela proteína quinase C, impedindo também a acidificação do fagolisossomo. Por outro lado, as leishmanolisinas são metaloproteases que também estão presentes na superfície das promastigotas de *Leishmania* sp.; estas enzimas são capazes de clivar a proteína C3b do complemento, evitando a morte por lise, além de degradarem a matriz extracelular da derme e facilitar a movimentação das promastigotas (OLIVIER *et. al*, 2012; BIFELD & CLOS, 2015; ATAYDE *et. al*, 2016; TORRES-GUERREIRO, *et. al*, 2017).

Além dos fatores de virulência inerentes ao próprio parasito, existem ainda alguns componentes ligados aos hospedeiros invertebrados e vertebrados que também são determinantes para evolução da morbidade associada às Leishmanioses. A picada do flebotomíneo transmite, junto aos protozoários, o conteúdo das glândulas salivares dos vetores. A saliva induz uma resposta imune local mais regulatória impedindo que os macrófagos sejam ativados classicamente, isso altera a construção de uma reposta imune efetora capaz de controlar o parasito. Sob outra perspectiva, fatores ligados ao hospedeiro vertebrado, como idade, sexo e perfil de resposta imune também são fatores determinantes na evolução de manifestações clínicas distintas da Leishmaniose (ANDRADE *et. al*, 2007; CARVALHO *et. al*, 2015; SCOTT & NOVAIS, 2016; TORRES-GUERREIRO, *et. al*, 2017; ANVERSA *et. al*, 2018, LOCKARD *et. al*, 2019).

A associação entre o perfil da resposta imune do hospedeiro e a forma clínica da Leishmaniose está ilustrada na figura 4. Diferente do que é observado para *L. major*, a resposta imune associada a maioria das espécies de *Leishmania* spp. está além dos padrões claramente definidos de uma reposta celular T efetora do tipo 1 para controle do parasito (SCOTT & NOVAIS, 2016; TORRES-GUERREIRO, *et. al*, 2017). As variações partem desde respostas muito intensas com predomínio células T *helper* efetoras do tipo 1,

caracterizada por hipersensibilidade tardia (DTH - *Delay-type Hipersensitivity*) e com altos níveis de interferon- γ (INF- γ), até indivíduos que não têm resposta DTH com níveis elevados de anticorpos, respostas predominantemente do tipo 2, respostas mistas e até um estado anérgico de resposta (SCOTT & NOVAIS, 2016; SCORZA *et. al*, 2017). Esta variedade de resposta depende de como as células infectadas respondem a este parasito, dado que os macrófagos parasitados por *Leishmania* spp. estão sujeitos a regulação por citocinas presentes no sítio da infecção. O perfil de citocinas inflamatórias do tipo 1, INF- γ e TNF- α , são responsáveis por induzir sinergicamente a produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species - ROS*) pelos macrófagos, que são tóxicos ao parasito. Além disso, há uma maior atividade de células Th17, aumento na transcrição de proteínas quimiotáticas e de fatores associados à ativação macrofágica clássica como IL-1 e óxido nítrico sintase induzida (*Induzided Nitric Oxigen Species - iNOS*). Este padrão de resposta está envolvido com as manifestações clínicas da LCL, onde há uma baixa carga parasitária no sítio da infecção devido à alta resposta celular e menor resposta humoral (SCOTT & NOVAIS, 2016; SCORZA *et. al*, 2017). Por outro lado, microambiente da infecção onde há uma resposta de caráter mais regulatório, com níveis diminuídos de citocinas do tipo 1 e elevadas taxas de citocinas do tipo 2, IL-10 e TGF- β , observa-se um antagonismo aos efeitos de INF- γ e TNF α . Além disso, há uma considerável atividade de arginase, que degrada L-arginina em ureia e ornitina, resultando na ativação alternativa de macrófagos e produção de metabólitos que contribuem para a proliferação do protozoário. As manifestações clínicas da LCD apresenta receptores inibitórios de células T e seus contra ligantes que denotam na exaustão destas células, propiciando um estado de anergia, associado a altos títulos de anticorpos (FIGURA 4). Enquanto isso, existem as outras manifestações clínicas que demonstram resposta imune mista entre estes dois extremos, como visto na LDPK, LD e LCL. Já os casos de LM, apresentam um reposta imune predominantemente do tipo 1, com grande variação de intensidade na resposta celular e humoral, as lesões vistas nesta forma clínica variam de eventos autolimitados até cronificação da inflamação (SCOTT & NOVAIS, 2016; SCORZA *et. al*, 2017; TOMIOTTO-PELLISSIER *et. al*, 2018).

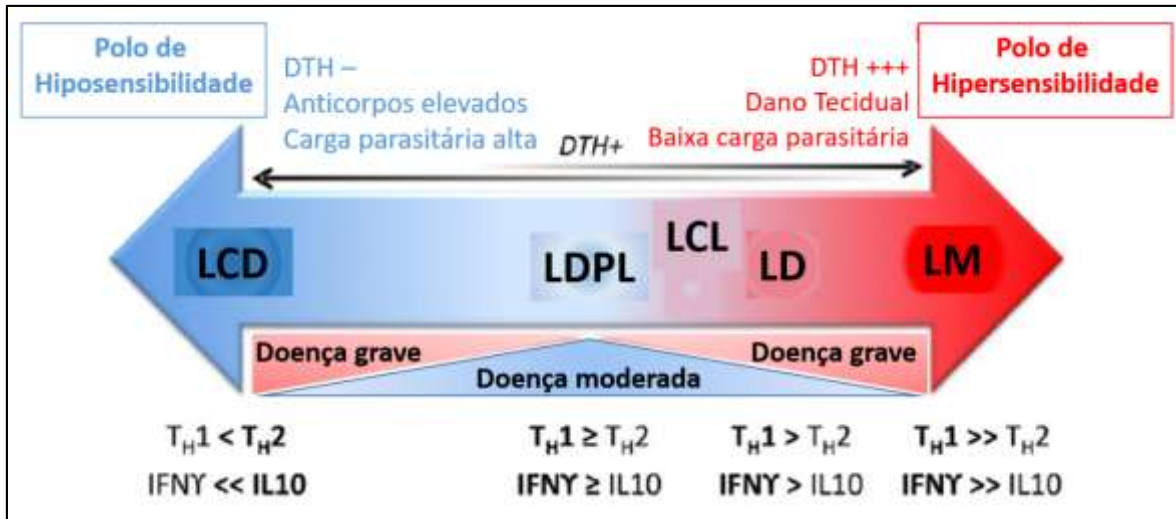


Figura 4 – Balanço de resposta imune contra *Leishmanias* spp. e formas clínicas associada. Fonte: Traduzido e Adaptado de Scorza, *et.al*, 2017.

2.2. Esquistossomose mansoni

2.2.1. O parasito e a sua ocorrência

A Esquistossomose é uma enfermidade causada por espécies de trematódeos do gênero *Schistosoma*. Os primeiros relatos desta parasitose ocorreram no Egito antigo, onde esta patologia foi associada com casos de hematúria, atribuindo ao Egito o título de “a terra onde os homens menstruavam”. As primeiras descrições do agente etiológico da esquistossomose foram feitas por Theodor Bilharz durante a necropsia de um jovem, onde foi encontrado na veia porta um trematódeo sanguícola (SIEBOLD, 1852). Theodor foi capaz de caracterizar morfológicamente os vermes adultos e ovos; entretanto, este pesquisador classificou estes parasitos como pertencente ao gênero *Distomum*, por acreditar que as duas ventosas deste parasito fossem cavidades orais (*Di* = dois / *stomum* = boca). Posteriormente, Weinland percebeu que apenas uma das ventosas possuía uma abertura oral, e então propôs sua inclusão no gênero *Schistosoma*, devido a característica do macho que apresenta o corpo com uma fenda (*Schisto* = fenda / *soma* = corpo) (SIEBOLD, 1852; WEINLAND, 1858).

Atualmente, a classificação taxonômica deste trematódeo o insere no filo Platelminthes (Gegenbauer 1859), classe Trematoda Rudolphi, 1808, família Schistosomatidae Stiles & Hassal, 1898, e gênero *Schistosoma* Weiland, 1858. Dentre as 20 espécies causadoras da esquistossomose em mamíferos, seis podem infectar humanos. A transmissão desta parasitose está associada a regiões com condições precárias de educação

em saúde e saneamento, distribuídas em 78 países da zona tropical do globo, sendo estimado que aproximadamente 240 milhões de pessoas estejam infectados por este parasito, com uma taxa de mortalidade anual próxima a 20.000 óbitos. Conforme ilustrado na Figura 5, a infecção pela espécie *S. mansoni*, está bem distribuída no continente Africano, Oriente Médio e América, onde Brasil, Venezuela e Suriname são as principais áreas endêmicas. A infecção por *S. japonicum* está mais restrita a regiões da China, Indonésia e Filipinas, enquanto a infecção por *S. intercalatum* e *S. haematobium* ocorre em áreas centrais do continente Africano e Oriente Médio. A infecção humana por *S. mekongi* e *S. malayensis* é bastante limitada, sendo o primeiro responsável por casos de Esquistossomose em alguns distritos de Cambodia e Laos que se situam a margem do rio Mekongi, enquanto casos de infecção por *S. malayensis* foram notificados somente na Malásia (DESPRES, *et. al*, 1992. GRYSEELS, 2006; GRYSEELS, 2012; COLLEY, 2014; WEERAKOON, 2015; WHO, 2018; CHUA *et. al*, 2018)

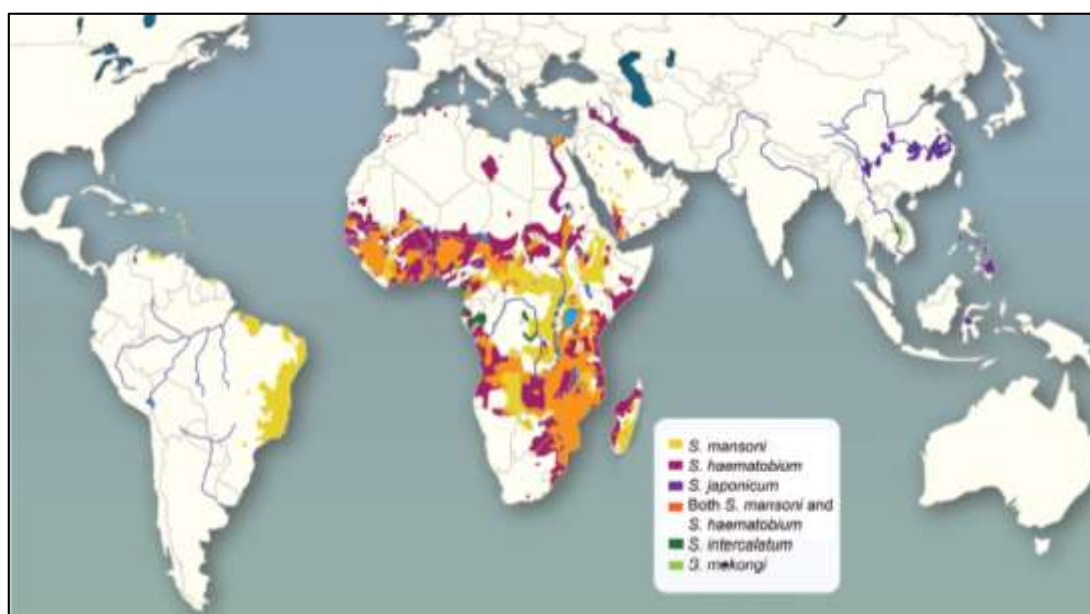


Figura 5 – Distribuição Global das Esquistossomoses. Fonte: WEERAKOON, *et. al*, 2015.

O termo Esquistossomose mansoni é utilizado para generalizar a condição de saúde de um indivíduo infectado com *S. mansoni*, independente da apresentação da forma clínica. No Brasil, estima-se que a Esquistossomose mansoni afete de 1,5 a 2 milhões de indivíduos, enquanto outros 25 milhões estejam em condições de risco de adquirir esta parasitose (GRYSEELS, 2006; BRASIL, 2018).

Atualmente, o teste referência preconizado pela OMS para diagnóstico da Esquistossomose é o Kato-Katz (Katz, Chaves & Pellegrino, 1972). Esta técnica é utilizada tanto na rotina clínica de diagnóstico ambulatorial, quanto para os inquéritos coproscópicos da Esquistossomose, sendo realizada a leitura de duas lâminas contendo aproximadamente 0,42g de fezes. Este método de diagnóstico proporciona uma ótima especificidade e sensibilidade quando aplicado em regiões endêmicas com indivíduos com alta carga parasitária; no entanto, quando aplicado na área endêmica com indivíduos de baixa carga ou ainda pós tratamento, o diagnóstico e controle de cura nem sempre são satisfatórios (OLIVEIRA *et. al*, 2018; SILVA-MORAES *et. al*,2019)

A caracterização epidemiológica da Esquistossomose mansoni no Brasil (FIGURA 6) apresenta um difícil desafio, pois, apesar de ser um agravo de notificação compulsória, tanto os dados e infográficos disponibilizados pelo ministério da Saúde, assim como pelo inquérito nacional da Esquistossomose, subestimam o real número de indivíduos infectados. Os dados fornecidos por estes trabalhos indicam somente o percentual de positividade de uma dada região ou de indivíduos de uma determinada faixa etária, nas regiões denominadas de área endêmica. Devido a não utilização da população total como denominador para a estimativa associada a escolha de um teste de diagnostico pouco sensível, este dado impossibilita uma visão sistemática real da prevalência da infecção, subestimando os números de indivíduos infectados (BRASIL, 2014; KATZ, 2018).

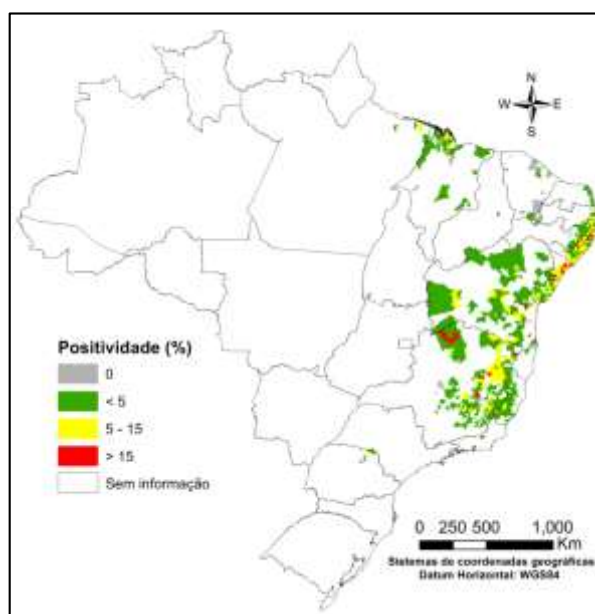


Figura 6 - Distribuição de casos positivos de esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos, Brasil, 2017.Fonte: SVS

Os dados referentes a Esquistossomose no Brasil são monitorados pelo PCE (Programa de Controle da Esquistossomose). Para o ano de 2017, o programa reportou 3836 casos confirmados; entretanto, o número de indivíduos infectados em cada estado da federação é extremamente variado. Neste mesmo ano, o estado de Minas Gerais liderou as estatísticas ao notificar 1839 novos casos, isso corresponde a 47,9% do total notificado no país neste ano, seguido do estado da Bahia (598 casos; 15,5% do total), São Paulo (384 casos; 10,1%), Espírito Santo (246 casos; 6,41%) e Pernambuco (191 casos; 4,97). Nas últimas décadas, a estratégia para o controle da Esquistossomose adotada no Brasil resultou em uma mudança substancial nas taxas de mortalidade e morbidade da população residente de área endêmica. O número de mortes por esta infecção diminuiu drasticamente, e atualmente apresenta uma taxa de mortalidade de 0,23 a cada 100.000; entretanto, a morbidade associada a Esquistossomose no Brasil (102.259,3 DALYs) equivale a cerca de 25 % da carga global de morbidade associada a doença tropicais negligenciadas no país (BRASIL, 2017; MARTINS-MELO *et. al*, 2018).

2.2.2. Biologia do *Schistosoma mansoni*

O desenvolvimento das espécies do gênero *Schistosoma* spp. é de caráter heteroxênico e apresenta um ciclo de vida complexo, sendo necessário para sua manutenção a presença do hospedeiro definitivo, hospedeiro intermediário (molusco susceptível) e de condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento. Dentre os fatores inerentes ao ambiente, a velocidade do curso hídrico, os níveis de minerais da água, além de alterações bruscas de temperaturas induzem estresse no molusco são determinantes no sucesso da infecção do parasito (COELHO & BEZERRA, 2006; BRASIL, 2014; KNIGHT *et. al*, 2015).

As espécies de moluscos que atuam como vetores de *S. mansoni* são taxonomicamente inseridas no gênero *Biomphalaria*. No Brasil, existem dez espécies neste gênero, no entanto, somente *B. stramineae*, *B. tenagophila* e *B. glabrata* participam da transmissão desta parasitose, por se encontrarem naturalmente infectadas por *S. mansoni*. Já os vertebrados que atuam como hospedeiros definitivos deste helminto são variáveis; além dos seres humanos, que apresentam maior importância epidemiológica, já foram relatadas infecções naturais em primatas não humanos, alguns bovídeos e em roedores silvestres de hábitos aquáticos, como *Holochilus sciureus* e *Nectomys squamipes*. Entretanto, a

importância epidemiológica destas espécies não humanas para manutenção da Esquistossomose é ainda discutível (CARVALHO, 1992; GENTILE *et. al.*, 2010; MIRANDA *et. al.*, 2017; CARMO-SILVA *et. al.*, 2019).

Para o desenvolvimento de *S. mansoni*, ilustrado na Figura 7, fezes do hospedeiro contaminadas com ovos viáveis, alcançam um curso hídrico habitado por moluscos do gênero *Biomphalaria* spp, susceptíveis a infecção. O ovo, em condições ótimas de iluminação, temperatura, pH e osmolaridade é quebrado, e dele eclode o mirácidio; a primeira forma larval ciliada do parasito, responsável pela infecção do hospedeiro intermediário, invadindo principalmente os tecidos moles da região cefalopodal do caramujo. Já intramolusco, este mirácidio perde as placas ciliares que revestem o tegumento e transformam-se em esporocisto mãe ou esporocisto primário (KATSUMATA, *et. al.*, 1989; BORGES, 2013; LEWIS & TUCKER, 2014; PILA *et. al.*, 2017; MCMANNUS, *et. al.*, 2018). Neste primeiro momento, o esporocisto mãe tem aparência de um saco, que funciona como uma câmara de reprodução assexuada de esporocistos filhos. Após aproximadamente 2-3 semanas de infecção, esta segunda geração de esporocisto rompe o esporocisto mãe e migra para região das gônadas e hepatopâncreas, estas regiões são ricas em nutrientes e subsidiam o desenvolvimento das novas gerações de esporocistos e da formação das cercárias. As cercárias migram pela hemolinfa para a região anterior do caramujo e, sob estímulo de luz e temperatura, emergem na água pela região cefalopodal e manto. Estas larvas não se alimentam, e utilizam de nutrientes endógenos para a produção de energia. As cercárias possuem uma cauda anexa, extremamente muscular, que serve de órgão propulsor natatório, além de auxiliar no processo de penetração da pele do hospedeiro definitivo (LEWIS & TUCKER, 2014; WENDT & COLLINS, 2016; PILA *et. al.*, 2017).

A infecção humana sobrevém quando há o contato do indivíduo com ambientes hídricos dulcícolas contaminados com cercárias do parasito. Uma vez em contato com a pele, pode ocorrer penetração ativa via percutânea, facilitada pela produção de enzimas proteolíticas danosas a tegumento. Na derme, estas cercárias transformam-se em esquistossômulos teciduais e perdem a cauda; na sequência os esquistossômulos alcançam a circulação sanguínea e são passivamente transportadas para o pulmão. No parênquima pulmonar estes esquistossômulos se desenvolvem e retomam ao sistema circulatório sanguíneo, e alojam-se nos vasos do plexo mesentéricos e hilo hepático, onde terminam o processo de maturação e formam os casais (ROSS *et. al.*, 2007; LEWIS & TUCKER, 2014; KRISHNAMURTHY, *et. al.*, 2016; MCMANNUS, *et. al.*, 2018). Entre quatro e cinco

semanas após a infecção, ocorre a maturação completa dos vermes; estes adultos realizam a cópula e, por conseguinte, a fêmea inicia a ovipostura. Os ovos são eliminados nos vasos mesentéricos próximos a parede intestinal, e cerca da metade destes ovos conseguem aderir ao endotélio dos vasos e provocar uma reação inflamatória no tecido que auxilia a sua saída da circulação, passagem pela mucosa intestinal e eliminação nas fezes, enquanto o restante é carregado pela circulação para os órgãos adjacentes, especialmente o fígado, causando a morbidade associada aos quadros de Esquistossomose crônica (BOROS & WARREN, 1970; CHEEVER *et. al*, 1994; GRYSSELS, 2012; COLEY & SECOR, 2014; COLEY *et. al*, 2014).

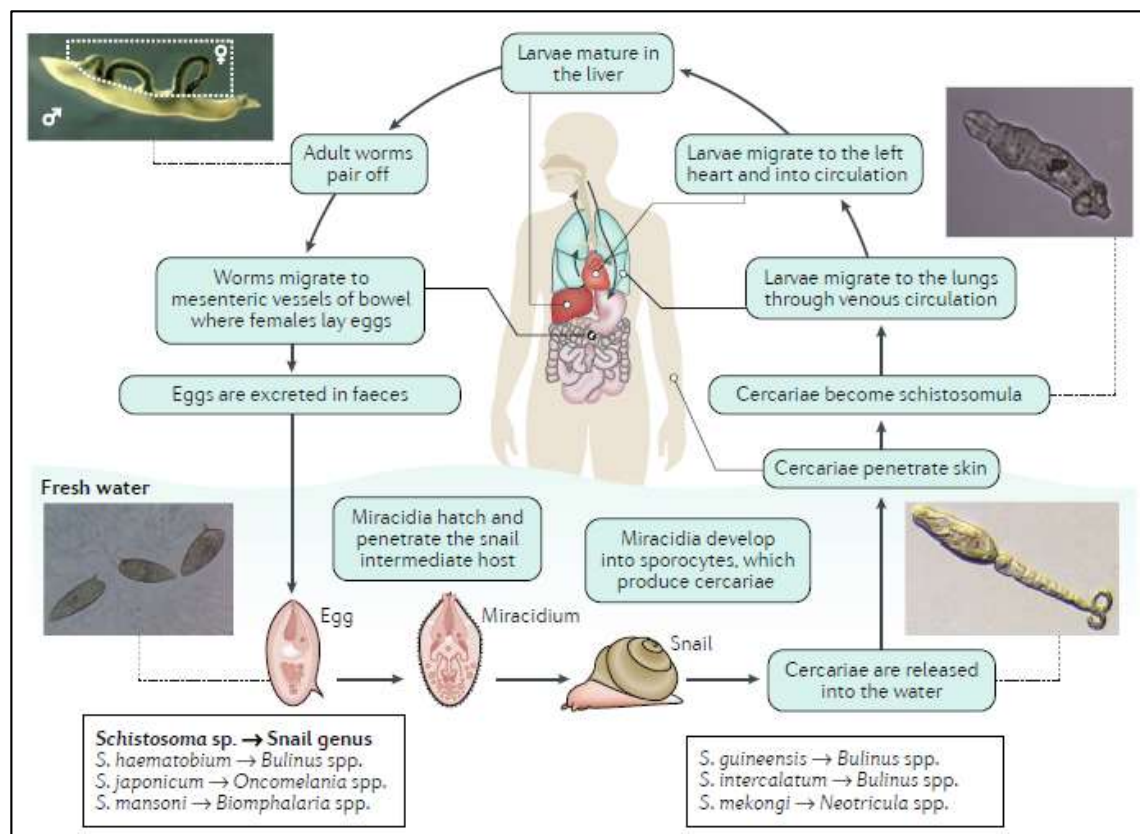


Figura 7 – Ciclo de vida do gênero *Schistosoma* sp. Fonte: McMannus, 2018.

2.2.3. Aspectos clínicos e imunopatogênicos

As alterações clínicas associadas à Esquistossomose mansoni são determinadas pela carga parasitária, migração do parasito pelos tecidos do hospedeiro definitivo, além da resposta do hospedeiro à presença das diferentes fases de desenvolvimento do parasito. As manifestações clínicas mais frequentes são: prostração, febre e eosinofília periférica, coincidente aos sinais intestinais de diarreia mucosanguinolenta e dores abdominais

(DUNNE & PEARCE, 1999; BRASIL, 2014). As principais manifestações clínicas e órgãos afetados no decorrer da infecção estão sumarizados na Tabela 2.

TABELA 2 – Principais manifestações clínicas no decorrer da infecção humana por *S. mansoni*

Período	Forma clínica	Classificação	Manifestações
INICIAL	FASE AGUDA	Assintomática	Os indivíduos infectados não apresentam sinais patognomônico e não relatam queixa.
		Sintomática / Toxêmica	Erupções de pele, de caráter pruriginoso (Dermatite cercariana)
TARDIO	FASE CRÔNICA	Hepática	Fibrose hepática, ausência de hipertensão portal, esplenomegalia e varizes esofagianas. Febre de <i>Katayama</i>
		Hepatointestinal	Espessamento da parede da veia porta, sintomas variáveis e inespecíficos como dores de cabeça cefaleia e indisposição, diarreia e melena.
		Hepatoesplênica	<ul style="list-style-type: none"> • Compensada - apresenta ou não hipertensão portal e hemorragia digestiva; • Descompensada - ascite icterícia, e encefalopatia presentes; • Complicada - Presença de comorbidades hepáticas ou de outras infecções concomitantes.
		Vasculopulmonar (#)	Comumente associada a forma Hepatoesplênica grave, apresenta hipertensão portal e pulmonar; no exame clínico o indivíduo apresenta-se cianótico.
		Glomerulopatia (#)	Também associada a forma hepatoesplênica, ao exame histopatológico é visualizado uma esclerose glomerular focal ou ainda uma glomerulonefrite membranoproliferativa.
		Neuroesquistossomose (#)	Achados granulomatosos focais, frequentemente encontrados na medula espinal.

(#) Formas ectópicas.

A Esquistossomose aguda está associada ao período de migração e amadurecimento dos vermes (fase aguda pré-postural), bem como o início da ovipostura até o estabelecimento da resposta modulatória, que acontece após cerca de 12 semanas (fase aguda pós- postural). Nesta fase, indivíduos não residentes de áreas endêmicas, expostos aos antígenos excreto/secretados tanto de cercárias, quanto de ovos podem não apresentar sintomas e sinais patogênicos da primoinfecção por *S. mansoni*. Outrossim, podem manifestar a clínica clássica somente nas fases mais avançadas da infecção. A maioria dos indivíduos residentes de área endêmica também não demonstram sinais iniciais. Atribui-se esta característica ao fato de que ainda na vida intrauterina, o feto esteja constantemente exposto a antígenos do parasito, em consequência da infecção materna. O sistema imune daqueles sensibilizados “*in utero*”, respondem a primoinfecção com intensidades e perfis linfocitários diferentes em relação aos não sensibilizados; é frequentemente visto um predomínio da resposta modulatória (NOVATO-SILVA *et. al*, 1992; ANDRADE, 2008; LACORCIA & PRAZERES DA COSTA, 2018). Em contrapartida, existem indivíduos que durante a fase aguda da Esquistossomose desenvolvem a forma sintomática inicial desta parasitose, denominada de dermatite cercariana; caracterizada por erupções cutâneas causadas pela secreção de enzimas produzidas pelas glândulas pré-acetabulares da cercária e ocorre principalmente em indivíduos previamente expostos. Estas enzimas promovem um intenso infiltrado neutrofílico e macrofágico, além da ativação das células dendríticas. Desta maneira, erupções cutâneas urticariformes se formam onde houve a penetração cercariana, que podem persistir por alguns dias, com evolução para lesões maculopapulares (INCANI & MCLAREN, 1984; JENKINS *et. al*, 2005; GRYSSELS, 2012; COLEY *et. al*, 2014; SANIN & MOUNTFOR; 2015; MCMANNUS *et. al*, 2018).

Posteriormente, inicia-se uma resposta imune, predominantemente do tipo 1 (Figura 8), orquestrada por aumento nos níveis de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e INF- γ . Esta resposta persiste por aproximadamente 5 semanas após a infecção e é extremamente desfavorável ao estabelecimento do parasito, bem como responsável pelos principais sintomas inflamatórios detectados nesta fase. No entanto, a excreção e secreção de proteínas provenientes das cercárias, ativam prostaglandinas que aumentam a produção local de IL-4 e IL-10, e atrasam o processo de migração das células de Langherans para os gânglios linfáticos de forma a retardar a resposta imune efetora contra as formas imaturas, bem como modular o processo inflamatório responsável por sintomas desta fase da infecção, especialmente em áreas endêmicas, onde o contato com cercarias é mais frequente (HIATT *et. al*, 1979; BOROS,

1994; PEARCE & MCDONNALD, 2002; DUNNE & COOKE, 2005; WILSON *et. al*, 2006 COLEY & SECOR, 2014; SANIN & MOUNTFORD, 2015; SCHWARTZ & FALLON, 2018).

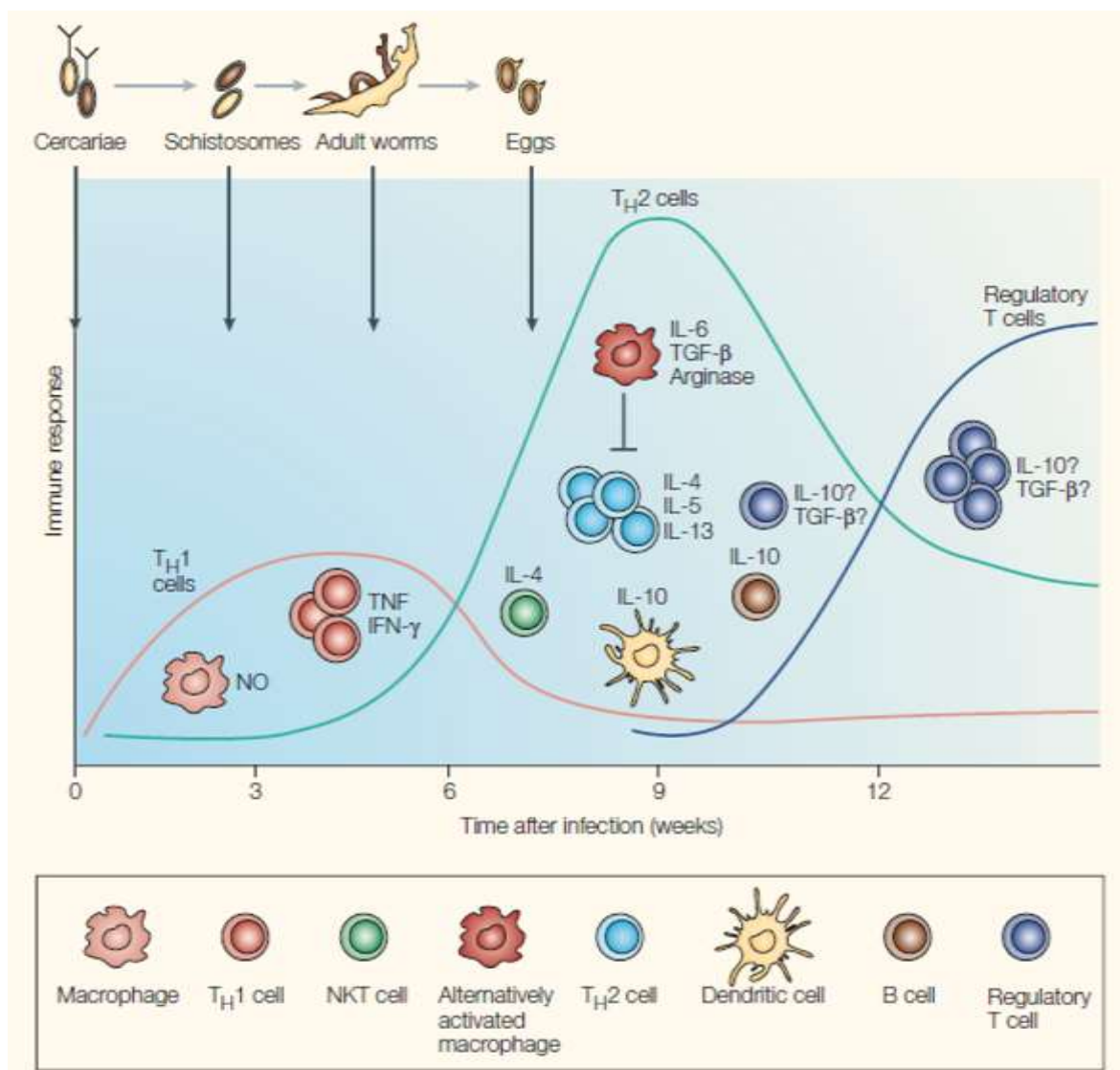


Figura 8. Resposta imune frente à evolução da infecção de *S. mansoni*. Fonte: Dunne & Cooke 2005.

Entre os indivíduos que apresentam sintomas durante a fase aguda da Esquistossomose desenvolvem um quadro de hipersensibilidade sistêmica, decorrente da resposta a migração dos esquistossômulos pelos tecidos do indivíduo, associado a sintomas, mialgia, tosse, diarreia e sudorese que podem evoluir para forma mais grave, conhecida como forma toxêmica. Na fase toxêmica há um chamado conflito imunológico em respostas aos antígenos dos ovos, ocorre uma exacerbação dos sintomas de fase aguda com quadros

parecido aos da Febre Tifoide e hepatoesplenomegalia dolorosa à palpação (COURA *et. al* 1970).

É bastante difundido que a síndrome de *Katayama* é sinônimo da forma aguda toxêmica, relacionada com a fase aguda da infecção por *S. japonicum*, entretanto esta associação está incorreta. O uso deste termo para a infecção por *S. mansoni* seria correspondente a hepatoesplenomegalia de fase crônica, na qual há eosinofilia periférica, urticária, angioedema e, aos exames complementares, demonstra infiltração nas vias pulmonares detectáveis pelo exame radiográfico (RASO *et. al*, 1986; ROSS, 2007; GRYSSELS, 2012; MCMANNUS, *et. al*, 2018; LANGENBERG *et. al*, 2019).

Posteriormente ao período prodrômico instaurado na fase aguda, entre a 5ª e 6ª semana pós infecção, é observado o período de estado; no qual o indivíduo infectado demonstra sinais clínicos menos gerais, que, associados aos questionamentos epidemiológicos, permitem a requisição de exames complementares para confirmação desta morbidade. Com a instalação dos vermes adultos nas veias mesentéricas inferiores e início da ovipostura, a principal imunopatologia durante a infecção pelo *S. mansoni* é a formação do granuloma em volta dos ovos do parasito, que são retidos em vários órgãos devido a embolização daqueles não eliminados nas fezes (MCMANUS *et. al*, 2018; SCHWARTZ & FALLON, 2018). Os ovos retidos nos tecidos produzem glicoproteínas que potencializam a polarização de uma resposta mais de perfil tipo 2 (Figura 8), com grande produção de IL-4, IL-5 e IL-13, além da polarização de macrófagos alternativamente ativados e mudança isotípica de IgG1 para IgE pelas células B. Este tipo de resposta induz uma intensa eosinofiloiose, importante para a formação do granuloma responsivo a infecção. A formação do granuloma de fase aguda da infecção decorre de um processo dinâmico, extremamente organizado e inflamatório, dotado de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T, macrófagos e fibroblastos (PARRA *et. al*, 1992; BOROS, 1994; PEARCE & MCDONNALD, 2002; WILSON *et. al*, 2006; CHUAH *et. al*, 2014; COSTAIN *et. al*, 2018; SCHWARTZ & FALLON, 2018).

Assim sendo, a formação de lesões granulomatosas induzidas pelos ovos são características marcantes da infecção esquistossomótica, e, a principal causa de morbidade na população. Estes granulomas são encontrados principalmente no fígado e intestinos, e com menores frequências nos pulmões, bexiga, cérebro, pele, glândulas suprarrenais, músculo esquelético, linfonodos, baço, rim e estômago, que resultam nas manifestações clínicas da doença. Os sinais e sintomas de cada manifestação clínica é específico de cada

órgão afetado e é positivamente correlacionado a intensidade da infecção e consequente produção de ovos pelo casal de vermes, bem como com a intensidade da resposta imune (TABELA 2) (DUNNE & PEARCE, 1999; CHUAH *et. al.*, 2014; MCMANUS *et. al.*, 2018; SCHWARTZ & FALLON, 2018).

Com a progressão da morbidade para a fase crônica, os granulomas instaurados ao redor dos ovos tornam-se menos inflamatórios devido a modulação da resposta imune. O mecanismo desta regulação não foi completamente elucidado, entretanto, sabe-se que algumas glicoproteínas e fosfolipídios secretados pelo parasito estimulam a produção de IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13, a partir de células dendríticas, basófilos, eosinófilos e células T/B/NK, além de TGF- β , que ainda não tiveram a sua origem celular definida, cuja intensidade é determinante para estabelecer um quadro de fibrose (Figura 8) (BOROS, 1994; WAHL, *et. al.*, 1997; PEARCE & MCDONNALD, 2002; DUNNE & COOKE, 2005; WILSON *et. al.*, 2006; COLEY & SECOR, 2014). Estudos recentes acerca da imunologia da Esquistossomose revelam que, além da produção dessas citocinas que compõem o perfil de resposta do tipo 1 e do tipo 2, foram descobertos outros padrões de citocinas produzidas por populações de células de perfil Th17, com um destaque maior para as interleucinas IL-17 e IL-22 (WEN *et. al.*, 2011; SERTORIO *et. al.*, 2015; NADY *et. al.*, 2017).

Acerca da IL-17, já é sabido que ela é produzida em vários tecidos por diferentes tipos celulares, como células T CD4 e CD8, células NK, células linfóides inatas do grupo 3 (ILC3) e até mesmo células Th17 naturais (KORN *et. al.*, 2009; MCGEACHY, *et. al.*, 2019). E, por não ter um tipo celular estrito de produção, bem como vários subtipos dessa mesma citocina, a IL-17 desempenha diferentes funções na evolução das morbidades. No caso da Esquistossomose, com a cronificação da infecção, a IL-17 aumenta em resposta à elevação dos níveis circulantes de antígenos do parasito, especialmente de antígenos excretados pelos ovos. Isto é, há uma correlação positiva entre a gravidade da Esquistossomose e a alta concentração de IL-17, uma vez que essa interleucina pode estar envolvida nos processos imunológicos que favorecem a migração e estabelecimento de granulócitos com deposição de colágeno entorno do granuloma (BAZZONE *et. al.*, 2008; WILSON *et. al.*, 2010; NADY *et. al.*, 2017; WEN *et. al.*, 2017).

Quanto a IL-22, sabe-se que esta citocina pertence a família da IL-10, e assim como os outros membros do seu grupo apresenta um caráter antimicrobiano, limitador de danos e mantenedor da integridade e homeostase tecidual. A produção dessa citocina está intimamente ligada às células T, NK, NKT e LTi (indutoras de Tecido Linfóide), além da

produção por populações de células de perfil Th1, Th17 e ILC3 (KORN *et. al*, 2009; OUYANG *et. al*, 2011; JIA & WU, 2014). Já no contexto da morbidade causada pela Esquistossomose, diferente da IL-17, a IL-22 desempenha papel inibidor da formação do granuloma, estando assim associada a formas menos graves da morbidade causada pelos ovos do parasito (SERTORIO *et. al*, 2015; NADY *et. al*, 2017)

Toda essa dinâmica de resposta imunológica tem por objetivo conter os danos decorrentes do acúmulo contínuo de ovos nos tecidos do hospedeiro e consequente dano aquele microambiente celular. Nesse sentido, a imunopatologia intestinal causada pelo granuloma periovular esquistossomótico é, sobretudo funcional, tanto para o hospedeiro quanto para o parasito, pois: (1) a inflamação granulomatosa intestinal facilita a processo de translocação do ovo para a luz intestinal; (2) previne a translocação bacteriana do intestino para circulação do hospedeiro e intensifica a eliminação do ovo; (3) minimiza o dano tecidual do hospedeiro à respostas imunes exageradas, e; (4) beneficia os parasitos adultos por não causar mortalidade ao hospedeiro, possibilitando a manutenção do ciclo (COSTAIN *et. al*, 2018; SCHWARTZ & FALLON, 2018). A partir da 12^a semana após a infecção instala-se o quadro crônico da Esquistossomose, os granulomas periovulares possuem um tamanho significativamente reduzido e são formados, quase que em sua totalidade, apenas por macrófagos e fibroblastos. Em uma resposta imune efetiva, ou após o tratamento, ocorre a morte do mirácidio dentro do ovo, com consequente desintegração, e isso está associado a redução na resposta inflamatória. Ademais, concentrações elevadas da citocina IL-10 também são marcantes e promovem a regulação da citotoxicidade linfocitária, de forma a resguardar a sobrevivência do hospedeiro. No entanto, a cronicidade da infecção deriva para a progressão da forma intestinal crônica da doença. Os indivíduos neste momento da infecção relatam dor abdominal intermitente inespecífica, diarreia e sangramento retal. Uma parcela considerável das pessoas com Esquistossomose intestinal desenvolve pobremente uma resposta imunoregulatória frente aos antígenos do ovo e, consequentemente, desenvolvem uma extensa faixa fibrótica pelo intestino com subsequente doença hepática (TABELA 2) (ANDRADE & WARREN, 1964; CHUAN *et. al*, 2014; COLEY *et. al*, 2014; SCHWARTZ & FALLON, 2018).

O fígado é o órgão que está sempre envolvido nos processos patológicos da Esquistossomose, juntamente com os intestinos. Na fase crônica da Esquistossomose a morbidade do fígado é agravada devido a fibrose. Sob esta ótica, durante o exame clínico palpatório, o fígado apresenta-se endurecido com alteração dos parâmetros hemodinâmicos,

sendo observado hipertensão da circulação portal e ausência de outras alterações orgânicas. (TABELA 2). Quando ocorre o comprometimento funcional, tanto do fígado quanto dos intestinos simultaneamente, a Esquistossomose é classificada como forma hepatointestinal. Geralmente esta forma precede a forma hepatoesplênica devido a formação de granulomas na parede vascular periportal pré-sinusoidal, resultando em espessamento. Isso congestiona o fluxo sanguíneo, favorecendo em um aporte maior de sangue para o baço e consequente deposição de ovos neste órgão. Esta retenção de ovos no baço provoca um aumento substancial deste órgão e do fígado, principalmente o lobo hepático esquerdo, e caracteriza a forma clássica (grave) da Esquistossomose hepatoesplênica. As características clínicas incluem desconforto no abdome superior, ascite e hematêmese de varizes esofágicas (DUNNE & PEARCE, 1999; BRASIL, 2014 COLEY, *et al*, 2014; MCMANUS *et. al*, 2018).

Ainda com menor taxa de ocorrência, mas não menos grave, existem as formas ectópicas da Esquistossomose, as quais são caracterizadas pela presença da formação de granulomas aquém do habitat natural do helminto ou órgãos próximos. A maioria dos casos são notificados comprometendo o parênquima pulmonar, sistema nervoso, pele e sistema renal (TABELA 2) (PITTELLA, 1997; BRASIL, 2014; LIMA *et. al*, 2017; MCMANUS *et. al*, 2018; BUTROUS, 2019).

2.3. Comorbidades vs *S. mansoni*

Infecções crônicas por alguns protozoários e helmintos parasitos induzem mecanismos capazes de modular o sistema imune do seu hospedeiro; estes mecanismos funcionam de forma a favorecer a sobrevivência dos parasitos. Por outro lado, a modulação da resposta imune do hospedeiro também é responsável pela redução na intensidade do processo inflamatório, resultando em redução da imunopatologia associada às infecções parasitárias. Os mecanismos de modulação induzidos durante parasitoses crônicas variam, desde a supressão de células T efectoras, inibição das vias de sinalização intracelulares até a produção de moléculas que diminuem o recrutamento de células apresentadoras de antígeno para o sítio da infecção (GLASS *et. al*, 2012; KLING & KÖRNER, 2013; van der ZANDE *et. al*, 2019).

A regulação imune também pode afetar outras doenças inflamatórias, já que mecanismos de modulação induzidos pelo parasito são capazes de atuar sobre outros

processos inflamatórios de forma inespecífica, que estão localizados no mesmo microambiente e até mesmo de maneira sistêmica (SMITS *et. al*, 2010 MAIZELS 2016; HARRIS & LOKE, 2017). Em modelos murinos de doenças inflamatórias crônicas não transmissíveis, já foi relatado que algumas espécies de helmintos parasitos são capazes de amenizar a gravidade de certos processos fisiopatológicos. Dentre eles a doença de *Crohn*, retocolite ulcerativa, artrite reumatóide, esclerose múltipla, dermatite alérgica, alergias respiratórias e oculares, além de obesidade, diabetes e algumas doenças neuropsiquiátricas (revisado por SOBOTKOVÁ *et. al*, 2019; ABDOLI & ARDAKANI, 2019).

De maneira semelhante, a resposta imune induzida por parasitoses crônicas, como a Esquistossomose, também pode afetar a susceptibilidade do hospedeiro à outras infecções parasitárias, bem como alterar a morbidade destes processos infecciosos. Alguns estudos podem ilustrar a variabilidade deste efeito em situação de coinfeção, entre eles vale citar que camundongos coinfectados por *Toxoplasma gondii* um dia antes da infecção por *S. mansoni* apresentam severa perda de peso e aumento na taxa de mortalidade (MAHMOUD *et. al*, 1977). Macrófagos de animais coinfectados por *S. mansoni* e *Salmonella typhimurium* mostraram menor capacidade de fagocitose das bactérias, levando a um quadro de Salmonelose crônica (MUNIZ-JUNQUEIRA *et. al*, 1992). Por outro lado, Curry e colaboradores (1995), mostraram que camundongos coinfectados com *S. mansoni* e *Trichuris muris* apresentaram maior habilidade de eliminar a infecção pelo nematódeo comparado aos animais apenas infectados pelo nematódeo.

No caso de coinfeção por *S. mansoni* e *Leishmania* sp., Lopes e colaboradores (2019), mostraram que células dendríticas isoladas de indivíduos com LTA, quando estimuladas *in vitro* com antígeno de verme adulto de *S. mansoni* (Sm29) e infectadas com *L. (V.) braziliensis*, produziram maior concentração de IL-10 e também menor produção de IFN- γ em linfócitos T em relação ao controle. No entanto, a relação inversa, ou seja, o efeito da coinfeção nas alterações referentes a Esquistossomose, ainda são pouco estudados. O primeiro relato que se tem de uma infecção alterando a evolução da Esquistossomose é de KLOETZEL e cols. (1971), que observaram que animais expostos previamente a *Trypanosoma cruzi*, quando coinfectados com *S. mansoni*, durante a fase aguda da infecção pelo protozoário, apresentaram menor recuperação de vermes adultos. Porém, quando a coinfeção por *S. mansoni* neste mesmo modelo ocorreu durante a fase crônica da Doença de Chagas, a recuperação no número de vermes foi semelhante ao dos animais monoinfectados.

Outros autores (MAHMOUD, *et. al.*, 1976; MAHMOUD, *et. al.*, 1977) também demonstraram experimentalmente que, a infecção por *T. gondii*, foi capaz de diminuir a carga parasitária de vermes adultos de *S. mansoni*, além de diminuir área de granulomas periovulares hepáticos, bem como a redução na incidência de varizes esofagianas. É relevante ressaltar que, nos estudos de coinfeção, a espécie do parasito e a cronologia da associação, são variáveis canônicas para definir o tipo e a intensidade de alteração clínica nos indivíduos coinfectados; além de que, trabalhos utilizando delineamentos experimentais semelhantes demonstram também variações discordantes entre os resultados (MAHMOUD, *et. al.*, 1976; KLOETZEL *et. al.*, 1977; CHRISTENSEN *et. al.*, 1978; GENARO *et. al.*, 1986; YAGI, *et. al.*, 1986; FORD *et. al.*, 1987; RODRIGUEZ-OSORIO, 1993; FERRERAS *et. al.*, 2000; MALDONADO *et. al.*, 2001; BICKLE, *et. al.*, 2008).

Atualmente, em termos absolutos, o modelo mais estudado de coinfeção entre *S. mansoni* e outras espécies de parasitos é o de malária; este fato pode ser explicado pelas altas taxas de morbimortalidade causadas pelo *Plasmodium* sp., além da existência de extensas regiões de cotransmissão destes dois parasitos. Entretanto, cabe aos pesquisadores de cada região avaliar as taxas de incidência, prevalência, bem como as áreas de cotransmissão de doenças infecciosas sem se valer tanto de análises espaciais externas. Isto é, a relevância do trabalho deve condizer com a realidade de cada população, antes mesmo de seguir uma tendência global.

No Brasil, a Leishmaniose e a Esquistossomose são as doenças negligenciadas de maior impacto para a saúde da população, sendo que juntas são responsáveis por 133.100 *DALYs* a cada 100.000 habitantes (MARTINS-MELO *et. al.*, 2018). No entanto, o impacto que essas doenças causam juntas não refletem proporcionalmente na quantidade de estudos acerca dessa coinfeção. Infere-se que, essa não correspondência entre realidade e pesquisa seja decorrente da ausência de ferramentas que auxiliem a percepção desse fenômeno. Na intenção de se minimizar este viés de percepção, foi construído um mapa de sobreposição das áreas de coincidência de Leishmanioses e Esquistossomose no Brasil, conforme ilustrado na figura 9.

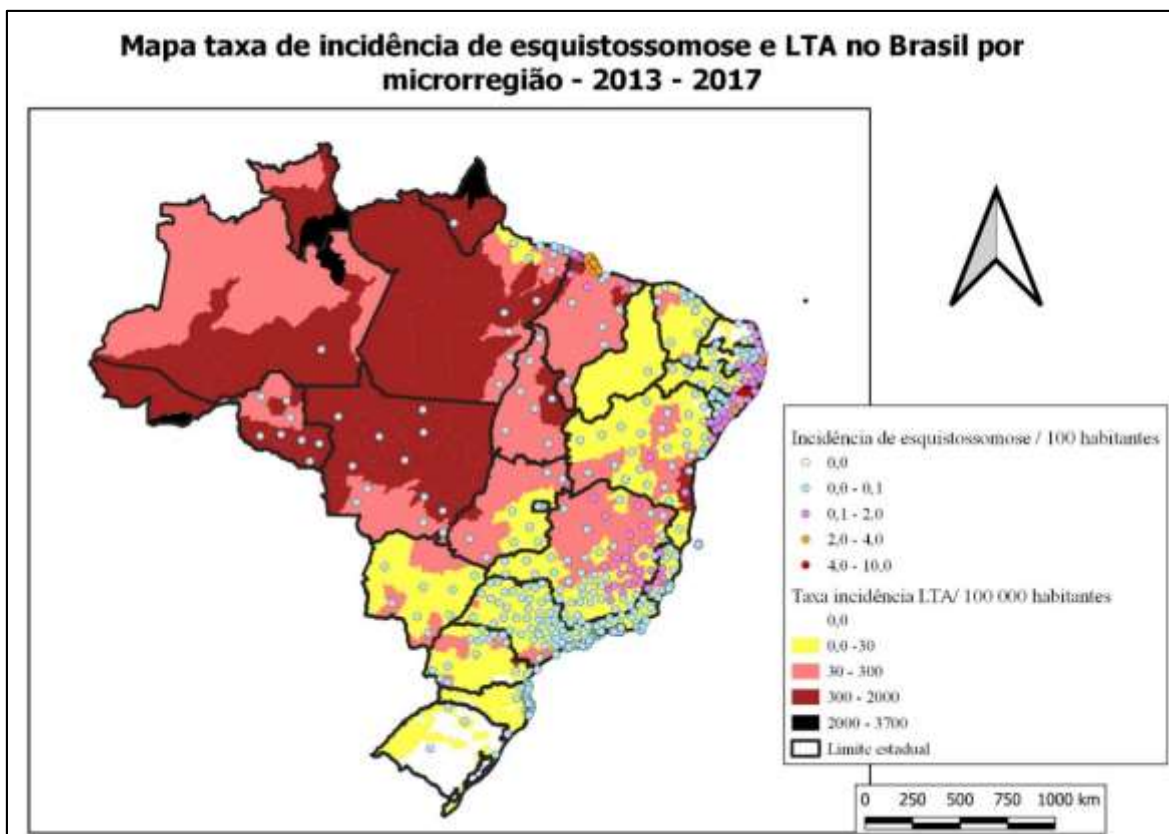


Figura 9: Mapa taxa de incidência de Esquistossomose e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil por microrregião 2013-2017. (Fonte: Arquivo pessoal – não publicado)

Sob esta representação geoespacial observa-se que, o número de casos confirmados de Leishmaniose e Esquistossomose no Brasil, notificados ao Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), foi alto entre os anos de 2013 e 2017. A análise da figura 9 também permite afirmar que estas parasitoses compartilham áreas extensas de cotransmissão, em todo o território nacional, principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste, com destaque para os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe e Pernambuco.

Nosso grupo de pesquisa realizou um inquérito de base populacional no Município de Januária – MG e relatou casos de humanos com Esquistossomose ativa e histórico progresso de Leishmaniose Tegumentar; além deste, alguns estudos avaliaram as implicações causadas por esta condição, tanto em humanos, quanto em modelos animais (O’Neal, 2006; Lopes *et. al*, 2018; Miranda, 2018). Entretanto, nenhum trabalho pode observar, de forma satisfatória, as possíveis alterações provocadas pela Leishmaniose na evolução da Esquistossomose.

Isto posto, este trabalho se propôs a avaliar os efeitos biológicos e imunopatológicos da coinfeção por *L. amazonensis* e *S. mansoni* na evolução da Esquistossomose, e apurar os possíveis mecanismos envolvidos nesta interação parasito/hospedeiro.

3. JUSTIFICATIVA

De forma geral, as populações humanas estão expostas diariamente a uma quantidade abundante de agentes patogênicos, e dentre eles uma parcela considerável é de parasitos, que causam grande impacto na saúde de seus hospedeiros. Entre as parasitoses que causam grande problema de saúde pública estão as Leishmanioses e a Esquistossomose, que, além de causarem intensa morbidade, também são doenças de difícil diagnóstico e controle. A transmissão de ambas as parasitoses é amplamente favorecida em condições precárias de saneamento, educação e saúde, que, aliadas às condições climáticas, possibilitam a sobrevivência e proliferação de seus vetores. Esse conjunto de fatores propicia a formação de regiões de sobreposição e cotransmissão desses parasitos, com conseqüente surgimento de casos humanos.

Apesar da importância destes relatos de coinfeção, existe uma grande escassez de estudos que abordem os efeitos destas parasitoses para o estabelecimento da resposta imune do hospedeiro e para a morbidade associada. Estes estudos são especialmente relevantes no caso da Leishmaniose e da Esquistossomose, que são infecções parasitárias com perfil de resposta imune bastante diferenciados, e nas quais a intensidade desta resposta está diretamente associada à severidade do quadro clínico. Entre os raros estudos publicados neste tema, a maioria investiga o efeito da Esquistossomose na Leishmaniose, indicando que nos indivíduos coinfectados existem indícios de aumento de mecanismos imunomodulatórios que afetam as lesões cutâneas induzidas pelo protozoário, bem como a resposta do hospedeiro ao tratamento. Entretanto, o efeito da coinfeção na evolução da Esquistossomose não foi avaliado.

Outro aspecto importante a ser salientado é a grande alteração no perfil epidemiológico da Leishmaniose e da Esquistossomose, observada nas últimas décadas no Brasil. Nas áreas endêmicas de Esquistossomose, a doença apresentava uma prevalência elevada, principalmente em crianças em idade escolar, até os anos de 1980 e 1990. Nesta situação, é possível supor que indivíduos coinfectados fossem primariamente expostos ao agente da Esquistossomose e só depois houvesse a coinfeção por *Leishmania* sp. Porém, com a melhoria das condições médico-sanitárias, de educação em saúde e também com o êxodo rural, a epidemiologia da Esquistossomose no Brasil mudou de perfil. Atualmente, tem sido relatado em áreas endêmicas de Esquistossomose uma diminuição do pico de

transmissão entre os indivíduos da primeira infância e maiores taxas de infecção e reinfecção já na população adulta. Fato este que propicia a ocorrência das coinfeções de *Leishmania* sp. e *S. mansoni* em um mesmo momento da vida da população, ou até mesmo uma inversão dessa ordem de infecção, que pode afetar substancialmente o efeito na morbidade.

Assim, fica evidente a necessidade de estudos mais aprofundados da resposta imune e da imunopatologia associada à coinfeção por espécies que causam Leishmaniose Tegumentar humana e Esquistossomose em modelos experimentais, que permitam padronizar carga parasitária e período de exposição a cada parasito. Neste sentido, o presente estudo teve como principal objetivo, caracterizar as alterações parasitológicas, clínicas e imunopatológicas induzidas pela coinfeção por *L. amazonensis* e *S. mansoni* em camundongos BALB/c, valorizando, especialmente, como a infecção prévia por esse protozoário possam interferir na evolução da Esquistossomose.

Nossa hipótese é que animais coinfectados apresentem alterações no perfil e na intensidade da resposta imunológica e que estas alterações imunológicas possam afetar a carga parasitológica e a morbidade de cada infecção.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da coinfeção por *L. amazonensis* e *S. mansoni* na susceptibilidade e na morbidade de camundongos BALB/c.

4.2. Objetivos específicos

- a) Acompanhar a taxa de sobrevivência, alterações hematimétricas e a evolução da morbidade associada a Leishmaniose Tegumentar e Esquistossomose em camundongos BALB/c mono e coinfectados;
- b) Quantificar a carga parasitária de *S. mansoni* e de *L. amazonensis* em camundongos BALB/c mono e coinfectados;
- c) Avaliar comparativamente a resposta imunológica em camundongos BALB/c mono e coinfectados por *S. mansoni* e *L. amazonensis*;
- d) Caracterizar as alterações bioquímicas e histopatológicas hepáticas de camundongos BALB/c mono e coinfectados por *S. mansoni* e *L. amazonensis*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais experimentais e Triagem pré-clínica

Os animais utilizados para a realização deste trabalho foram camundongos (*Mus musculus*), da linhagem BALB/c, fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO) – UFMG e mantidos no Biotério de animais infectados do Departamento de Parasitologia. Os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais. (CEUA – protocolo no 398/2018).

Os animais ao serem retirados do CEBIO, foram acondicionados em gaiolas plásticas apropriadas, individualmente por cinco minutos para coleta de material fecal. As fezes evacuadas por estes animais foram processadas e analisadas em microscópio óptico como descrito por Negrão-Corrêa (2004), para a identificação de cistos ou trofozoítos de protozoários, bem como para eventuais ovos ou larvas de helmintos. Também foi utilizada a técnica de Graham (1941), que utiliza uma fita gomada para coleta de possíveis ovos de helmintos dispersos na região perianal destes animais. Independentemente do resultado parasitológico todos os animais utilizados em experimentos foram mantidos em quarentena e preventivamente tratados com Ivermectina (Klements, 1996). Após o descanso terapêutico os animais foram pesados em balança analítica (E. Mettler K5 21709; Analytical Balance Scale – Northstowe, New Jersey), e animais com peso corporal de 20-25g foram acomodados aleatoriamente em microisoladores e mantidos em racks ventiladas (Alesco Co., Monte Mor, São Paulo, Brasil), sendo ofertadas ração para camundongos (Linha laboratório, Presence, Brasil) e água em temperatura ambiente *ad libitum*.

5.2. Parasitos e a infecção experimental

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* utilizadas para a infecção foram as da cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8), conservadas no Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG sob criopreservação e infecções em hamsters (*Mesocricetus auratus*), sob a responsabilidade da Dra. Maria Norma Melo, colaboradora do trabalho. As infecções experimentais foram realizadas pela via subcutânea (agulha 26G) de 1×10^4 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase de crescimento estacionário, recém isoladas de infecção animal

(até a quinta passagem em cultura). O inóculo foi preparado com a ressuspensão das formas promastigostas em 10µL de tampão fosfato estéril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3mM Na₂ HPO₄.7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄), e administrados na face dorsal da pata posterior direita do animal.

O trematódeo, *S. mansoni*, utilizado para os experimentos foi da cepa LE (VALADARES *et al.* 1981), mantida no Laboratório de Esquistossomose e Imunologia de Helmintos por meio de sucessivas infecções em hamsters e caramujos *Biomphalaria glabrata*, de acordo com a técnica descrita por PELLEGRINO & KATZ (1968). Os procedimentos para manutenção do trematódeo e obtenção de formas infectantes utilizadas no projeto foi avaliado e aprovado (protocolo CEUA nº 368/2018).

Para infecção experimental dos camundongos, foram utilizadas cercárias obtidas de *B. glabrata* infectados e expostos por 4h à iluminação artificial em água desclorada. As cercárias emergidas foram lavadas e analisadas quanto a sua motilidade, presença de cauda e vitalidade. Posteriormente estas cercárias foram concentradas, contadas com o auxílio de uma lupa, e aproximadamente 50 formas larvas foram inoculadas por via subcutânea na região dorsal do animal, com uma agulha hipodérmica 23G, e volume máximo de 500µL assim como descrito por PELLEGRINO & MACEDO (1955) com algumas modificações. Para o experimento de recuperação e contagem de esquistossômulo do pulmão dos animais infectados a infecção experimental foi realizada com 500 cercárias por camundongo.

5.2.1. Obtenção de antígenos

Para a obtenção de antígenos do ovo de *S. mansoni* (SEA), camundongos BALB/c foram infectados pela via subcutânea na região dorsal com aproximadamente 120 cercárias do trematódeo (protocolo CEUA nº 368/2018), com uma agulha hipodérmica 23G. Passados 45 dias após a infecção estes animais foram eutanasiados e o seus fígados removidos. Assim como descrito por Dunne *et. al.*, (1981), com algumas modificações, os fígados foram homogeneizados em solução salina concentrada e gelada (1,7% de NaCl a 2°C) para evitar a eclosão dos ovos. A solução contendo ovos foi submetida a diversos ciclos de limpeza, que consistiu em decantar os ovos e material mais denso em cálices de vidro por trinta minutos, seguida da aspiração do sobrenadante e, ao produto decantado, foi novamente adicionado salina concentrada gelada; as lavagens foram repetidas até que o sobrenadante se apresentasse límpido e com ausência de muco. Por fim, a suspensão de ovos foi passada por

três peneiras do tipo de tamisação, com diferenças na capacidade de filtração de acordo com o tamanho do seu poro. A última estrutura da peneira era responsável por reter os ovos e parte do líquido que fora filtrado. O líquido com ovos foi centrifugado a uma rotação de 2500 g por 10 minutos em temperatura ambiente. O *pellet* recuperado foi ressuspensão em 1ml de PBS. Sob banho de gelo, os ovos foram submetidos a ciclos de trinta segundos em homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) e trinta segundos em repouso até que, sob microscopia, óptica não fosse mais observadas estruturas integras de ovos.

Promastigotas metacíclicas de cultura de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento também foram utilizadas para obtenção de antígeno de *Leishmania (SLA)*. As cepas criopreservadas foram expandidas a 1×10^9 promastigotas em meio α -MEM completo. Como descrito previamente por Maksouri *et. al* (2017), as promastigostas foram lavadas três vezes com PBS, seguido por cinco ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (37°C). Após isso a solução contendo promastigostas foi ultrasonicada por 20 ciclos de 10 segundos (Unique – São Paulo, Brasil). Tanto o antígeno de *SEA* quanto o *SLA*, após processados, foram centrifugados a $3000 \times g$ por 1 h e o sobrenadante foi recolhido, filtrado em membrana esterilizante de $0,22 \mu\text{m}$ e submetidos a técnica de dosagem de proteínas pelo método de Lowry (1951), e aliquoteado para uso posterior.

5.3. Delineamento experimental

Para estudar as alterações causadas pela coinfeção de *L. amazonensis* e *S. mansoni* em camundongos, foram comparativamente avaliados 4 grupos experimentais: monoinfectados com *L. (L.) amazonensis* (LLA), monoinfectados com *S. mansoni* (SM), infectados por *L. (L.) amazonensis* e posteriormente por *S. mansoni* (LLA + SM), além do grupo controle não-infectado. Inicialmente, os animais do grupo LLA e LLA+SM foram inoculados com as promastigostas de fase estacionária (indicado como L nas ilustrações esquemáticas), e, após 3 semanas, os animais dos grupos SM e LLA+SM receberam inoculação subcutânea de *S. mansoni* (indicado por S). No mesmo período, os animais do grupo controle foram inoculados com o mesmo volume de salina tamponada, tanto em pata quanto no dorso. A representação esquemática do delineamento experimental está ilustrada na Figura 10.

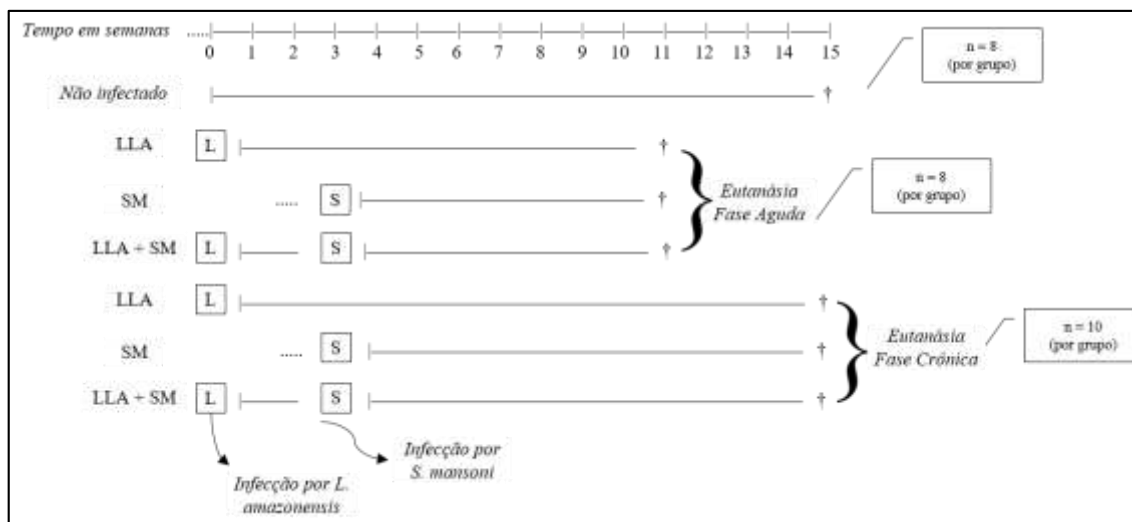


Figura 10 – Delineamento para acompanhamento da imunopatologia em camundongos mono infectados por *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) e coinfectedos (LLA+SM).

Durante todo o período do protocolo experimental (15 semanas), os animais foram examinados e pesados semanalmente. Neste mesmo período, os casos de óbitos foram registrados e aqueles animais que apresentaram intensa perda de peso, apatia e sinais de sofrimento foram eutanasiados, e contabilizados para o cálculo da taxa de mortalidade. Na fase aguda e na fase crônica da Esquistossomose (8 e 12 semanas após a infecção por *S. mansoni*, respectivamente), que corresponde a 11 e 15 semanas do início do protocolo experimental, os animais de cada grupo foram anestesiados via intraperitoneal (quetamina, 80 mg/kg, e xilazina 10 mg/kg) e eutanasiado por exsanguinação corporal pela secção do plexo vascular axilar. O sangue destes animais foi armazenado em tubo protegidos da luz contendo anticoagulante Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) para posterior análise hematimétrica.

Alguns procedimentos para quantificação da carga parasitária fazem com que os órgãos dos animais se tornem inviáveis para avaliar parâmetros imunológicos e histopatológicos. Para isso foi necessário a realização de duas infecções para contemplar todos os ensaios propostos. A primeira infecção, denominada ‘experimento 1’ destinou-se para avaliar carga parasitária dos animais mono e coinfectedos, enquanto a segunda infecção foi denominada ‘experimento 2’ e visou avaliar parâmetros da resposta imune, quantificação de parâmetros bioquímicos e alterações histopatológicas, como resumido na Figura 11.

No ‘experimento 1’, os animais mono- e coinfectedos com *L. amazonensis*, após a eutanásia, tiveram suas patas posteriores traseiras amputadas na região calcânea para a quantificação de parasitos por diluição limitante. Já aqueles infectados com *S. mansoni*

foram observados semanalmente para determinação indireta da intensidade da carga através da contagem de ovos do trematódeo eliminado nas fezes. Após a eutanásia estes animais tiveram o sistema circulatório reperfundido para recuperação e contagem de vermes adultos, e os diferentes órgãos foram retirados e digeridos para a contagem de ovos retidos nos tecidos (FIGURA. 10).

O ‘experimento 2’ foi executado com o mesmo perfil do ‘experimento 1’. Após a eutanásia estes animais tiveram o fígado retirado e separado em lobo direito, utilizado para análises histopatológicas; lobo esquerdo, que foi pesado, homogeneizado, e teve o sobrenadante coletado para quantificação de citocinas e o *pellet* foi processado para quantificar a atividade enzimática de peroxidase de eosinófilos (EPO) e mieloperoxidase (MPO); o lobo quadrado também foi pesado, homogeneizado e processado para quantificação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG), enquanto que o lobo caudado foi destinado ao ensaio de hidroxiprolina. Por fim, também foi retirado o baço em condições assépticas para realização de um experimento *ex vivo*. Os esplenócitos foram cultivados *in vitro* na presença de antígeno de *S. mansoni* e *L. amazonensis*. O sobrenadante desta cultura foi utilizado para quantificação da produção de citocinas e quimiocinas para avaliação da resposta imune sistêmica (FIGURA 11).

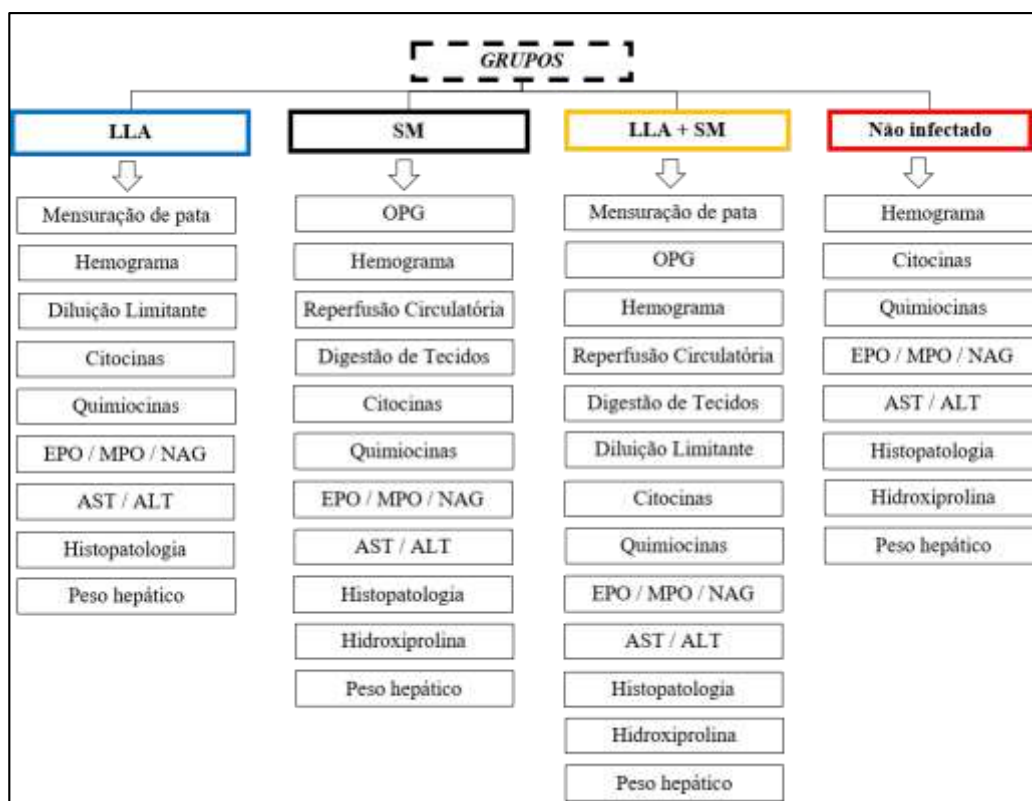


Figura 11 – Organograma experimental. Delineamento experimental das técnicas realizadas com os camundongos monoinfectados por *L. amazonensis*, *S. mansoni* ou coinfectados, avaliados na fase aguda e crônica da Esquistossomose.

5.3.1. Evolução da morbidade

Para análise da morbidade, o peso corporal de cada animal experimental foi mensurado semanalmente, através de pesagem individual em balança eletrônica analítica (E. Mettler K5 21709; Analytical Balance Scale – Northstowe, New Jersey), e os dados foram plotados como variação de peso semanal em relação ao peso do mesmo animal no início do procedimento, expresso como média por grupo experimental (NAM *et. al*, 2019).

Na intenção de minimizar o estresse gerado pela manipulação do animal, a mensuração do edema de pata associado a infecção por *L. amazonensis* e o exame clínico dos animais foram realizados no mesmo momento da coleta dos dados de peso corporal. Logo, semanalmente estes animais tiveram as patas (sítio de infecção), orelhas, olhos, cavidade oral e pele observadas para a presença de lesões ulcerativas e metastáticas associadas à infecção por *L. amazonensis*. Somente foram considerados positivos para úlceras aqueles que apresentassem lesão aberta em alguma região da derme, e houvesse perda de substância ou extravasamento de linfa, em tecido cutâneo ou mucoso, causando desintegração e necrose.

Para mensuração do edema de pata, cada animal foi manualmente contido e um segundo colaborador tracionou delicadamente a pata posterior direita e a posicionou com a face dorsal (região plantar) em contato com a parte inferior da abertura do paquímetro (Prof/Arco 30mm, *Mitutoyo 7301*) para que a espessura fosse medida (OLIVEIRA *et. al*, 1999). A mensuração foi feita com o paquímetro no prumo em superfície lisa e limpa. Anterior aos experimentos, a base onde as patas encostam no paquímetro foram limpas com lâmina de aço, a fim de remover os substratos que de alguma forma pudessem interferir na dimensão da medida. A pata posterior esquerda também foi mensurada e a diferença entre as duas foi plotada como ‘incremento de lesão’.

Para traçar a curva de mortalidade, os grupos de camundongos mono, coinfectados e livres de infecção foram observados semanalmente durante 15 semanas. Os eventuais casos de óbitos, assim como aqueles animais que demonstraram caquexia extrema, dispneia, piloereção e sinais de apatia foram eutanasiados e computados para a curva de mortalidade.

5.3.2. Avaliação da carga parasitária

5.3.2.1. Estimativa de *L. amazonensis* por diluição limitante

A carga parasitária de *L. amazonensis* foi determinada através da técnica de diluição limitante, descrita por TITUS *et. al.*, (1985), modificada por SILVA *et. al.* (1994). Animais dos grupos coinfectados e monoinfectado por *L. amazonensis*, que foram eutanasiados após 12 e 15 semanas da infecção pelo protozoário, tiveram a pata infectada retirada assepticamente em fluxo laminar, com tesouras e pinças estéreis. Posteriormente, este órgão foi macerado em 1mL de PBS e deixados em repouso por 5 minutos. Com o sobrenadante do macerado foram realizadas diluições seriadas (1:10) em meio de cultura α -MEM. Um volume final de 200 μ L de cada diluição foi plaqueada, em triplicata, em placa de poliestireno de 96 poços, de fundo chato (TPP – 92096, Brasil). Em seguida, estas placas foram incubadas em estufa a 25°C por 7 dias. A análise da presença e crescimento do protozoário foi feita pela observação em microscópio invertido (Digilab – São Paulo, Brasil), sendo considerado como título (medida indireta de concentração do parasito no meio) a última diluição na qual foi observado crescimento de promastigotas.

5.3.2.2. Quantificação dos ovos de *S. mansoni* nas fezes

Para quantificar os ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes de cada camundongo experimentalmente infectado foi utilizado o procedimento descrito por Negrão-Corrêa (2004). Para tanto, camundongos de cada grupo experimental foram individualmente alocados em gaiolas mantidas sem maravalha por dez minutos e as fezes obtidas neste período foram coletadas e pesadas (Bioprecisa – FA2104N, Curitiba, Brasil). As fezes obtidas foram diluídas em 2 ml de solução fisiológica (0,85% NaCl) 4°C e homogeneizadas com um bastão de vidro. Imediatamente o volume do tubo foi acrescido até completar a marca de 5 ml de solução formol tamponado a 10%, resultando na morte e fixação do miracídio no interior dos ovos para realização da contagem. Para a contagem, duas alíquotas de 200 μ L de cada amostra foram analisadas em microscópio óptico (Nickon eclipse E200, New York, USA) e a média do número de ovos por alíquota de fezes foi extrapolado ao número total de ovos por grama de fezes (Equação I).

$$\frac{\bar{x} \cdot 25}{g \text{ (fezes)}} = \text{número de ovos por grama de fezes} \quad (\text{I})$$

5.3.2.3. Recuperação dos vermes adultos pelo sistema porta hepático

Após a retirada de sangue do plexo braquial, os vermes adultos presentes no sistema porta hepáticos dos camundongos infectados com *S. mansoni* foram recuperados e contados, conforme descrito por PELLEGRINO & SIQUEIRA (1956). Para isto, a cavidade abdominal dos animais eutanaziados foi exposta e porção reto-sigmóide foi atada. Uma agulha acoplada a uma bomba de perfusão (Automatic Pippeting Brewer Machine, modelo 60453, B.D) foi introduzida na aorta torácica para a reperfusão do sistema cardiovascular utilizando de uma solução salina a 0,85% contendo 80 U/L de heparina. O líquido contendo os vermes adultos foi extravasado pela veia porta, anteriormente seccionada; assim o produto da reperfusão de cada animal foi recolhido individualmente em um béquer. Com 30 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento submetido a sucessivas lavagens em solução fisiológica. Os vermes recuperados de cada animal foram diferenciados em macho e fêmea e contabilizado com auxílio de uma lupa (**Lupa Zeiss Stemi Dv4, Jena, Alemanha**).

5.3.2.4. Quantificação dos ovos de *S. mansoni* retidos nos órgãos

A estimativa do número de ovos retidos nos tecidos foi realizada utilizando a técnica originalmente descrita por CHEEVER (1968). Após exsanguinação e reperfusão do sistema cardiovascular, o cérebro, pulmão, intestinos, baço e fígado foram pesados (Bioprecisa – FA2104N, Curitiba, Brasil) e digeridos individualmente em solução de hidróxido de potássio (KOH – 5% a 37 °C), por quatro horas, ou até que não se observasse a presença de fragmentos de tecido. O produto da digestão tecidual de cada animal foi transferido para tubos de 15 ml e centrifugados à 100 g por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado por sucção de bomba de vácuo e o sedimento contendo os ovos foi lavado cinco vezes com 14 ml de solução fisiológica. O sedimento final foi ressuspenso em cinco ml de solução fisiológica contendo 10 % de formaldeído e foi armazenado a 4 °C até a contagem dos ovos. Para a contagem, duas alíquotas de 200µL de cada amostra foram analisadas em microscópio

optico (Nickon eclipse E200, New York, USA) e a média do número de ovos por alíquota de órgãos foi multiplicada pelo fator de diluição como descrito na equação II.

$$\bar{x} \cdot 25 = \text{número de ovos por órgão} \quad (\text{II})$$

5.3.2.5. Cálculo da taxa de fecundidade

A taxa de fecundidade foi calculada pela razão do valor da somatória total do número de ovos retidos nos tecidos digeridos pelo número de fêmeas recuperadas com a reperfusão sanguínea de cada animal dos diferentes grupos experimentais e foram expressos como ovos acumulados por fêmea, conforme explicitado na EQUAÇÃO III.

$$\text{Ovos por fêmea} = \frac{\text{ovos retidos totais}}{\text{número de fêmeas}} \quad (\text{III})$$

5.3.2.6. Recuperação e quantificação de esquistossômulos pulmonares

Para avaliar se havia diferença na mortalidade dos esquistossômulos pulmonares no contexto da coinfeção por *L. amazonensis* e *S. mansoni*, um experimento aos moldes do primeiro foi executado. Nesse sentido, sete animais compuseram um grupo LLA+SM, que receberam um inóculo de 1×10^4 promastigotas metacíclicas de cultura na pata posterior direita, e após três semanas de infecção receberam por via subcutânea na região dorsal do ± 500 cercárias; enquanto que, o grupo SM, também composto por 7 animais, recebeu apenas o inóculo com ± 500 cercárias. A justificativa para modificar a quantidade de cercárias nesse experimento é pelo motivo de que, quanto maior o número de cercárias, mais fácil será a quantificação e menor será chance de haver um viés de amostragem.

Dessa maneira, de acordo com método descrito por Barbosa *et. al* (1978), a recuperação dos esquistossômulos pulmonares foi realizada após seis dias de infecção por *S. mansoni*, pico máximo de passagem dos vermes pelos pulmões. Assim, os camundongos foram sacrificados e rapidamente abertos, um a um, para evitar a coagulação intravascular *post-mortem*. Em seguida, a aorta torácica foi seccionada próxima ao miocárdio e aproximadamente 10ml de Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS – pH 7,36 a 36°C)

foi injetada por meio de uma bomba dosadora peristáltica (BP661 Milan – Equipamentos científicos LTDA, Paraná, Brasil) diretamente no ventrículo direito dos animais, até que os pulmões se expandissem grandemente e toda a solução de HBSS fosse então perfundida. Em seguida os animais tiveram seus pulmões extirpados e cortados em fragmentos tão pequenos quanto possíveis e colocados em placa de petri contendo 1 ml de HBSS. O órgão picotado e em meio de cultura foi incubado em estufa à 37°C, à uma pressão parcial de CO₂ de 5% por quatro horas. Após esse período, tanto o conteúdo da reperfusão quanto o líquido que umedecia o tecido pulmonar foi recolhido e submetido à microscopia óptica para inferência da quantidade de esquistossômulos pulmonares, conforme EQUAÇÃO IV.

$$\% \text{ de esquistossômulos pulmonares} = \frac{\text{Esquistossômulos recuperados}}{500} \times 100 \quad (\text{IV})$$

5.3.3. Avaliação do perfil imunohematológico

5.3.3.1. Quantificação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de baço

Para avaliar o perfil de citocinas produzidas por células do baço dos animais dos diferentes grupos experimentais, os esplenócitos de cada camundongo foram isolados e reestimulados *in vitro* com antígenos de *S. mansoni* (SEA) ou de *L. amazonensis* (LTA). Para tanto, animais eutanasiados após 12 e 15 semanas do início do procedimento experimental foram mergulhados em uma solução de álcool iodado e a necrópsia realizada em capela de fluxo laminar. Neste ambiente, a cavidade abdominal de cada animal foi aberta e o baço foi retirado com auxílio de pinça e tesoura estéril, sendo armazenado em tubo contendo meio líquido (RPMI 1640, pH 7,4 – *Sigma-Aldrich* com adição de L-glutamina) até o momento de obtenção das células.

Inicialmente o baço foi dissociado mecanicamente, pela compressão entre lâminas de vidro foscas e o material processado foi recuperado em placa de Petri estéril (J. Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Para completa dissolução do tecido e remoção dos fragmentos da cápsula esplênica, o material processado foi filtrado com auxílio de uma peneira de 70 µm (BD Falcon, 352350, USA) e os eritrócitos presentes na solução celular foram lisados com breve incubação em água destilada filtrada seguida da adição de PBS para tornar a solução isotônica. A solução celular foi centrifugada (300 g por cinco minutos) e o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de meio RPMI 1640 completo (meio RPMI 1640

suplementado com 10% de FBS (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), 15 mM de HEPES, 60 mg/L de gentamicina, 100U/ml de penicilina e 100µL/ml de estreptomicina) para contagem das células em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado para 1×10^7 células/ml de meio RPMI 1640 completo e 100 µL da solução de esplenócitos de cada animal dos diferentes grupos foram plaqueados, em triplicata, em placa de cultura de 96 poços (COSTAR, PP – 3595, Corning, NY, EUA) e cultivados à 37°C por 48 horas em meio RPMI 1640 completo, ou em meio completo suplementado com 10µg antígeno *SEA* ou com 10µg antígeno *SLA*. Após o período de cultivo, as placas foram centrifugadas e o seu sobrenadante recolhido armazenado e a -20°C (período máximo de armazenamento de um mês) para quantificação de citocinas.

A quantificação de citocinas foi realizada através da técnica de ELISA Sanduíche, utilizando kits comercialmente disponíveis (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN) para quantificar IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β, IFN-γ de camundongos, seguindo as instruções do fabricante.

5.3.3.2. Quantificação de citocinas e quimiocinas no tecido hepático e pulmonar

Para estimar a produção de citocinas nos tecidos afetados, 100mg do lobo esquerdo hepático ou 50mg de pulmão de cada camundongo dos diferentes grupos experimentais contendo animais infectados foram colocados em 1 ml de tampão fosfato contendo inibidores de proteases (0,5 % Tween 20; 0,5% BSA; 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonila; 0,1mM de cloreto benzetônico; 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina) e individualmente homogeneizados com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). O homogenato resultante deste processo foi centrifugado por 10 min a 3000 g a 4°C e o sobrenadante foi recolhido, alíquotado e imediatamente congelado a - 20°C (período máximo de armazenamento de um mês) para posterior quantificação das citocinas e quimiocinas, INF-γ, TNF-α, TGF-β, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17; IL-22 IL-33, CCL5, CCL17, CCL24 e CXCL2 utilizando kits comercialmente disponíveis (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN) conforme detalhado por Negrão-Corrêa et al. (2004). O sedimento restante foi processado para quantificar atividade enzimática de peroxidase de eosinófilo (EPO) e mieloperoxidase (MPO), descritas a seguir.

5.3.3.3. Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como medida indireta da infiltração de neutrófilos no parênquima pulmonar e hepático. O ensaio foi conduzido conforme descrito por Bayle (1988) e modificado por Barcelos *et al.* (2005). Com o *pellet* oriundo do processo de extração de citocinas do tecido hepático e pulmonar, eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de 1 ml de salina 0,2% seguida de 1ml de salina 1,6% contendo 5% de glicose. As amostras foram homogeneizadas e o homogenato dividido em 2 microtubos (uma parte para EPO e outra para o ensaio de MPO).

Após a segregação, as amostras destinadas ao ensaio de atividade MPO tiveram o *pellet* ressuspensão em 200 µl de tampão fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7). A solução foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 3000 g por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi homogeneizado novamente em vortex com tampão (0,05 M NaPO₄ pH 5,4, sucedido de 0,5 % HTAB). Os microtubos com estas amostras foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 g a 4°C e o sobrenadante utilizado para realização do método colorimétrico. Para o ensaio colorimétrico, 25 µl da amostra foram plaqueados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) contendo 25 µl de substrato (3,3'- 5,5' – tetramethylbenzine – TMB diluído em dimetilsulfóxido – DMSO na concentração final de 1,6 mM). Posteriormente, foi feita a incubação a 37 °C por cinco minutos em estufa seca. Em seguida, 100µl da solução contendo 0,5 mM de H₂O₂ diluído em tampão fosfato (0,05 M de Na₃PO₄, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) foram adicionados e incubados a 37°C por mais cinco minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de solução 1M de H₂SO₄ e quantificada através da absorbância em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda 450nm.

5.3.3.4. Dosagem de peroxidase de eosinófilo (EPO)

A quantificação dos níveis de EPO no pulmão e fígado foram utilizados como uma forma indireta de medir a eosinofília tecidual induzida pelo parasito. Este ensaio foi conduzido da maneira descrita por Strath *et. al* (1985) e modificado por Silveira *et. al* (2002).

As amostras destinadas a quantificação de EPO foram centrifugadas a 3000 g a 4° C e o sobrenadante foi desprezado assim como descrito para MPO. O sedimento foi ressuspenso em 950 µl de PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB - Sigma). As amostras também passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, centrifugadas a 3000 x g a 4°C por dez minutos e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático, sendo, 75 µl de cada amostra foram adicionadas a 75 µl da solução do substrato (tampão tris-HCL pH 8,0 contendo 1,5 mM o-fenilenodiamina-OPD e 6,6 mM de H₂O₂). Após a revelação de cor, a reação foi cessada pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 4N. As amostras foram submetidas a emissão de um feixe de luz de 492 nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) para medir a sua absorbância

5.3.3.5. Dosagem de N-acetilglicosamidade (NAG)

A N-acetilglicosaminidase é uma enzima presente nas células mononucleares do sistema imune, a dosagem da atividade desta enzima nos tecidos proporciona uma estimativa indireta do recrutamento de macrófagos para um dado órgão (GREEN *et al.* 1980). Sendo assim, esta pode ser utilizada para aferir a infiltração de macrófagos em um parênquima específico, na qual a reatividade cruzada com enzimas de neutrófilos é mínima. Este ensaio foi inicialmente descrito por Barcelos *et al.* (2005) e seguimos as orientações dos autores para a realização do mesmo.

As amostras de fígado (100mg) e pulmão (50mg) foram processadas em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) em tampão de extração enzimática (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂EDTA 0,015M pH 4,7). O material foi centrifugado a 3000 g a 4°C por dez minutos. O sobrenadante foi então descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de solução hipotônica 750 µl de NaCl 0,2% e após 30 segundos, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de 750 µl de NaCl 1,6% contendo glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas (3000 g a 4°C por dez minutos) e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 1,0 ml de solução salina (0,9 % de NaCl) contendo 0,1% de Triton x-100 (Sigma Aldrich, Brasil).

Este ensaio foi feito em placa de poliestireno de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA), na qual foram plaqueados 100µL do sobrenadante de cada amostra,

em duplicata, juntamente com 100 µL de tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5) contendo 0,767 g/ml de p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosamina (Sigma Chemical Co). As placas foram incubadas a 37° C por dez minutos e o produto final foi gerado pela adição de 100 µl de tampão glicina (Glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M pH 10,6). A absorbância foi quantificada em leitor de ELISA (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda igual a 400 nm.

5.3.4. Análise Patológica

5.3.4.1. Hemograma

Para analisarmos comparativamente os parâmetros hematimétricos, coletamos sangue total na 11^a e 15^a semana do protocolo inicial, dos grupos mono infectados, co infectados e livre de infecção. Assim como descrito no delineamento experimental, o sangue destes animais foi coletado após a anestesia, seguida da secção dos vasos do plexo axilar e coletado com uma pipeta de Pasteur embebida em EDTA, o sangue total do animal, foi acondicionado em tubos *vacutainer* (K3 – KASVI - São José do Pinhais – PR, Brasil) de 5ml. O sangue total dos animais foi analisado de forma automatizada pelo aparelho ABC-VET – ANIMAL (*AUTOMATIC BLOOD COUNTER*), gentilmente cedido para uso pelo Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – ICB/UFMG; e os parâmetros hematimétricos, assim como a sua celularidade, foram contemplados. Os parâmetros obtidos pela leitura foram: contagem de células vermelhas e hemoglobina.

5.3.4.2. Determinação plasmática de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

Para avaliação indireta da lesão hepática foi realizado a determinação da atividade de AST e ALT no plasma dos animais dos diferentes grupos experimentais utilizando testes comercialmente disponíveis e o procedimento seguiu as instruções do fabricante (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Em síntese, primeiro preparou-se a curva de calibração contendo concentrações conhecidas de cada padrão enzimático, em tubos de hemólise, devido ao grande volume necessário. Para a determinação da atividade enzimática nas amostras, foram plaqueados 25µl do substrato de AST (tampão 67 mmol/L, pH 7,4; ácido α-cetoglutarato 2,0

mmol/L; ácido L-aspartico, 99 mmol/L, e azida sódica 15,4 mmol/L) ou de ALT (tampão 67 mmol/L, pH 7,4; ácido α -cetogluturato 2,0 mmol/L; ácido L-alanina, 100 mmol/L, e azida sódica 15,4 mmol/L) e incubados a 37°C por dois minutos. Posteriormente, 5 μ l da amostra ou da curva padrão foi então adicionada a placa, homogeneizada e incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 25 μ l do reagente de cor de AST (2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L) ou de ALT (2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L) foram acrescentados à mistura que foi homogeneizada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos, seguido da adição de 250 μ l de (1,25mol/L) hidróxido de sódio. Esta mistura foi homogeneizada por aspiração e expiração em pipetador e permaneceu por 5 minutos em temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi feita em comprimento de onda de 540nm para AST e 505 nm para ALT, em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) e os valores de absorvância obtidos nas amostras foram interpolados com os dados da curva padrão

5.3.4.3. Hidroxiprolina

Para a determinação indireta da deposição de colágeno (REDDY & ENWEMEKA 1996), por dosagem de hidroxiprolina, foram coletados 100 mg do lobo caudado do fígado. O tecido foi homogeneizado (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) em salina (0,9% NaCl) e liofilizado (Liotop K105, Brasil). O ensaio foi conduzido com 20 mg do liofilizado, esta amostra foi submetida a hidrólise alcalina (1ml de NaOH à 2N) e autoclavadas a 120°C por 20 minutos. Logo em seguida, uma alíquota de 50 μ l do hidrolisado foi adicionado a 450 μ l do reagente oxidante de cloramina T (cloramina T 0,056 M, N-propanol 10% em tampão acetato/citrato pH 6,5) e incubado por 20 minutos para que a oxidação se totalizasse. Uma curva padrão com a maior concentração de 400 μ g de hidroxiprolina foi preparada da mesma maneira.

A reação colorimétrica foi iniciada pela adição do reagente de Ehrlich (1 M de p-dimetilaminobenzaldeído diluído em N-propanol/ácido perclórico 2:1 v/v). As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 1500 g a 4°C. O ensaio foi feito com 200 μ l do sobrenadante de cada amostra em uma placa de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) e lida a absorvância no comprimento de onda de 550 nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

5.3.4.4. Percentual de peso hepático

O percentual de peso hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais foi estimado através da relação entre peso do órgão e o peso total do animal. Para isso, os animais foram pesados normalmente objetivando o acompanhamento ponderal semanal para análise de evolução da morbidade. No dia da eutanásia, os fígados dos animais foram retirados com auxílio de tesoura e pinça e o órgão foi pesado em balança analítica (Bioprecisa – FA2104N, Curitiba, Brasil). O peso do órgão foi então dividido pelo peso total do animal na semana correspondente a eutanásia (EQUAÇÃO IV); os resultados foram expressos em % de peso hepático.

$$\% \text{ de peso hepático} = \frac{\text{peso hepático}}{\text{peso ponderal total}} \times 100 \quad (\text{IV})$$

5.3.4.5. Análise Histopatológica

O lobo maior do fígado (esquerdo) foi utilizado para avaliar as alterações histopatológicas induzidas pelas infecções experimentais. Para isso, este órgão foi retirado, fixado em formalina tamponada por 24 horas, seguida por lavagem e hidratação por três horas em água corrente e finalmente conservado em álcool 70% até o seu processamento. Posteriormente, todo o material passou por uma desidratação progressiva em séries crescentes de álcool (70° GL a absoluto), clarificado em diluições crescentes de xilol e incluído em parafina. Depois de enrijecida a parafina, os blocos foram submetidos a cortes de 4-5 µm de espessura em micrótomo. Estes cortes foram estendidos em banho maria 40°C, pescados em lâminas de vidro e identificadas. Depois de secagem, desparafinização e reidratação, o tecido foi corado com hematoxilina-eosina (JUNQUEIRA *et al.* 1979) para observação do infiltrado inflamatório e lesões provocadas pela infecção.

O tecido corado também foi utilizado para estimar a área dos granulomas presentes no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais. Para esta finalidade, as imagens do tecido foram capturadas por uma câmera digital (Olympus DP12) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX41) e analisadas pelo *software* Image Pro-plus 4.0. De cada lâmina, contendo tecido de um animal foram capturadas imagens de 4-12 granulomas formados por um único ovo central com mirácido. Granulomas coalescentes, isto é, aqueles

nos quais é possível observar mais do que um ovo, ou granulomas no qual o ovo não era visível, ou destruído, foram excluídos da análise.

5.3.5. Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram tabulados no *Software* Microsoft Excel 2016 e tratados para *outliers* pelo Software Graphpad versão 8 com valor de erro α 0,05 utilizando o teste de ROUT. Após tratamento os dados foram submetidos as análises estatísticas. Inicialmente os dados foram submetidos a um Teste de Normalidade (teste de Kolmogorov-Sirnov). Aquele grupo de dados identificados como paramétricos foram apresentados como média \pm erro padrão, sendo que a comparação entre os grupos foi realizada pelo Teste T Student, quando comparado apenas dois grupos, ou análise de variância (One-way ANOVA) para múltiplas comparações, seguidos de pós teste de Tukey. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao Teste Mann-Whitney e representados pela média \pm erro padrão; para múltiplas comparações foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Tukey. Para aquelas análises com mais de três grupos experimentais e mais de duas variáveis foi utilizado o teste Two-Way (ANOVA). O intervalo de confiança foi fixado em 95% e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Para a curva de mortalidade foi feito o teste de Log-rank (Mantel-Cox), no qual cada perda de segmento foi considerada um evento.

6. RESULTADOS

6.1. Aspectos clínicos e evolução da morbidade da Leishmaniose Tegumentar e Esquistossomose nos animais coinfectedados

Com relação as alterações clínicas associadas a Leishmaniose Tegumentar, foi avaliado aparecimento e a intensidade do edema plantar durante as 15 semanas de experimento (FIGURA 12A). Em camundongos BALB/c monoinfectados por *L. amazonensis* foi verificado aumento progressivo da espessura da pata infectada após a 9^a semanas de infecção pelo protozoário. Em camundongos coinfectedados por *S. mansoni*, a infecção por *L. amazonensis* resultou em aumento significativo da espessura da pata infectada somente após a 11^a semana de infecção pelo protozoário. Mesmo a infecção pelo *S. mansoni* ocorrendo após o estabelecimento do protozoário, o edema de pata nos camundongos coinfectedados foi significativamente menor que nos monoinfectados por *L. amazonensis* a partir da 10^a semana do protocolo experimental ($p < 0,00034$), e esta diferença se intensificou até o fim do protocolo experimental ($p < 0,0001$), quando a espessura da pata dos animais monoinfectados por *L. amazonensis* foi cerca de três vezes maior que nos coinfectedados, conforme ilustrado na FIGURA 12C-D.

Também foi avaliado o surgimento de úlceras plantares no sítio de infecção por *L. amazonensis*. Nos animais coinfectedados ocorreu o aparecimento das úlceras durante a 8^a semana de infecção pelo protozoário, o mesmo tempo observado nos apenas infectados por *L. amazonensis* ($p = 0,4783$) (FIGURA 12B).

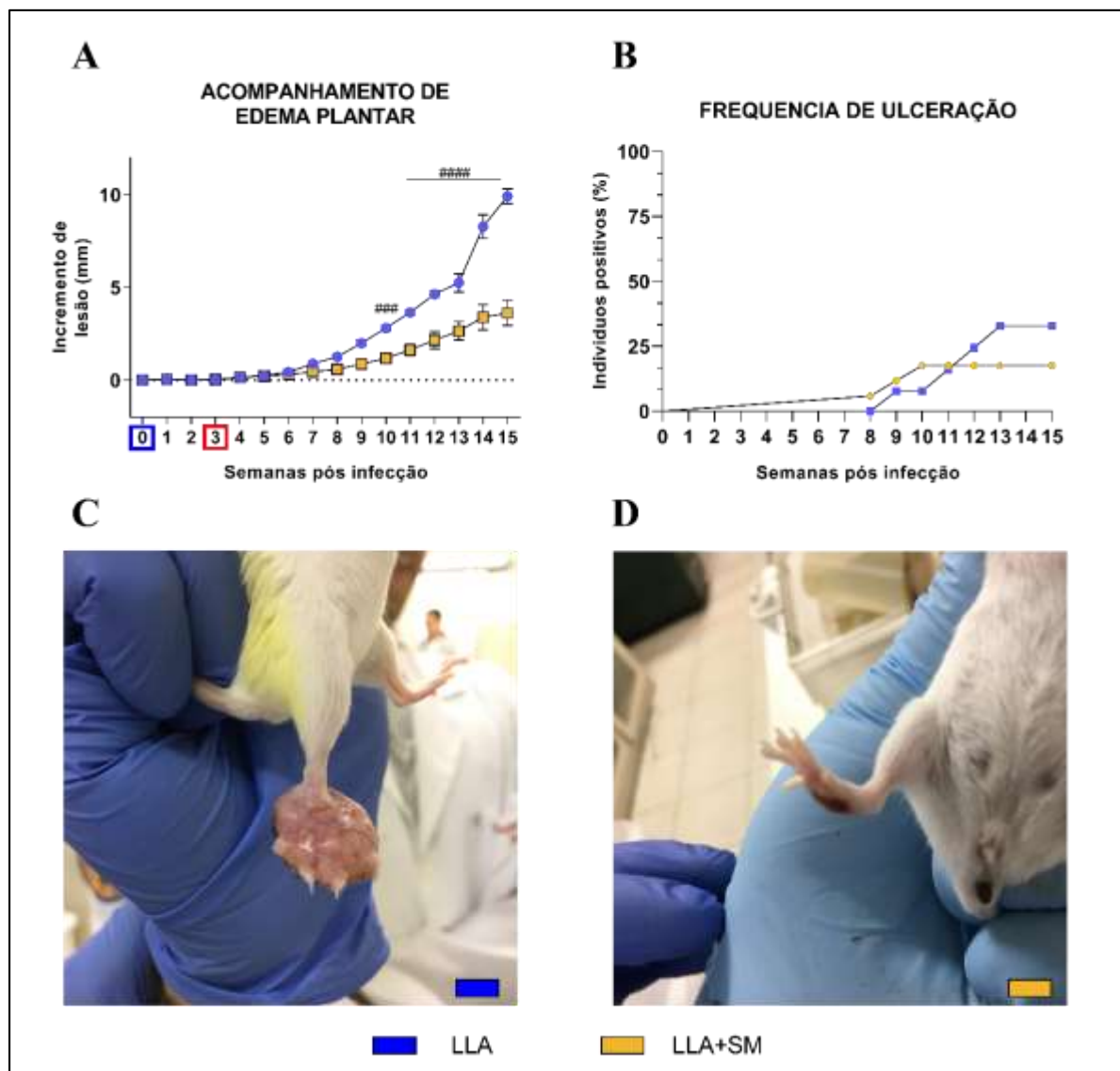


Figura 12 – Evolução do edema plantar e frequência de lesões ulcerativas de Leishmaniose Tegumentar em camundongos mono infectados por *L. amazonensis* (LLA) e co infectados com *L. amazonensis* e *S. mansoni* (LLA+SM). A: Diferença da espessura da pata infectada em relação a pata não infectada de camundongos mono infectados por *L. amazonensis* e camundongos infectados por *L. amazonensis* e co infectados por *S. mansoni* após 3 semanas da infecção pelo protozoário. Os resultados foram expressos em milímetros (mm), média \pm erro padrão (One-way ANOVA - Tukey's multiple comparisons test) #### representa $p > 0,001$ e ##### $p < 0,0001$ quando comparado ao mono infectado por *L. amazonensis*). B: Acompanhamento da taxa de ulceração das lesões cutâneas de animais mono infectados por *L. amazonensis* e de animais co infectados, no qual cada ponto de inclinação representa um evento (Log-rank - Mantel-Cox). C- Figura ilustrativa da pata direita de camundongo mono infectado por *L. amazonensis* na 15ª semana do protocolo experimental e D- Figura ilustrativa da pata direita de camundongo co infectados por *L. amazonensis* e *S. mansoni* na 15ª semana do protocolo experimental. O quadrado azul indica o momento no qual foi feita a infecção por *L. amazonensis* e o quadrado vermelho indica o momento da infecção por *S. mansoni*.

O acompanhamento semanal do peso corporal dos animais experimental mostrou que camundongos mono infectados por *L. amazonensis* tiveram um aumento progressivo de peso durante as 8 primeiras semanas do procedimento experimental e a partir deste período mantiveram o peso até o final do experimento. Em contraste, camundongos mono infectados

por *S. mansoni* não apresentaram ganho de peso durante as 8 primeiras semanas do protocolo experimental, no entanto entre a 9^a e 11^a semana do protocolo experimental (que corresponde a 7-9 semanas da infecção por *S. mansoni*) houve gradativa perda de peso que foi parcialmente recuperada durante a fase crônica da Esquistossomose. Interessantemente, os animais coinfectados apresentaram um perfil de ganho de peso semelhante aos monoinfectados com *L. amazonensis*, com aumento progressivo de massa corporal até a 7^a semana do início do protocolo experimental. Desta forma, a cinética de ganho de peso dos animais coinfectados foi significativamente diferente ($p < 0,0001$) quando comparado aos monoinfectados por *S. mansoni* (FIGURA 13 A).

Embora seja clara a diferença na evolução do ganho de massa corporal entre os diferentes grupos, a taxa de sobrevivência de camundongos foi semelhante nos diferentes grupos. Os animais coinfectados e monoinfectados por *S. mansoni* apresentaram ambos 10% de mortalidade na fase crônica da Esquistossomose ($p = 0,2443$), sendo que nos monoinfectados por *S. mansoni* a mortalidade ocorreu entre a 11^a e 12^a, enquanto que os coinfectados apresentaram mortalidade entre a 13^a e 14^a semana do protocolo experimental (FIGURA 13 B).

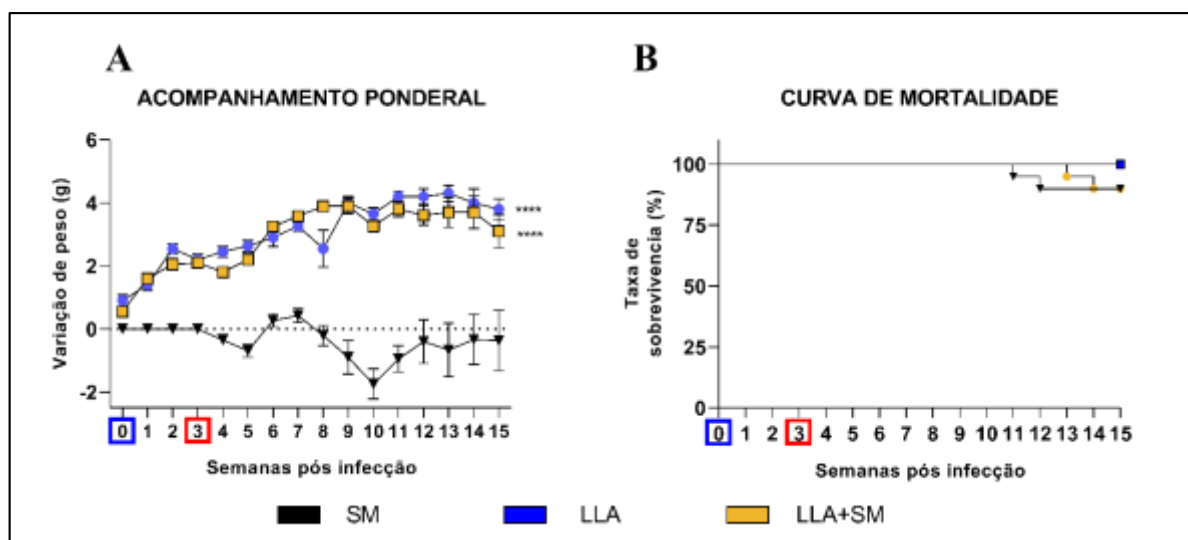


Figura 13 – Acompanhamento ponderal e taxa de mortalidade de camundongos monoinfectados por *L. amazonensis* (LLA) ou *S. mansoni* (SM), e coinfectados com *L. amazonensis* e *S. mansoni* (LLA+SM). A: Acompanhamento da variação semanal peso em relação ao peso inicial, em gramas (g), dos animais dos diferentes grupos experimentais; os resultados foram expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA - Tukey's multiple comparisons test; **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*). **B:** Acompanhamento da taxa de mortalidade nos diferentes grupos experimentais, no qual cada ponto de declínio representa um evento de mortalidade (Log-rank - Mantel-Cox). Os dados apresentados foram reprodutíveis em três infecções distintas com $n=10$ animais. O quadrado azul indica o momento no qual foi feita a infecção por *L. amazonensis* e o quadrado vermelho indica o momento da infecção por *S. mansoni*.

Como marcador de anemia estimamos o número de eritrócitos e a concentração global de hemoglobina no sangue total colhido dos diferentes grupos experimentais durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose. Os animais apenas infectados com *S. mansoni* apresentam, durante a fase aguda da Esquistossomose, concentrações significativamente reduzidas de eritrócitos em relação aos não infectados. Os animais monoinfectados por *L. amazonensis* e coinfectados também possuem número de eritrócitos estatisticamente superiores aos monoinfectados por *S. mansoni*, mas ainda assim são semelhantes aos dos animais não infectados (FIGURA 14A). Durante a fase crônica, os animais monoinfectados por *S. mansoni* recuperam o número de eritrócitos a um limiar de normalidade, no entanto ainda continuam inferiores aos encontrados nos animais monoinfectados por *L. amazonensis* (FIGURA 14A).

No que se refere as concentrações globais de hemoglobina, durante a fase aguda da Esquistossomose os animais monoinfectados por *S. mansoni* também apresentam níveis reduzidos de hemoglobina em relação aos encontrados nos animais não infectados, e esta redução também permanece quando estes são comparados aos animais monoinfectados por *L. amazonensis* e coinfectados (FIGURA 14B). Estes dados indicam que a coinfeção com *L. amazonensis* reduziu a anemia induzida na fase aguda da Esquistossomose. Já na fase crônica, os animais monoinfectados por *S. mansoni* aumentaram seus níveis de hemoglobina em 51%; esta concentração de hemoglobina não foi somente maior que os níveis encontrados nos monoinfectado por *L. amazonensis*, mas foi superior também a concentração de hemoglobina detectada nos animais do grupo controle não infectados (FIGURA 14 B).

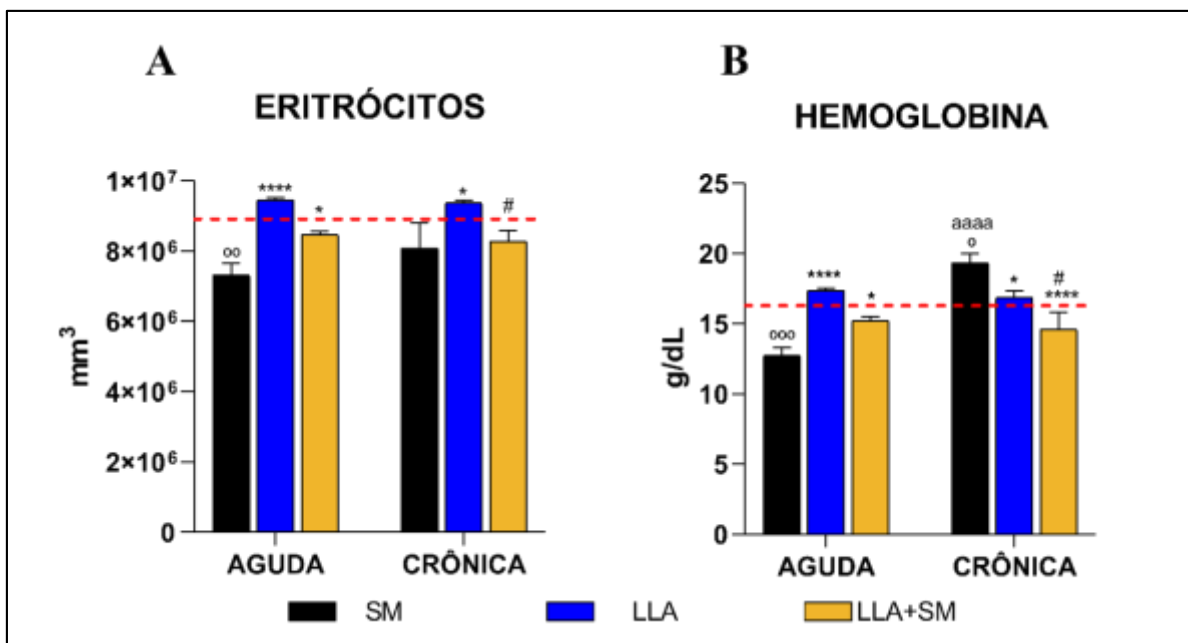


Figura 14 – Perfil hematimétrico de camundongos mono infectados por *L. amazonensis* (LLA) ou *S. mansoni* (SM), e co infectados com *L. amazonensis* e *S. mansoni* (LLA+SM) durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose. A: número de eritrócitos em sangue total de animais mono infectados com *L. amazonensis*, mono infectados com *S. mansoni* ou co infectados. B: Concentração de hemoglobina em sangue total de animais mono infectados com *L. amazonensis*, mono infectados com *S. mansoni* ou co infectados; resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA - Tukey's multiple comparisons test). ° representa $p < 0,05$; °° representa $p < 0,01$, °°° representa $p < 0,001$ quando comparado aos animais controle; * representa $p < 0,05$; **** representa $p > 0,0001$ quando comparado ao mono infectado por *S. mansoni*; # representa $p < 0,05$ quando comparado ao mono infectado por *L. amazonensis*; aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais do mesmo grupo experimental entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose. Linha pontilhada representa a média de eritrócitos ou hemoglobina encontrada nos animais controle não infectados.

Sabendo que a maioria dos ovos não eliminados são embolizados, via corrente sanguínea, e encalham principalmente no parênquima hepático, induzindo um processo inflamatório crônico associado a gravidade da Esquistossomose, o peso do órgão e as alterações bioquímicas referentes ao tecido hepático também foram analisados; de forma a caracterizar indiretamente a intensidade dos danos induzidos pelos ovos do parasito.

O peso hepático de animais não infectados e sem nenhum comprometimento neste órgão equivale a aproximadamente 4,5% da massa corporal do animal. Os animais mono infectados por *L. amazonensis* não apresentaram variação significativa do peso deste órgão em relação aos animais não infectados. Entretanto, a infecção por *S. mansoni* nos animais mono e co infectados pelo trematódeo resultou em aumento substancial no peso relativo do órgão na fase aguda, sendo verificado que o fígado destes animais foi duas vezes maior que a porcentagem observada nos animais não infectados ou mono infectados por *L. amazonensis* (FIGURA 15 A). Com a progressão da Esquistossomose para fase crônica, foi detectado uma redução do peso relativo do fígado em relação à fase aguda nos animais

monoinfectados ($p=0,0574$), possivelmente em decorrência da modulação da inflamação hepática; no entanto, esta tendência de redução do peso hepático na fase crônica da Esquistossomose não foi detectada nos animais coinfectedos (FIGURA 15 A).

Os níveis plasmáticos basais da enzima AST em camundongos BALB/c é de aproximadamente 40U/L; todos os grupos de animais infectados experimentalmente apresentaram níveis mais elevados que os animais controles não infectados, mas durante a fase aguda da Esquistossomose, somente os animais monoinfectados demonstraram atividade desta enzima estatisticamente superiores ao grupo controle. Já na fase crônica os animais mono e coinfectedos pelo *S. mansoni* revelaram valores de AST significativamente superiores aos animais controle. (FIGURA 15B). Analogamente a análise da AST, a atividade plasmática de ALT, cujos níveis basais apresentam concentração de 20 U/L de plasma, também teve aumento significativo nos animais mono e coinfectedos por *S. mansoni*, ambos os grupos apresentaram sete vezes mais atividade plasmática desta enzima que os animais controles não infectados, e três vezes mais que os animais apenas infectados por *L. amazonensis*. Entretanto, a atividade de ALT no plasma de camundongos monoinfectados por *L. amazonensis* não foi significativamente maior que nos controles não infectados e, portanto, menor que nos animais mono e coinfectedos por *S. mansoni* (FIGURA 15C).

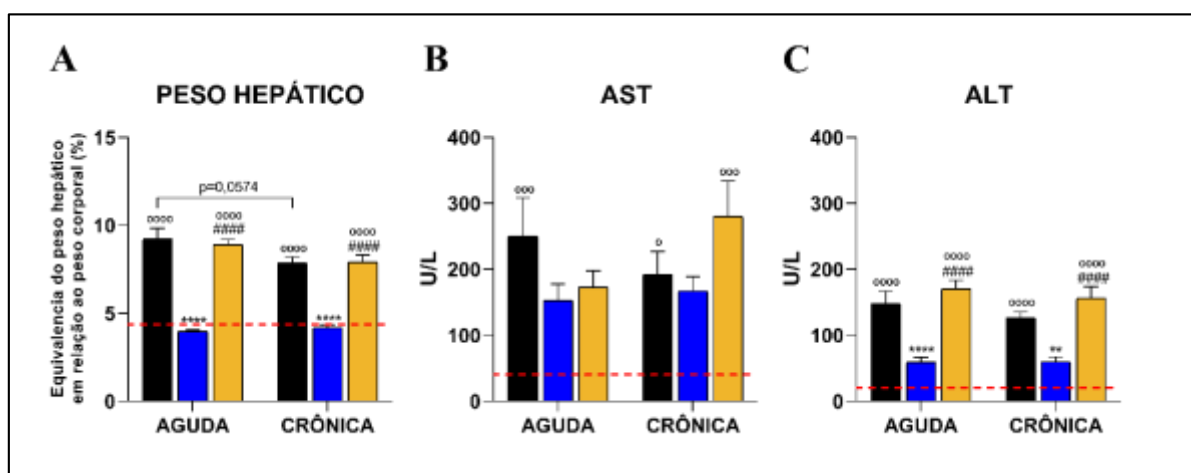


Figura 15 – Peso relativo do fígado e concentração plasmática de transaminases em camundongos monoinfectados por *L. amazonensis* ou *S. mansoni*, e coinfectedos com *L. amazonensis* e *S. mansoni* durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose. A: Percentual do peso do fígado em relação ao peso corporal de animais monoinfectados por *L. amazonensis*, *S. mansoni* e coinfectedos. B: Níveis plasmáticos de Aspartato Aminotransferase (AST) nos animais monoinfectados por *L. amazonensis*, *S. mansoni* ou coinfectedos. C: Níveis plasmáticos de Alanina Aminotransferase (AST) nos animais monoinfectados por *L. amazonensis*, *S. mansoni* ou coinfectedos. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA - Tukey's multiple comparisons test). $^{\circ}$ representa $p < 0,05$ quando comparado a animais controles não infectados, $^{\circ\circ\circ}$ representa $P < 0,001$, $^{\circ\circ\circ\circ}$ representa $p < 0,0001$; ** representa $p < 0,01$ quando comparado ao

monoinfectado por *S. mansoni*; *** representa $p > 0,001$; ##### representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *L. amazonensis*. Linha pontilhada representa média dos resultados encontrados em animais não infectados.

6.2. Carga parasitária

A carga parasitária relacionada a infecção por *S. mansoni* foi estimada pelo número de ovos eliminados nas fezes e retidos nos tecidos, bem como pelo total de vermes recuperados da circulação, enquanto que a intensidade da infecção por *L. amazonensis* foi estimada por diluição limitante de homogenato de pata.

A quantificação da carga parasitária de *L. amazonensis* determinada por diluição limitante revela que os animais coinfetados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto a concentração de parasitos na pata infectada em comparação aos animais monoinfectados por *L. amazonensis*, nos dois períodos examinados. Também foi observado que apenas os animais monoinfectados por *L. amazonensis* demonstraram aumento na carga parasitária, da fase aguda em relação a fase crônica da Esquistossomose (FIGURA 16).

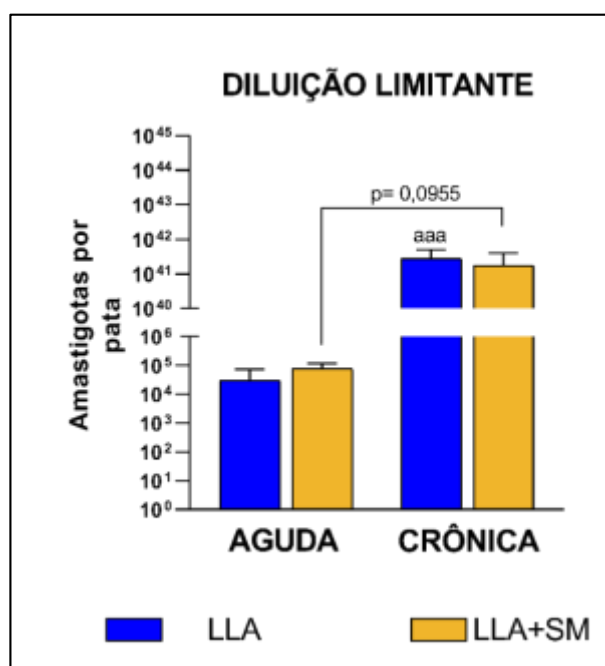


Figura 16. Carga parasitária de *L. amazonensis* (LLA) em camundongos monoinfectados por *L. amazonensis* e coinfetados com *L. amazonensis* e *S. mansoni* (LLA+SM). Estimativa da concentração de amastigotas encontradas em lesão plantar de animais monoinfectado por *L. amazonensis* ou coinfetados. Resultados expressos em Log (Kruskal-Wallis test multiple comparisons test). aaa representa $p < 0,001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose

Como detalhado na tabela 3, o perfil de eliminação de ovos de *S. mansoni* nas fezes dos animais monoinfectados foi semelhante ao encontrado nos animais coinfectados, sendo verificado que o período pré-patente em ambos os grupos experimentais ocorreu antes de 43 dias de infecção, quando 45 e 60% dos animais apresentaram ovos nas fezes. Entretanto, durante a nona semana de infecção por *S. mansoni* (12^a semana do protocolo experimental), foi observado que os animais coinfectados eliminaram mais ovos nas fezes quando comparados aos monoinfectados ($p=0,0455$).

Tabela 3. Acompanhamento de patência, comparação da frequência de positividade e número de ovos eliminados nas fezes de animais mono infectados com *S. mansoni* (SM) e coinfetados por *L. amazonensis* e *S. mansoni* (LLA+SM).

<i>Tempo de Infecção por S. mansoni</i>	<i>Grupo</i>	<i>Mediana (IIQ25% - IIQ75%)</i>	<i>Valor de P*</i>	<i>Frequencia % (n)</i>	<i>Valor de p**</i>
39° DPI (Semana 5)	SM	0 (0 – 0)	-	0% (0/20)	-
	LLA + SM	0 (0 – 0)		0% (0/20)	
40° DPI (Semana 5)	SM	0 (0 – 0)	-	0% (0/20)	
	LLA + SM	0 (0 – 0)		0% (0/20)	
41° DPI (Semana 5)	SM	0 (0 – 0)	-	0% (0/20)	
	LLA + SM	0 (0 – 0)		0% (0/20)	
42° DPI (Semana 6)	SM	0 (0 – 0)	-	0% (0/20)	
	LLA + SM	0 (0 – 0)		0% (0/20)	
43° DPI (Semana 6)	SM	0 (0 – 443,3)	0,9241	45% (09/20)	
	LLA + SM	0 (0 – 439,6)		60% (12/20)	
49° DPI (Semana 7)	SM	353,6 (0 - 2085)	0,3543	65% (13/20)	
	LLA + SM	138,3 (0 – 338,4)		70% (14/20)	
56° DPI (Semana 8)	SM	0 (0 – 121,5)	0,0647	78,9%(15/19)	
	LLA + SM	124,1 (0 – 371)		85% (17/20)	
63° DPI (Semana 9)	SM	262,6 (0 – 662,1)	0,0455*	100% (18/18)	
	LLA + SM	513,3 (319,4 – 793,7)		100% (19/19)	
70° DPI (Semana 10)	SM	0 (0 – 143,2)	0,3030	100% (18/18)	
	LLA + SM	0 (0 – 279)		100% (18/18)	

*Análise da eliminação de ovos feita pelo cálculo de test T, e **análise da frequência feita pelo teste de Fisher. DPI – Dias pós infecção por *S. mansoni*.

Na fase aguda da Esquistossomose (8 semanas da infecção por *S. mansoni* e 11 semanas da infecção por *L. amazonensis*), foram recuperados $14 \pm 3,52$ vermes da circulação de camundongos mono-infectados e $8 \pm 3,58$ de camundongos coinfetados, valor que representa uma diminuição significativa de vermes nos animais coinfetados em relação aos somente infectados por *S. mansoni* ($p=0,0008$). Entretanto, na fase crônica da Esquistossomose (15 semanas do início do protocolo experimental), não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao número de parasito recuperados de camundongos mono e coinfetados com *L. amazonensis* ($p=0,6144$). Também é importante

salientar que a redução significativa de vermes recuperados na fase crônica em comparação à fase aguda detectada em camundongos BALB/c mono infectados ($p < 0,0001$) não foi verificada nos camundongos coinfetados, no qual o número de vermes recuperados na fase aguda foi semelhante ao recuperado na fase crônica da Esquistossomose (FIGURA 17 A). Já a contagem de ovos eliminados nas fezes e retidos no fígado indica que animais coinfetados por *L. amazonensis* e *S. mansoni* possuem um maior número de ovos em relação aos mono infectados (FIGURA 17 B e C), especialmente na fase crônica da Esquistossomose, no qual este aumento foi estatisticamente significativo ($p = 0,0301$) em relação aos ovos acumulados no tecido hepático (FIGURA 17C).

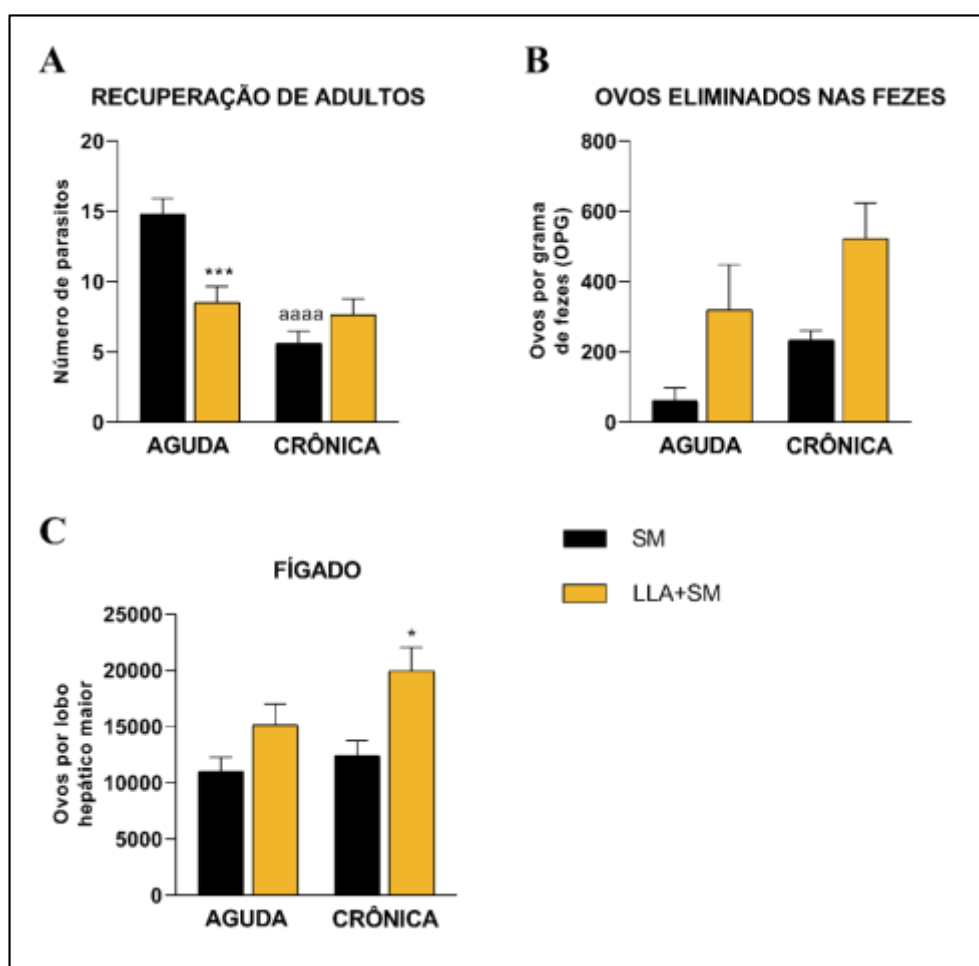


Figura 17. Avaliação da carga parasitária de *S. mansoni* (SM) em camundongos mono infectados pelo trematódeo e coinfetados com *L. amazonensis* (LLA+SM). A: Número de vermes adultos recuperados durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose em animais mono infectados por *S. mansoni* e coinfetados. B: Numero de ovos eliminados nas fezes de animais mono infectados por *S. mansoni* e coinfetados C: Número de ovos retidos durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose em animais mono infectados por *S. mansoni* e coinfetados. Resultados expressos por média \pm erro padrão (One-way ANOVA - Tukey's multiple comparisons test). * representa $p < 0,05$ e *** representa $p < 0,001$ quando comparado ao mono infectado por *S. mansoni*. aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Os dados obtidos com a digestão de diferentes órgãos recuperados de animais infectados (Tabela 4) revelam que camundongos monoinfectados com *S. mansoni* não apresentaram ovos no cérebro na fase aguda da infecção e em apenas um animal foi recuperado ovo do trematodeo na fase crônica da Esquistossomose. Nos camundongos coinfectados, apesar de não ocorrer diferença significativa na frequência daqueles com ovos no cérebro ou na quantidade de ovos recuperados, vale mencionar que 20% dos animais coinfectados já apresentavam ovos do parasito no cérebro durante a fase aguda da Esquistossomose.

Também foi verificado que, durante a fase crônica da Esquistossomose, o número de ovos recuperados nos pulmões e baço de camundongos coinfectados por *S. mansoni* e *L. amazonensis* foi significativamente maior em relação aos monoinfectados. Além disso, nesta fase da infecção todos os camundongos coinfectados apresentaram ovos nos pulmões, enquanto que somente 75 % dos monoinfectados tinham ovos nos pulmões, sendo que a diferença na frequência de animais com ovos nos pulmões foi estatisticamente significativa. Por outro lado, o número de ovos encontrados no intestino dos camundongos monoinfectados e coinfectados foi estatisticamente semelhante, tanto na fase aguda como na fase crônica da Esquistossomose, conforme detalhamento na tabela 4.

Tabela 4. Comparação do número de ovos encontrados no cérebro, pulmões, baço e intestinos de animais monoinfectados com *S. mansoni* e coinfectados por *L. amazonensis* e *S. mansoni* durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose.

FASE AGUDA			
ORGÃO	SM	LLA + SM	Valor de p[#]
	Mediana – (IIQ 25% - 75%) Frequência*	Mediana - (IIQ 25% - 75%) Frequência*	
<i>Cérebro</i>	0 (0 – 0)	0 (0 – 2,5)	0,4737
	0% (0/10)	20% (2/10)	0,4737
<i>Pulmões</i>	5 (0 - 5)	300 (0 - 4020)	0,1204
	60% (6/10)	90% (9/10)	0,3034
<i>Baço</i>	555 (322 – 705)	1455 (42 – 3353)	0,4244
	100% (9/9)	100% (10/10)	1
<i>Intestinos</i>	11838 (9444 – 15706)	15513 (12988 – 22356)	0,0630
	100% (10/10)	100% (10/10)	1
FASE CRÔNICA			
ORGÃO	SM	LLA + SM	Valor de p[#]
	Mediana - (IIQ 25% - 75%) Frequência*	Mediana - (IIQ 25% - 75%) Frequência*	
<i>Cérebro</i>	0 (0 – 0)	0 (0 – 10)	0,4737
	10% (1/10)	20% (2/10)	1,000
<i>Pulmões</i>	30 (10 - 85)	1700 (295 - 8170)	0,0001
	75% (6/8)	100% (10/10)	0,1830
<i>Baço</i>	135 (65 – 255)	550 (265 – 3725)	0,0058
	100 % (10/10)	100% (9/9)	1
<i>Intestinos</i>	12425 (9975 – 16900)	23013 (13138 – 29081)	0,1537
	100% (8/8)	100% (10/10)	1

*Análise da frequência feita pelo Teste de Fisher. # Análise do número de ovos feito pelo teste de Kruskal-Wallis test multiple comparisons

A retenção total de ovos nos diferentes tecidos animais monoinfectados e coinfectados por *S. mansoni* encontra-se ilustrado na figura 18A e mostra que a somatória dos ovos retidos nos diferentes tecidos examinados foi estatisticamente semelhante em animais mono e coinfectados durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose. Em relação a fecundidade (FIGURA 18B), durante a fase aguda e crônica da infecção pelo trematódeo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número de ovos por fêmea de parasito; porém apenas as fêmeas parasitas de animais monoinfectados apresentaram um aumento da fecundidade entre a fase aguda e crônica da Esquistossomose ($p=0,0211$).

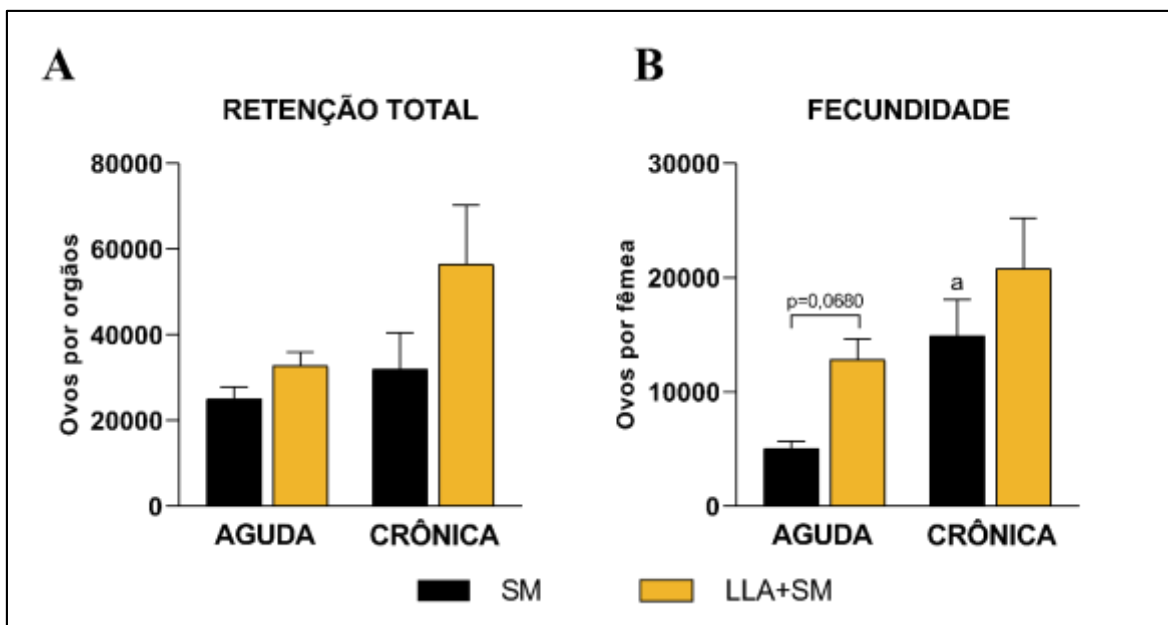


Figura 18. Retenção total de ovos e fecundidade das fêmeas do trematódeo em camundongos mono infectados por *S. mansoni* (SM) e co infectados por *L. amazonensis* (LLA+SM) durante a fase aguda e crônica da Esquistossomose. A: Somatória do número de ovos retidos nos pulmões, baço, fígado, intestino e cérebro dos animais mono infectados por *S. mansoni* ou co infectados. B: Razão entre a somatória de ovos retidos nos tecidos pelo número de fêmeas de *S. mansoni* (fecundidade) em camundongos mono infectados por *S. mansoni* e co infectados na fase aguda e crônica da Esquistossomose. Resultados expressos por média \pm erro padrão (One-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons test). a representa $p < 0,05$ quando compara os animais do mesmo grupo experimental entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Para melhor avaliar a redução significativa do número de vermes observada em camundongos co infectados na fase aguda da Esquistossomose, foi realizado um experimento para recuperação e contagem de esquistossomulos em migração pelos pulmões de animais infectados e co infectados, após 5 dias da infecção por *S. mansoni*. Os resultados indicam que os animais co infectados apresentaram aproximadamente duas vezes menos esquistossômulos pulmonares em comparação aos animais mono infectados por *S. mansoni* ($p=0,0009$) FIGURA 19.

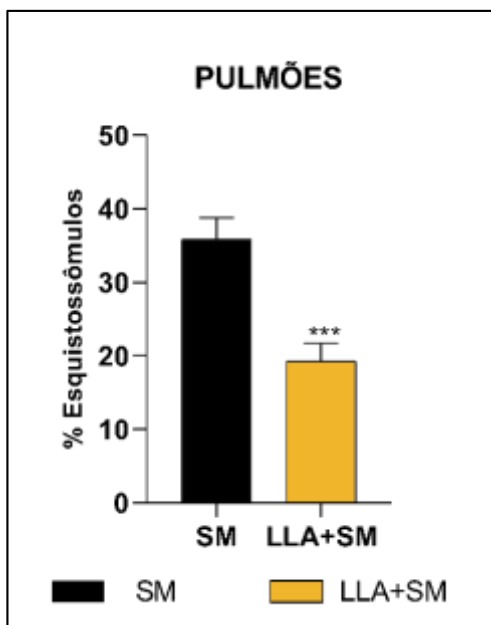


Figura 19. Porcentagem de esquistossômulos recuperados do pulmão de camundongos mono infectados por *S. mansoni* (SM) e co infectados com *L. amazonensis* (LLA+SM). Percentual de esquistossômulos recuperados durante a fase de migração pulmonar em animais mono infectados por *S. mansoni* e co infectados. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Test T de Student). *** representa $p < 0,001$ quando comparado ao mono infectado por *S. mansoni*.

6.3. Avaliação da resposta imune sistêmica e local e das alterações histopatológicas hepática associadas à co infecção de *L. amazonensis* e *S. mansoni*.

6.3.1. Resposta imune sistêmica

Com o intuito de verificar possíveis fatores que determinam as alterações observadas na morbidade e carga parasitária, foi avaliado o perfil da resposta imune e alterações histopatológica dos animais mono e co infectados. Células esplênicas de animais dos diferentes grupos experimentais, cultivadas na ausência de estímulos de antígenos parasitários, produziram baixos níveis de IFN- γ . Para esta citocina não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais que não foram reestimuladas com antígenos (FIGURA 20A). O estímulo com antígeno do ovo de *S. mansoni* (SEA) em células esplênicas de animais mono infectados por *S. mansoni* durante a fase aguda da infecção resultou em um aumento de 10 vezes na produção de IFN- γ em relação às células não estimuladas, enquanto que nos demais grupos experimentais a produção de IFN- γ foi semelhante ao obtido nas células esplênicas não estimuladas. Desta forma, neste período da infecção, a produção de IFN- γ por células esplênicas de animais

monoinfectados por *L. amazonenses* e de animais coinfectados, quando estimuladas por *SEA*, foi estatisticamente menor que a produção de IFN- γ por esplenócitos de animais monoinfectados pelo trematódeo sob o mesmo estímulo, sugerindo modulação da resposta nos coinfectados (FIGURA 20B).

Com relação a produção de IL-4, somente as células esplênicas recuperadas de fase aguda de animais coinfectados, sem estímulo, apresentaram níveis detectáveis no sobrenadante de cultura (FIGURA 20D). O estímulo por *SEA* também foi capaz de elevar as concentrações de IL-4 pelos esplenócitos de animais monoinfectados por *S. mansoni* e coinfectados, de forma semelhante, durante a fase aguda da Esquistossomose, enquanto que em células de animais apenas infectados por *L. amazonensis* e estimuladas com *SEA*, a concentração de IL-4 foi cerca de 30 vezes menor que nos grupos infectados ou coinfectados com *S. mansoni*. Perfil semelhante de produção de IL-4 foi observado na fase crônica da Esquistossomose, entretanto os animais monoinfectados por *L. amazonensis* não produziram níveis detectáveis desta citocina em resposta ao estímulo com *SEA* (FIGURA 20E). No caso da produção de IL-13, também foi observado que células esplênicas não estimuladas produzem baixa concentração de IL-13, sem diferença entre os grupos experimentais (FIGURA 20G). Além disso, o estímulo por *SEA* induziu aumento da produção desta citocina nos animais monoinfectados durante a fase aguda da Esquistossomose, no qual a concentração de IL-13 foi estatisticamente menor no sobrenadante de cultura celular de animais infectados por *L. amazonensis*. Interessantemente, durante a fase crônica da Esquistossomose, somente os animais coinfectados apresentaram níveis detectáveis desta interleucina no sobrenadante (FIGURA 20H).

Por outro lado, em células esplênicas de fase aguda de todos os grupos experimentais estimuladas por antígeno de *L. amazonensis* (*SLA*) não induziu um aumento significativo de IFN- γ como visto no estímulo por *SEA*. Já na fase crônica, o estímulo com *SLA* resultou em aumento da concentração de IFN- γ em todos os grupos experimentais, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles (FIGURA 20C).

Também foi verificado que a exposição a *SLA* estimulou, em proporções semelhantes, a produção de IL-4 em células de animais monoinfectados por *L. amazonensis* e coinfectados, mas sem diferenças estatísticas entre eles, em ambas as fases da Esquistossomose (FIGURA 21 F). Na fase crônica da Esquistossomose, somente as células de animais coinfectados demonstraram níveis detectáveis de IL-13 (FIGURA 20I).

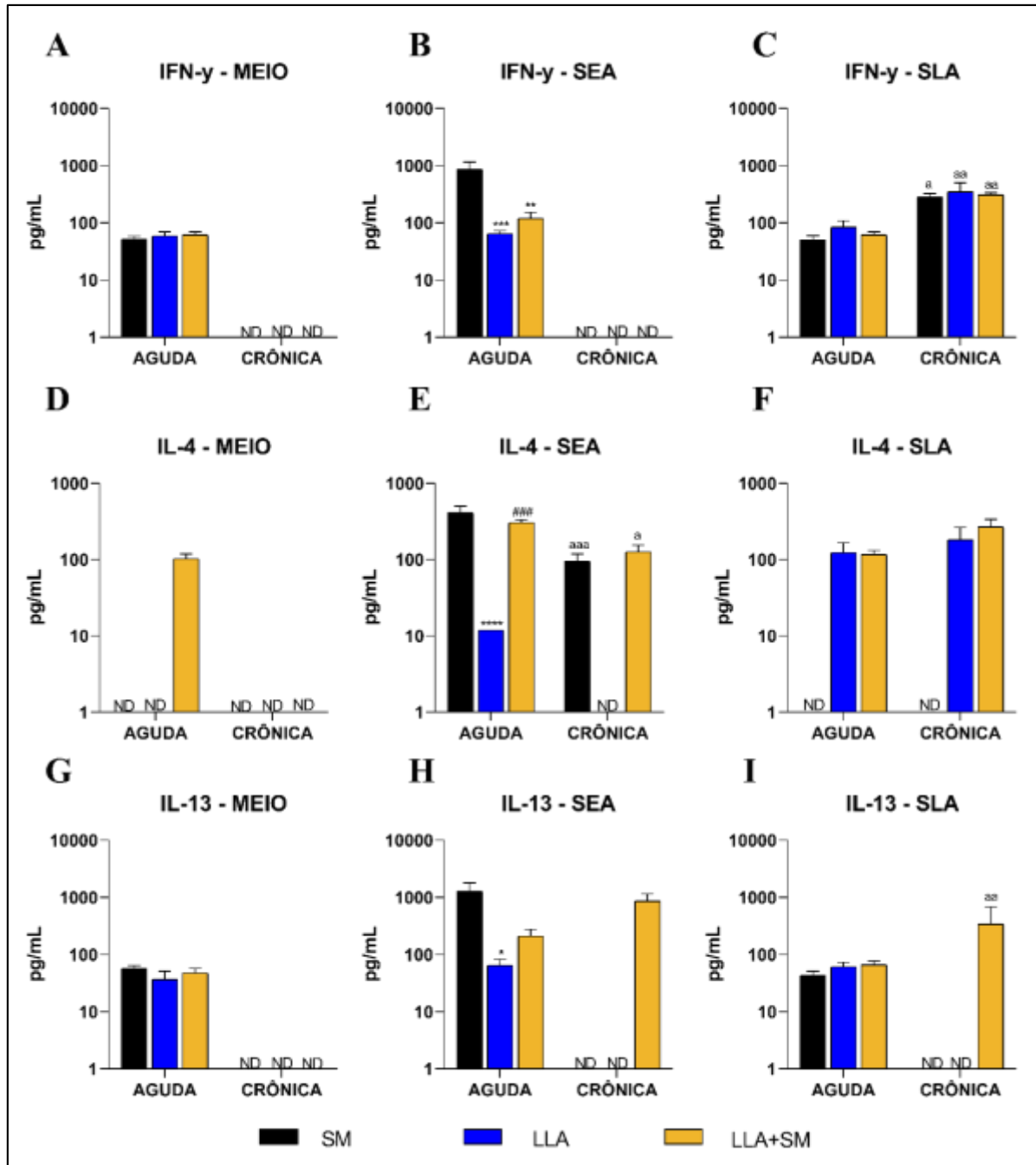


Figura 20. Concentração de citocinas Th-1 e Th-2 no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfectados (LLA+SM). A concentração de IFN- γ (A-C); IL-4 (D-F) e IL-13 (G-H); foi estimada por ELISA em amostras de sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos de todos os grupos experimentais, cultivadas em meio RPMI completo acrescido ou não de 10 μ g/ml de SEA ou SLA. Resultados expressos por média \pm erro padrão e a análise estatística realizada por teste de variância (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). * representa $p < 0,05$; ** representa $p < 0,01$; *** representa $p < 0,001$ e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*. ### representa $p < 0,001$ quando copara ao monoinfectado por *L. amazonensis*; a representa $p < 0,05$, aa representa $p < 0,01$ e aaaa representa $p < 0,0001$ quando comparado os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose. ND representa níveis não detectáveis ao ensaio imunoenzimático.

Também foi mensurado a concentração de TGF- β e IL-10, citocinas do perfil regulatório, no sobrenadante de cultura de esplenócitos (FIGURA 21); a produção de TGF- β foi elevada na maioria dos grupos experimentais, até mesmo em células sem estímulo. Em células não estimuladas de animais coinfectados durante a fase crônica das Esquistossomose, demonstra-se que os níveis de TGF- β são estatisticamente menores do que aqueles encontrados durante a fase aguda. Já quando estimuladas com *SEA* durante a fase crônica da Esquistossomose, as células de animais monoinfectados por *L. amazonensis* apresentaram oito vezes menos esta citocina em relação aos monoinfectados por *S. mansoni* e dez vezes menos que as células de animais também monoinfectados por *L. amazonensis* durante a fase aguda da Esquistossomose (FIGURA 21B). Por fim, quando estimuladas com *SLA*, as células esplênicas de animais monoinfectados por *S. mansoni* não apresentaram quantidade detectáveis de TGF- β durante a fase aguda da Esquistossomose, enquanto os outros grupos produziram concentrações semelhantes desta citocina tanto na fase aguda, quanto na fase crônica (FIGURA 21C).

Somente foram detectáveis níveis de IL-10 nas células de animais coinfectados durante a fase aguda da Esquistossomose. As células de animais monoinfectados por *L. amazonensis* produziram esta citocinas somente na fase crônica, quando não estimuladas, ou mediante ao estímulo de *SLA*. O estímulo por *SEA* pareceu não estimular a produção de IL-10 em nenhum dos grupos durante a fase crônica da Esquistossomose (FIGURA 21 D-F).

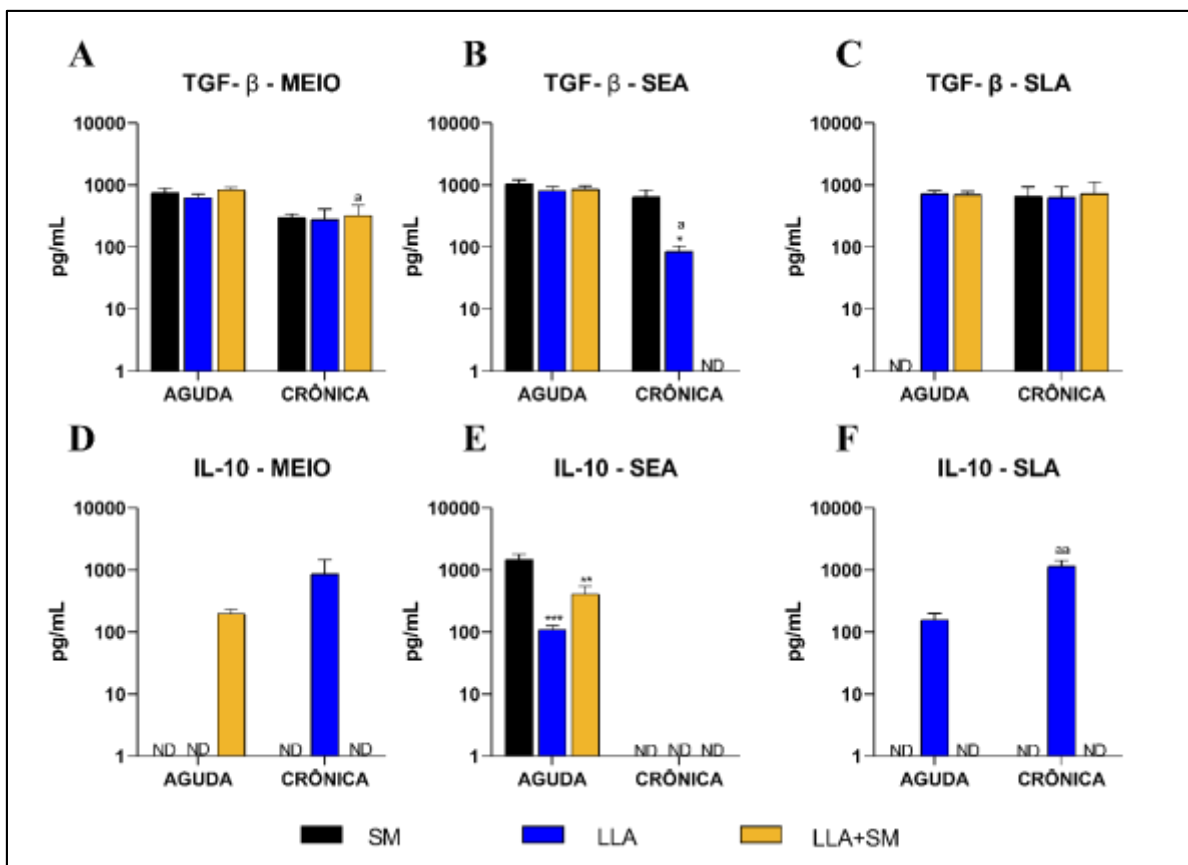


Figura 21. Concentração de citocinas de perfil regulatório no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfectados (LLA+SM). A concentração de TGF-β (A-C); IL-10 (D-F); foi estimada por ELISA em amostras de sobrenadante de cultura de esplenócitos, em meio RPMI completo acrescido ou não de 10μg/ml de SEA ou SLA, de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média ± erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). * representa p<0,05; ** representa p<0,01; *** representa quando comparado ao mono infectado por *S. mansoni*; a representa p<0,05, aa representa p<0,01 e quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose. ND representa quantidades não detectáveis a técnica empregada.

6.3.2. Resposta imune pulmonar à infecção por *L. amazonensis* e *S. mansoni*.

Além de quantificarmos a concentração das citocinas presente na cultura de células do baço, também foram avaliadas alterações imunológicas no pulmão e fígado com o intuito de analisar a resposta local. As concentrações de IFN-γ, TNF-α, IL-17 e IL-22 quantificadas no homogenato pulmonar de animais mono infectados por *L. amazonensis* foram estatisticamente superiores em comparação ao detectado em animais mono infectados por *S. mansoni* e nos coinfectados, especialmente na fase crônica (FIGURA 22A-D).

Interessantemente, foi observado que no homogenato pulmonar de animais coinfectados, durante a fase crônica da Esquistossomose, apresentaram concentrações mais

elevadas de TNF- α e IL-17, em comparação a fase aguda da infecção; logo, este aumento na concentração de TNF- α e IL-17 entre a fase aguda e crônica da Esquistossomose, atribuíram também ao pulmão de animais coinfectados maiores concentrações destas citocinas em comparação aos pulmões de animais monoinfectados por *S. mansoni*. Ressalta-se ainda que, os pulmões de animais monoinfectados por *S. mansoni* demonstraram menores concentrações de IL-22 durante a fase crônica da Esquistossomose em comparação a fase aguda (FIGURA 22A-D).

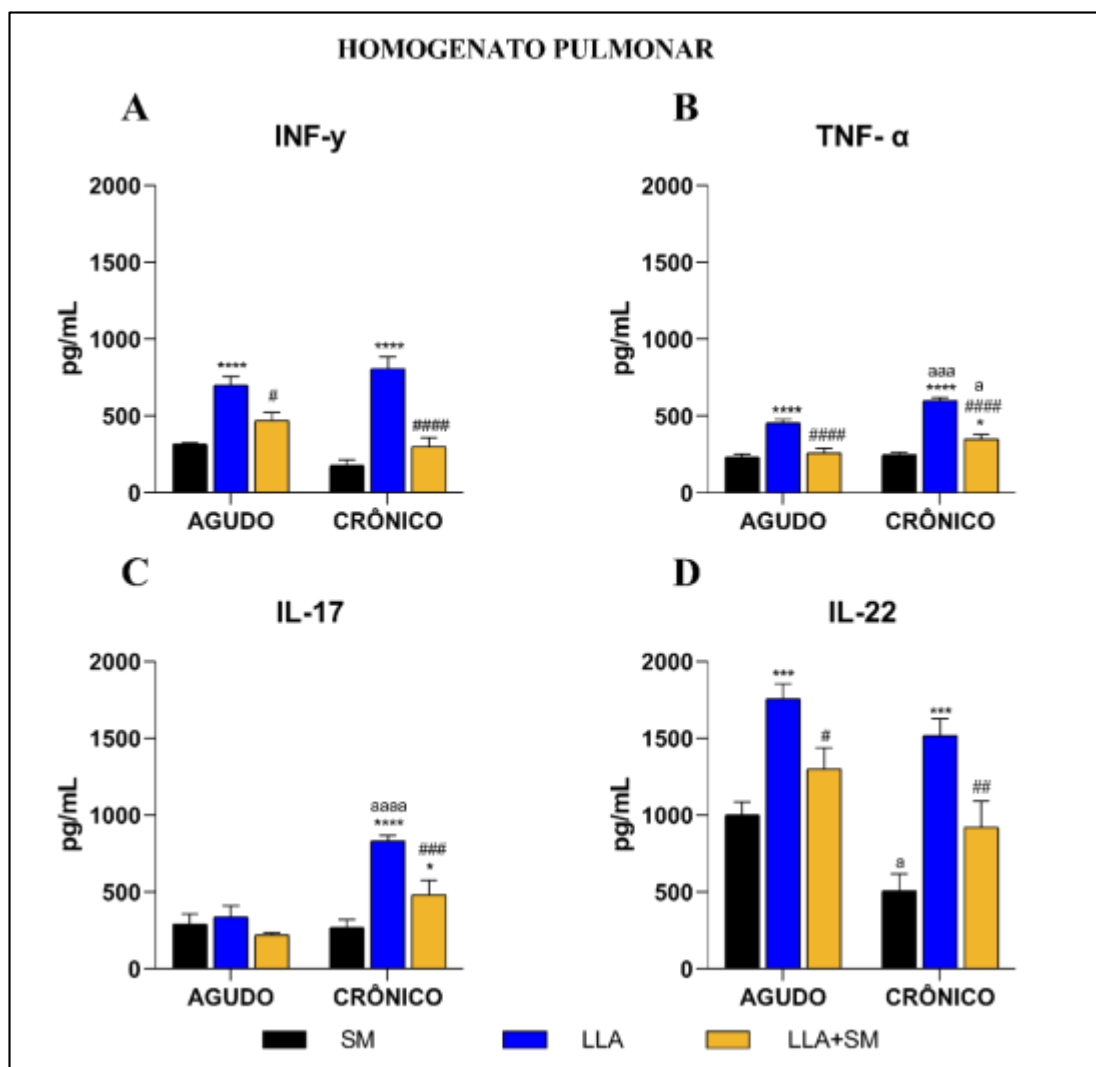


Figura 22. Concentração de citocinas Th-1 e Th-17 no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfectados (LLA+SM). A concentração de INF- γ (A); TNF- α (B); IL-17 (C) e IL-22 (D) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato pulmonar, de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). *** representa $p < 0,001$ e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*. # representa $p < 0,05$; ## representa $p < 0,01$; ### representa $p < 0,001$ e #### representa $p < 0,0001$ quando compara ao monoinfectado por *L. amazonensis*; a representa $p < 0,05$ e aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Para determinar a intensidade de resposta celular do tipo 2, quantificamos também IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 no homogenato pulmonar (FIGURA 23A-D). Interessantemente, a concentração de IL-4 foi significativamente maior nos pulmões de animais monoinfectados por *L. amazonensis*, em comparação de animais monoinfectados por *S. mansoni* e coinfectados. (FIGURA 23A). Com relação a IL-5, IL-13 e IL-33, os dados indicam que a concentração destas citocinas no homogenato pulmonar foi semelhante durante a fase aguda da Esquistossomose nos diferentes grupos experimentais (FIGURA 23 B-D). Na fase crônica, as concentrações de IL-5 e IL-13 no homogenato pulmonar aumentaram em relação a fase aguda em todos os grupos experimentais; este aumento refletiu especialmente no pulmão de animais monoinfectados por *L. amazonensis* que demonstraram níveis de IL-5 e IL-13 significativamente maiores que os monoinfectados por *S. mansoni* e coinfectados (FIGURA 23 B e C). Também é importante salientar que, na fase crônica da Esquistossomose, as concentrações de IL-4 (FIGURA 22A) e de IL-5 (FIGURA 23B) no homogenato pulmonar de animais coinfectados foi significativamente maior que nos animais somente infectados por *S. mansoni*. Diferente do que foi visto para outras citocinas do perfil Th-2, a concentração de IL-33 no homogenato pulmonar dos animais monoinfectados por *L. amazonenses* reduziu significativamente na fase crônica em comparação a fase aguda, que resultou em concentrações estatisticamente menores desta citocina quando comparado a pulmões de animais monoinfectados por *S. mansoni* (FIGURA 23D).

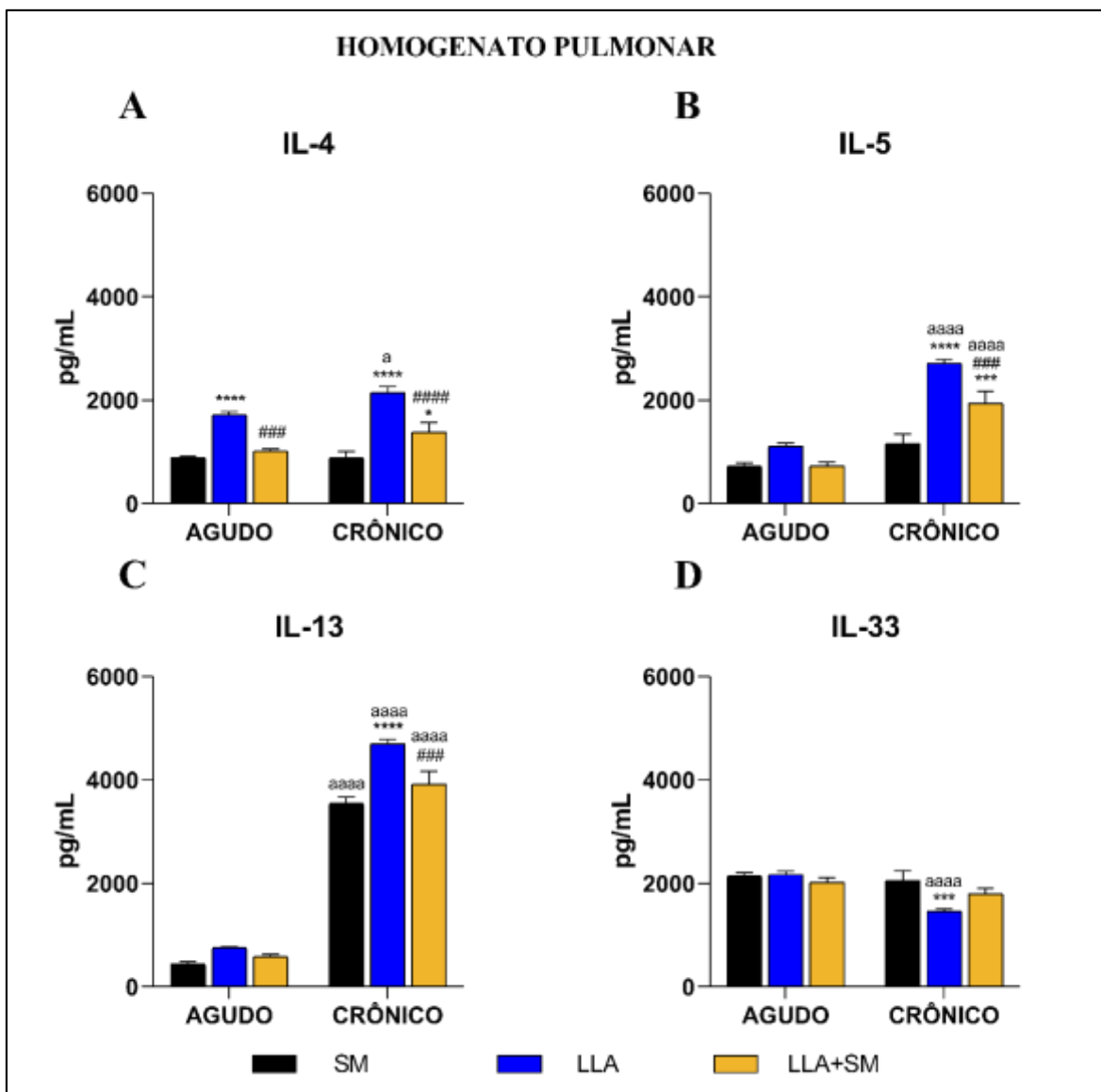


Figura 23. Concentração de citocinas Th2 no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (LLA), infectados com *S. mansoni* (SM) ou coinfetados (LLA+SM). A concentração de IL-4 (A); IL-5 (B); IL-13 (C) e IL-33 (D) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato pulmonar de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). *** representa $p < 0,001$ e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*. # representa $p < 0,05$; ### representa $p < 0,001$ e #### representa $p < 0,0001$ quando compara ao monoinfectado por *L. amazonensis*; a representa $p < 0,05$ e aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Para as citocinas de perfil regulatório, constatou-se que os pulmões de animais monoinfectados por *L. amazonensis* apresentam concentrações mais elevadas de IL-10 que aqueles monoinfectados por *S. mansoni* e coinfetados, tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Já em relação a citocina TGF- β , apenas durante a fase crônica, os animais monoinfectados por *L. amazonensis* apresentaram concentrações mais elevadas desta

citocina em relação aos pulmões de animais coinfectados e mono infectados por *S. amazonensis* (FIGURA 24A e B).

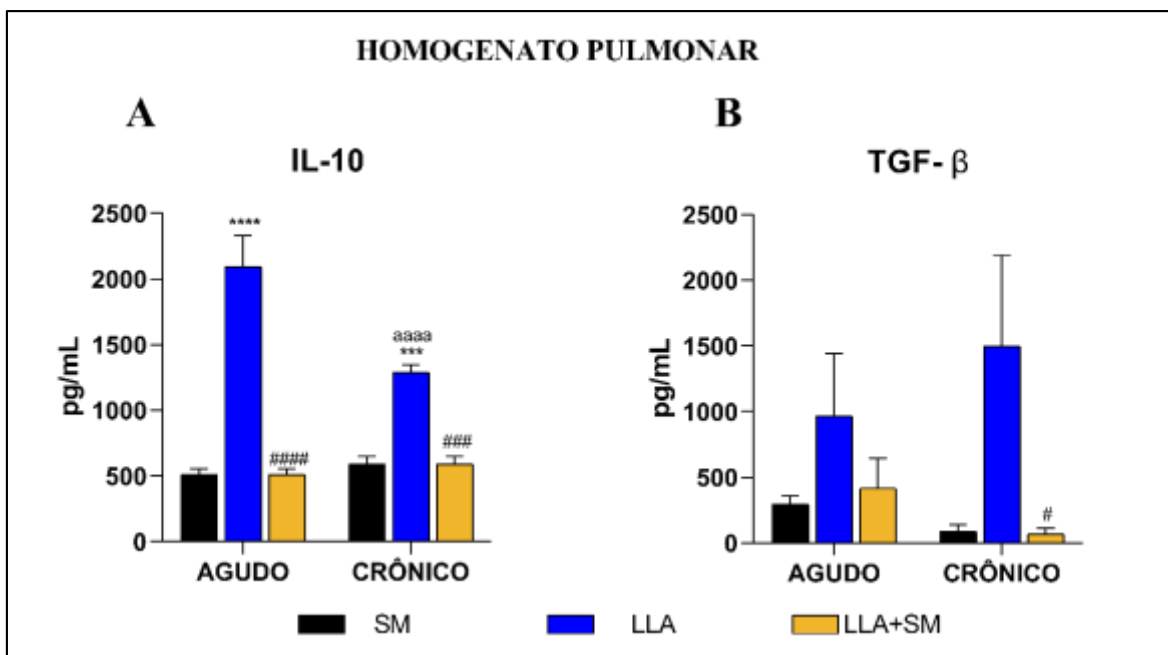


Figura 24. Concentração de citocinas de perfil regulatório no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), com *S. mansoni* (SM) ou coinfectados (LLA+SM). A concentração de IL-10 (A) e TGF- β (B) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato pulmonar, de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). *** representa $p < 0,001$ e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao mono infectado por *S. mansoni*. # representa $p < 0,05$; ### representa $p < 0,001$ e #### representa $p < 0,0001$ quando compara ao mono infectado por *L. amazonensis*; aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Por fim, foram quantificadas as concentrações das quimiocinas CCL5, CXCL2, CCL24 e CCL17. As concentrações de CCL5 e CCL24 no homogenato pulmonar de animais mono infectados por *S. mansoni*, durante a fase aguda da infecção, foram estatisticamente maiores que as encontradas em pulmões de animais mono infectados por *L. amazonensis* e coinfectados; na fase crônica os níveis de CCL5 e de CCL24 são reduzidos em todos os grupos experimentais e não apresentam diferenças estatisticamente diferentes entre si (FIGURA 25A).

Diferente do que foi observado na produção de CCL-5 e CCL24, a concentração de CXCL2 foi estatisticamente maior no homogenato pulmonar de animais mono infectados com *L. amazonensis* quando comparados aos pulmões de animais mono infectados por *S. mansoni* e esta diferença é acentuada durante a fase crônica. A concentração de CXCL2 no homogenato pulmonar dos animais coinfectados foi mais elevada que nos mono infectados

por *S. mansoni*, sendo esta diferença significativamente estatística somente durante a fase crônica da Esquistossomose (FIGURA 25B). A concentração da quimiocina CCL17 no homogenato pulmonar não mostrou alterações significativas entre os grupos experimentais, independente da fase da infecção que foi examinada (FIGURA 25D).

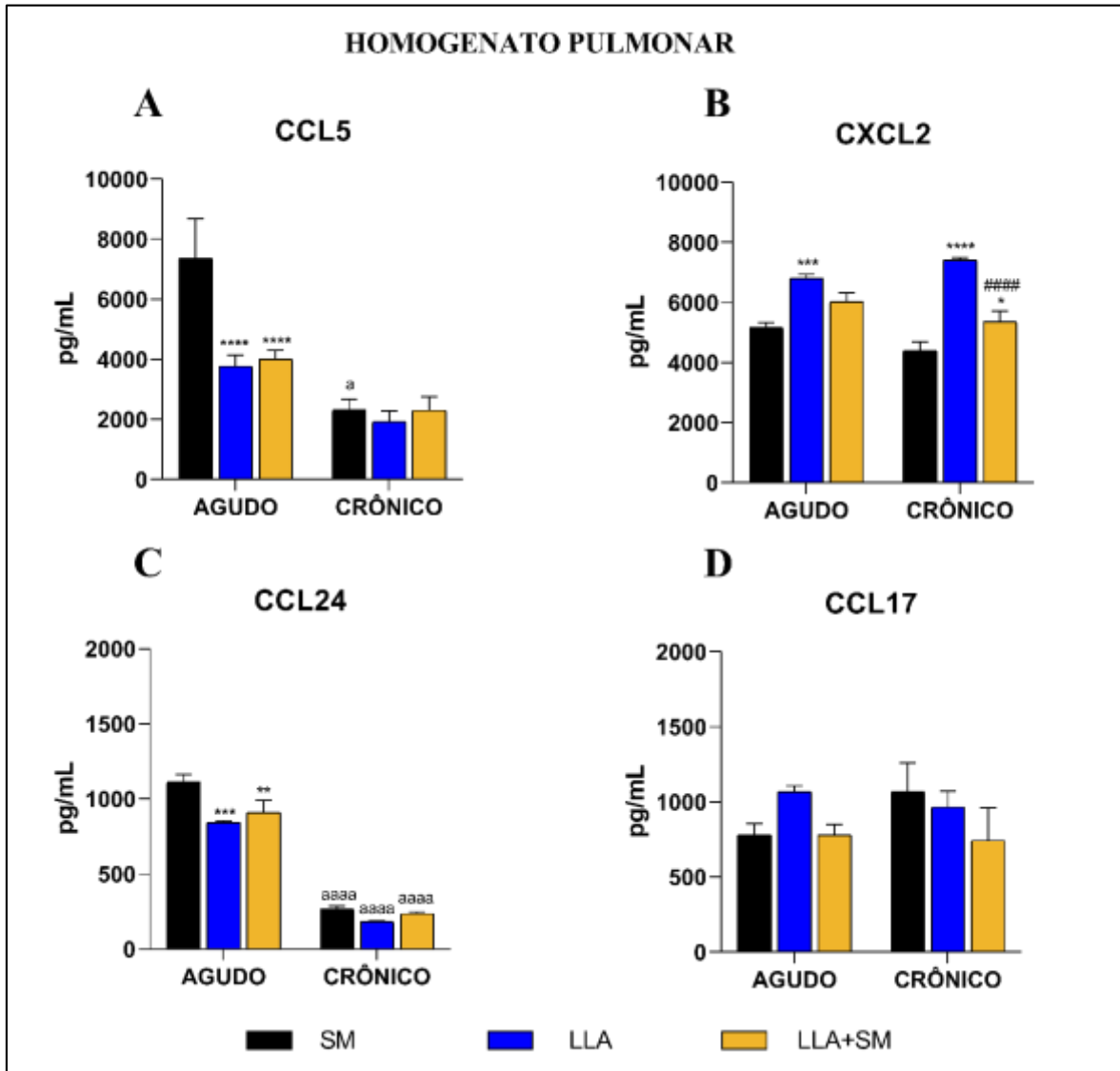


Figura 25. Concentração de quimiocinas no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfetados (LLA+SM). A concentração de CCL5 (A); CXCL2 (B); CCL24 (C) e CCL17 (D) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato pulmonar, de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). * representa $p < 0,05$; ** representa $p < 0,01$; *** representa $p < 0,001$ e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*. # representa $p < 0,05$; ##### representa $p < 0,0001$ quando compara ao monoinfectado por *L. amazonensis*; aaa representa $p < 0,001$ e aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Para melhor avaliar as consequências do perfil de produção de citocinas na infiltração celular, a atividade enzimática de NAG, EPO e MPO foi quantificada no homogenato pulmonar dos animais experimentais. Foi visto que durante a fase aguda, a atividade da enzima NAG foi baixa e semelhante em todos os grupos experimentais; já na fase crônica houve um aumento na atividade desta enzima no pulmão de animais apenas infectados por *S. mansoni*, que resultou em diferenças estatisticamente significativa em relação aos monoinfectados por *L. amazonensis* e coinfectados. Ademais, os pulmões de animais coinfectados apresentaram mais atividade de NAG durante a fase crônica da Esquistossomose quando comparado aos monoinfectados por *L. amazonensis* (FIGURA 26A).

Já em relação a atividade da enzima EPO, os pulmões de animais coinfectados apresentaram atividade enzimática significativamente elevada em relação aos outros grupos experimentais durante a fase aguda da Esquistossomose, sugerindo maior infiltração de eosinófilos. Também foi verificado aumento da atividade de EPO durante a fase crônica da Esquistossomose nos pulmões de animais apenas infectados com *S. mansoni* e coinfectados, refletindo em diferenças estatisticamente significativas em comparação aos monoinfectados por *L. amazonensis* (FIGURA 26B).

Por fim, também foi verificado que o nível de atividade de MPO nos pulmões de animais monoinfectados por *L. amazonensis* foi semelhante ao detectado nos animais não infectados, enquanto que a atividade de MPO nos pulmões de animais monoinfectados por *S. mansoni* encontrou-se elevada durante toda avaliação. Nos animais coinfectados, o nível de atividade de MPO no homogenato pulmonar foi estatisticamente maior que nos animais monoinfectados por *L. amazonensis*, mas ainda possuem menor atividade desta enzima em relação ao monoinfectados por *S. mansoni* durante a fase aguda da Esquistossomose. Na fase crônica a atividade de MPO do pulmão de animais coinfectados se iguala a encontrada nos pulmões de animais apenas infectados com *S. mansoni* e permanecem ainda superiores à aquela encontrada nos animais monoinfectados por *L. amazonensis* (FIGURA 26C).

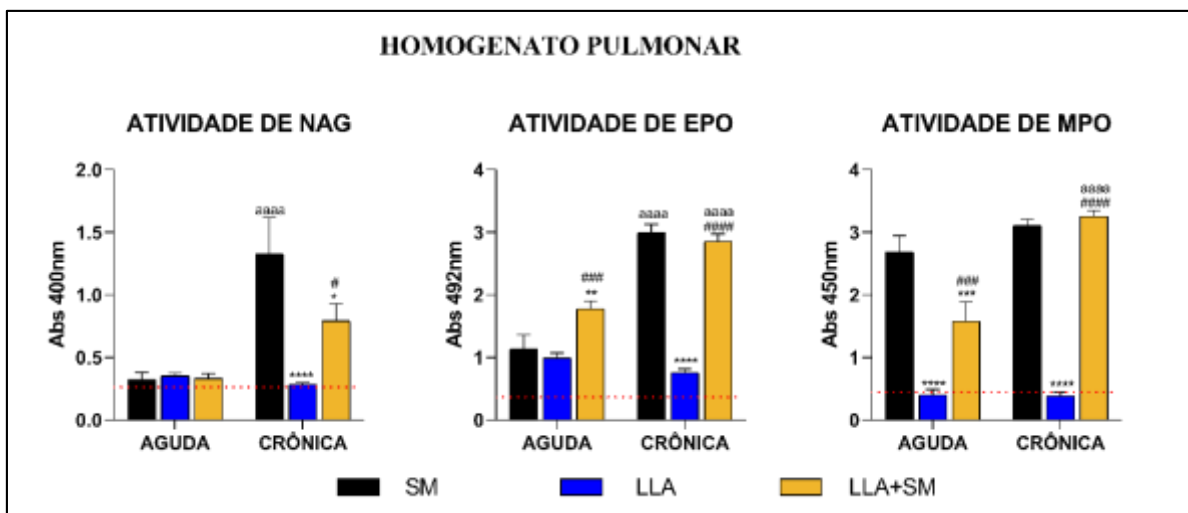


Figura 26 – Determinação indireta de infiltração celular nos tecidos pulmonares de animais monoinfectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfectados (LLA+SM). Atividade enzimática de NAG (A), EPO (B) e MPO (C), durante a fase aguda e crônica encontrados nos animais monoinfectados por *L. amazonensis*, *S. mansoni* ou coinfectados. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). * representa $p < 0,05$; ** representa $p < 0,01$ *** representa $p < 0,001$ e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*. ### representa $p < 0,001$ e #### representa $p < 0,0001$ quando compara ao monoinfectado por *L. amazonensis*; aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose. Linha pontilhada representa a média de eritrócitos ou hemoglobina encontrada nos animais controle não infectados.

6.3.3. Resposta imune e análise histológica hepática à infecção por *L. amazonensis* e *S. mansoni*.

A concentração de citocinas e quimiocinas também foi quantificada no homogenato hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais, sendo verificado que a concentração das citocinas IFN- γ e TNF- α foi estatisticamente maior nos animais monoinfectados por *L. amazonensis* ($p < 0,0001$) que nos animais monoinfectados por *S. mansoni* ou coinfectados nos dois períodos avaliados. Além disso, a concentração destas citocinas foi estatisticamente semelhante no homogenato hepático de camundongos monoinfectados pelo trematódeo e coinfectados, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da Esquistossomose. (FIGURA 27 A e B). A concentração de IL-17 no homogenato hepático dos animais monoinfectados por *L. amazonensis* também foi estatisticamente maior que nos demais grupos experimentais na fase aguda; entretanto, durante a fase crônica, os animais monoinfectados por *L. amazonensis* tiveram redução da concentração hepáticas desta citocina, se assemelhando aos animais apenas infectados por *S. mansoni* e coinfectados (FIGURA 27C). Para a citocina IL-22, a análise demonstrou que, os animais monoinfectados

por *L. amazonensis* apresentaram concentrações hepáticas significativamente maiores desta citocina em relação ao monoinfectados por *S. mansoni* e coinfectedos, na fase aguda da Esquistossomose; enquanto que na fase crônica tanto os animais monoinfectados por *L. amazonensis* quanto os coinfectedos apresentaram maiores concentrações de IL-22 quando comparados aos fígados de animais monoinfectados por *S. mansoni* (FIGURA 27D).

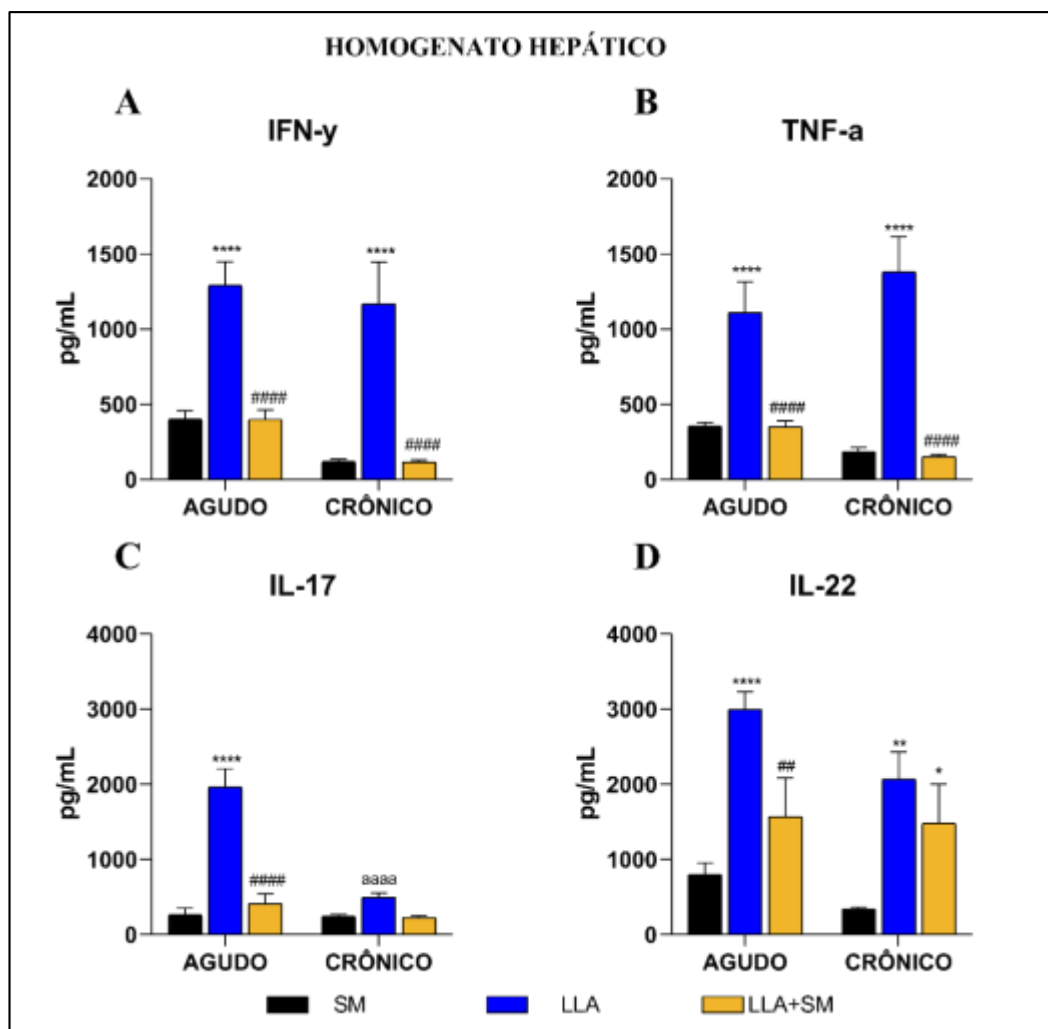


Figura 27. Concentração de citocinas no homogenato hepático de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfectedos (LLA+SM). A concentração de IFN- γ (A); TNF- α (B); IL-17 (C) e IL-22 (D) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato hepático, de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). * representa $p < 0,05$; ** representa $p < 0,01$ e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*. # representa $p < 0,05$; ##### representa $p < 0,0001$ quando compara o monoinfectado por *L. amazonensis*; aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Em relação as citocinas de perfil Th2, foi observado que os animais monoinfectados por *L. amazonensis* apresentaram concentrações hepáticas das citocinas IL-4, IL-5 e IL-33 significativamente maiores quando comparados aos animais monoinfectados por *S. mansoni*

e coinfectados, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da Esquistossomose (FIGURA 28 A, B e D). Também vale ressaltar que os níveis destas citocinas nos animais monoinfectados por *S. mansoni* e coinfectados não se apresentaram estatisticamente diferentes. Para a citocina IL-13, durante a fase aguda da Esquistossomose todos os grupos experimentais apresentaram quantidade semelhantes desta citocina; já na fase crônica todos os grupos experimentais aumentaram as concentrações hepáticas de IL-13, e os animais monoinfectados por *L. amazonensis* demonstraram níveis significativamente mais elevados desta citocina que os animais monoinfectados por *S. mansoni* e coinfectados (FIGURA 28C).

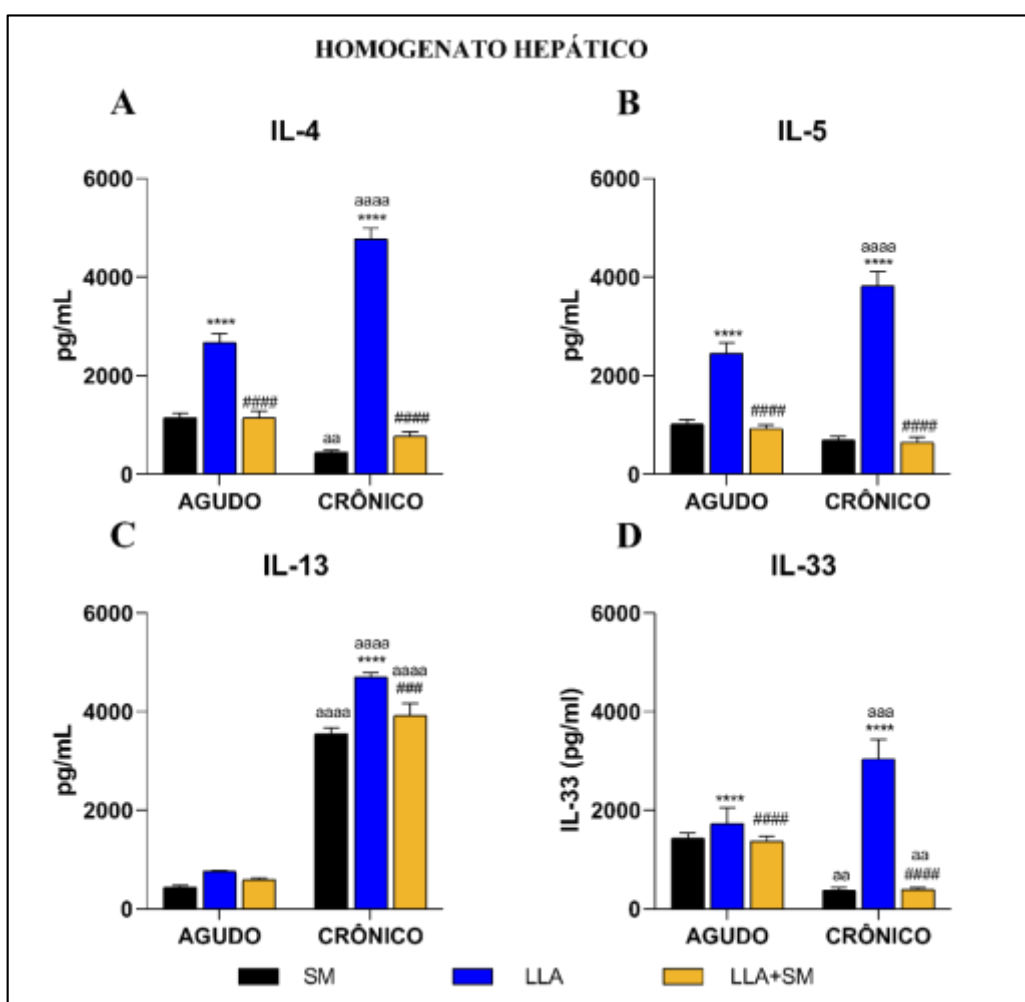


Figura 28. Concentração de citocinas no homogenato hepático de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfectados (LLA+SM). A concentração de IL-4 (A); IL-5 (B); IL-13 (C) IL-33 (D) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato hepático, de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*; ### representa $p < 0,001$; ##### representa $p < 0,0001$ quando compara ao monoinfectado por *L. amazonensis* e aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Para avaliar a ocorrência de uma resposta imune hepática do tipo regulatório mensuramos também as citocinas IL-10 e TGF- β . Novamente, os animais monoinfectados por *L. amazonensis* demonstram maiores quantidade de IL-10 no homogenato hepático quando comparado aos animais monoinfectados por *S. mansoni* ou coinfectados, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da Esquistossomose. Já para TGF- β , concentrações similares desta citocina foram observadas no homogenato hepático de todos os grupos experimentais, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da Esquistossomose (FIGURA 29 A e B).

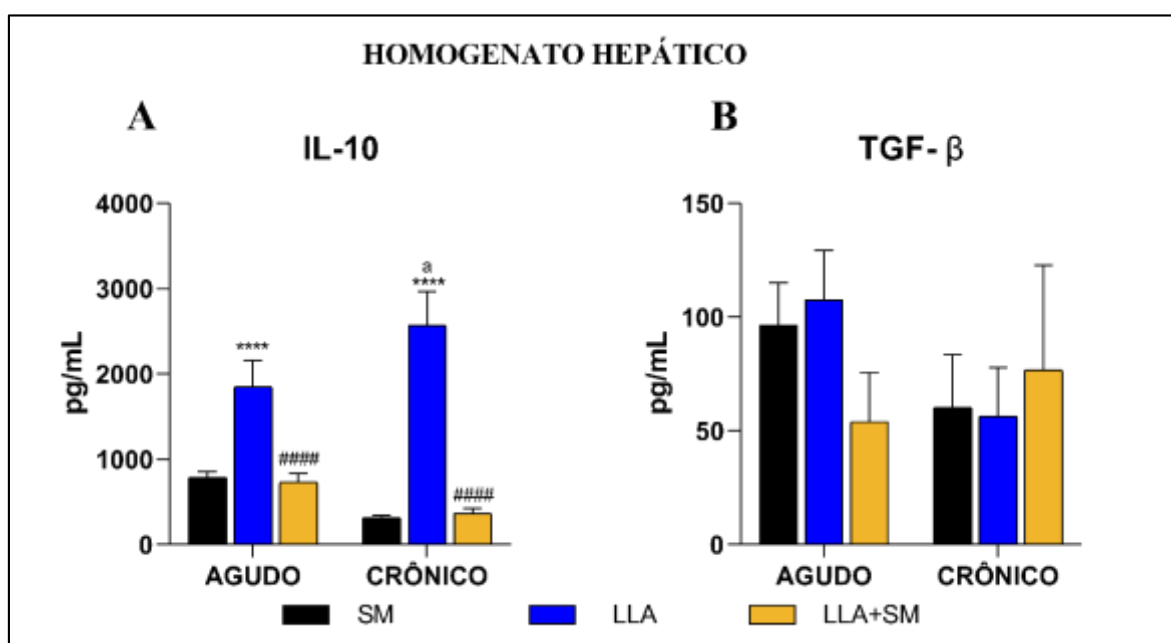


Figura 29. Concentração de citocinas no homogenato hepático de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfectados (LLA+SM). A concentração de IL-10 (A); TGF- β (B) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato hepático, de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao monoinfectado por *S. mansoni*; ##### representa $p < 0,0001$ quando compara ao monoinfectado por *L. amazonensis*; a representa $p < 0,05$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.

Finalmente, também foi mensurada as concentrações das citocinas CCL5, CXCL2, CCL24 e CCL17. Como visto na figura 30 A, as concentrações de CCL5 no homogenato hepático foi semelhante entre os grupos experimentais nos tempos examinados; no entanto, a concentração desta quimiocina aumentou significativa no decorrer da infecção em todos os grupos experimentais. O fígado dos animais apenas infectados com *L. amazonensis* apresentaram níveis significativamente mais elevados de CXCL2 e CCL17 que os fígados de animais apenas infectados por *S. mansoni* e coinfectados, tanto na fase aguda quanto na fase crônica (FIGURA 30 B e D). A concentração de CCL24 foi semelhante no homogenato

hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais na fase aguda, mas camundongos somente infectados por *L. amazonensis* tiveram um aumento significativo desta quimiocina na fase crônica da infecção, resultando em concentração significativamente mais elevada de CCL24 no homogenato hepático destes animais quando comparado com os demais grupos experimentais (FIGURA 30C).

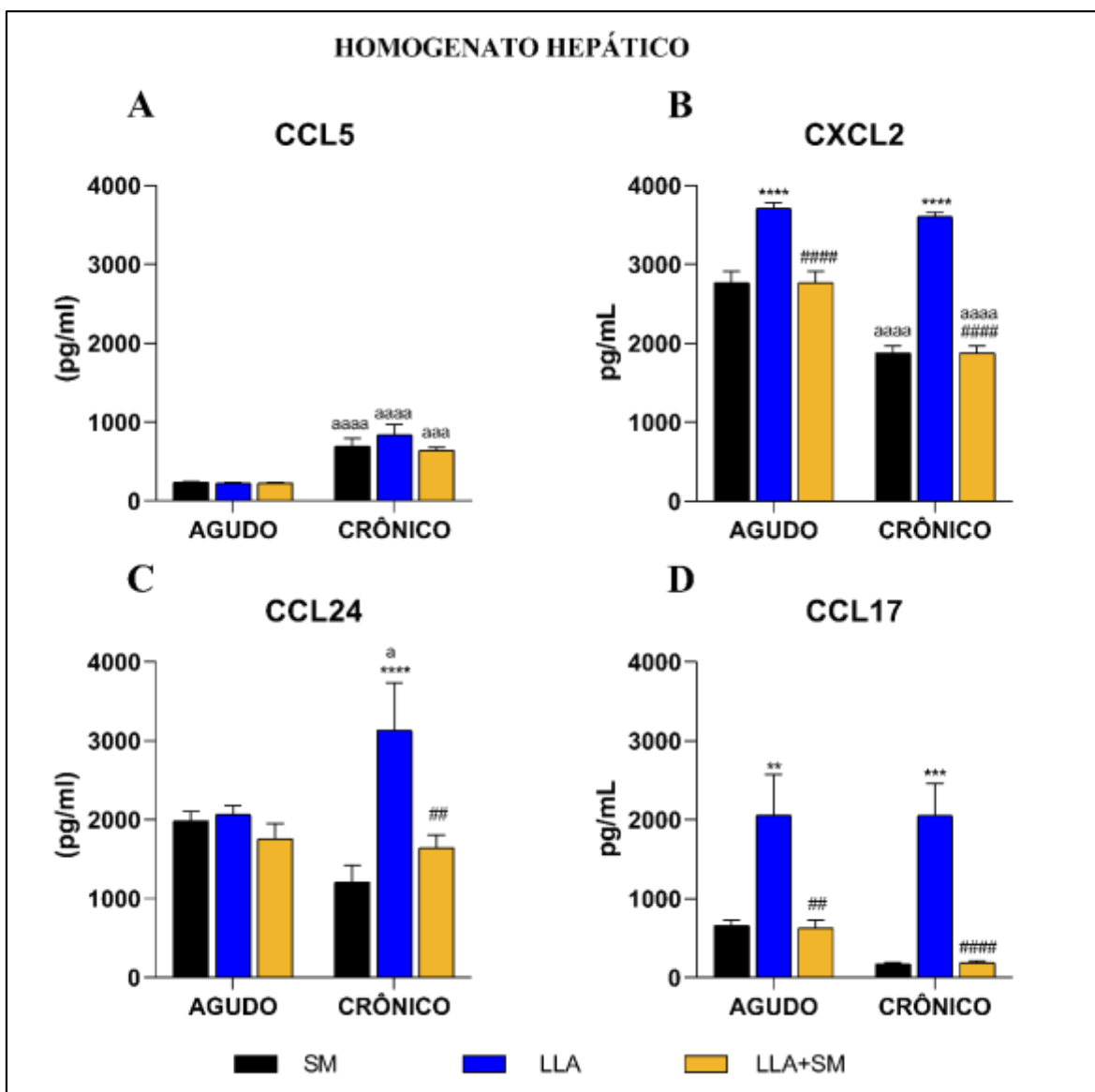


Figura 30. Concentração de quimiocinas no homogenato hepático de camundongos BALB/c apenas infectados com *L. amazonensis* (LLA), *S. mansoni* (SM) ou coinfetados (LLA+SM). A concentração de CCL5 (A); CXCL2 (B); CCL24 (C) CCL17 (D) foi estimada por ELISA em amostras de homogenato pulmonar, de camundongos de todos os grupos experimentais. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). ** representa $p < 0,01$, * representa $p < 0,001$, e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao mono infectado por *S. mansoni*. ## representa $p < 0,01$; #### representa $p < 0,0001$ quando compara ao mono infectado por *L. amazonensis*; a representa $p < 0,05$ aa representa $p < 0,01$ e aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose.**

Quanto ao tipo de infiltrado inflamatório encontrado no fígado foi verificado que os animais mono infectados com *S. mansoni* e os co infectados apresentaram elevada atividade enzimática de NAG e MPO em relação aos não infectado, tanto na fase aguda como na fase crônica da Esquistossomose (FIGURA 31A e C).

Também foi verificado que camundongos co infectados apresentaram atividade de EPO no homogenato hepático elevada em relação aos controles não infectados e este nível foi semelhante ao detectado em animais apenas infectados com *S. mansoni* na fase aguda da Esquistossomose. No fígado de camundongos apenas infectados por *L. amazonensis* a atividade de EPO também foi elevada em relação aos não infectados, mas significativamente menor que nos animais com Esquistossomose, mono ou co infectados. Já na fase crônica a atividade de EPO no fígado de animais mono infectados por *S. mansoni* foi reduzida, o que não é visto nos animais co infectados, ou seja, os animais co infectados apresentam maiores concentrações de EPO que os animais mono infectados por *S. mansoni* e também *L. amazonensis* (FIGURA 31B).

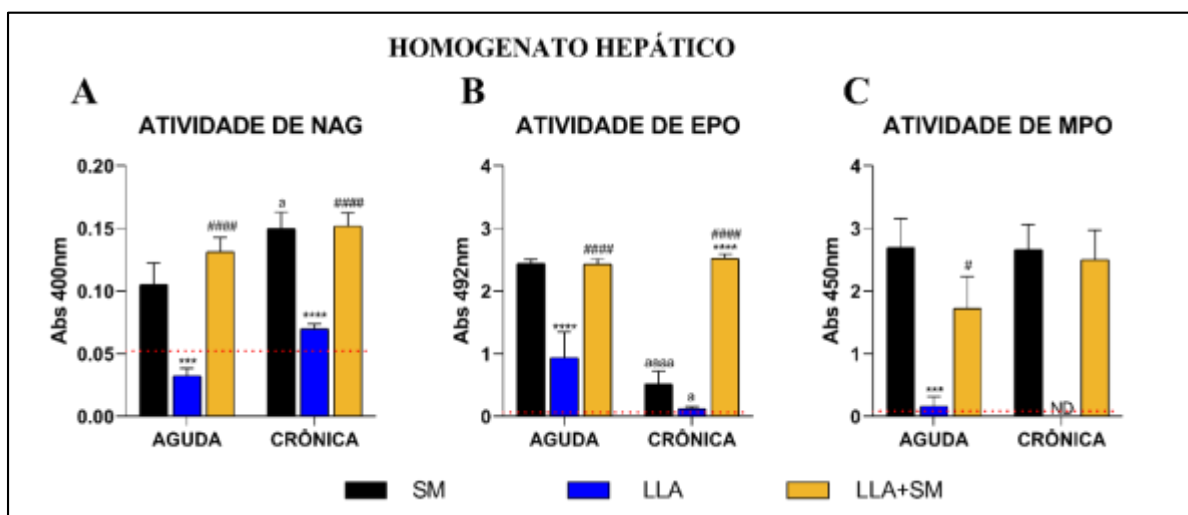


Figura 31 – Determinação indireta de infiltração celular nos tecidos hepático de animais mono infectados com *L. amazonensis*, *S. mansoni* ou co infectados. Atividade enzimática de NAG (A), EPO (B) e MPO (C), durante a fase aguda e crônica encontrados nos animais mono infectados por *L. amazonensis*, *S. mansoni* ou co infectados. Resultados expressos por média \pm erro padrão (Two-way ANOVA seguido de Tukey's como pós-teste). *** representa $p < 0,001$ e **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao mono infectado por *S. mansoni*. # representa $p < 0,05$ e ##### representa $p < 0,0001$ quando compara ao mono infectado por *L. amazonensis*; a representa $p < 0,05$ e aaaa representa $p < 0,0001$ quando compara os animais com mesma exposição entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose. ND representa concentrações não detectáveis ao método de análise. Linha pontilhada representa a média de eritrócitos ou hemoglobina encontrada nos animais controle não infectados.

A análise microscópica do tecido hepático dos animais co infectados de forma geral demonstrou-se semelhante ao dos animais mono infectados por *S. mansoni*. Foi observado

um órgão com uma intensa celularidade granulomatosa, com inflamação perivascular presente, vasos de grande calibre congestionados com sugestiva estenose e *pipestem*; também foram visualizadas regiões com hiperplasia de ductos biliares nas regiões perivascularares além de extensas faixas de fibrose e necrose entre os granulomas. Entretanto, diferente do que foi observado nos animais apenas infectados com *S. mansoni*, o fígado dos animais coinfetados apresentaram aparentemente mais ovos, bem como maior formação de zonas de coalescência entre granulomas. Estas zonas de coalescência foram visualizadas principalmente na fase crônica da infecção, no qual dificilmente eram observados ovos isolados no tecido hepático.

Na fase aguda da Esquistossomose, foi possível observar que o processo inflamatório de granulomas exudativo-produtivo presentes ao redor de ovos retidos no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* foi mais intenso que em granulomas de mesma fase observado em camundongos coinfetados com *L. amazonensis* (FIGURA 32A e FIGURA 32C, respectivamente). Esta diferença resultou em granulomas com área estatisticamente menor nos camundongos coinfetados durante a fase aguda da Esquistossomose (FIGURA 33A). Porém, na fase crônica da Esquistossomose o processo inflamatório dos granulomas hepáticos foi modulado tanto em camundongos monoinfectados como nos coinfetados (FIGURA 31B e FIGURA 31D), sendo que a área dos granulomas foi semelhante em ambos os grupos experimentais (FIGURA 33A).

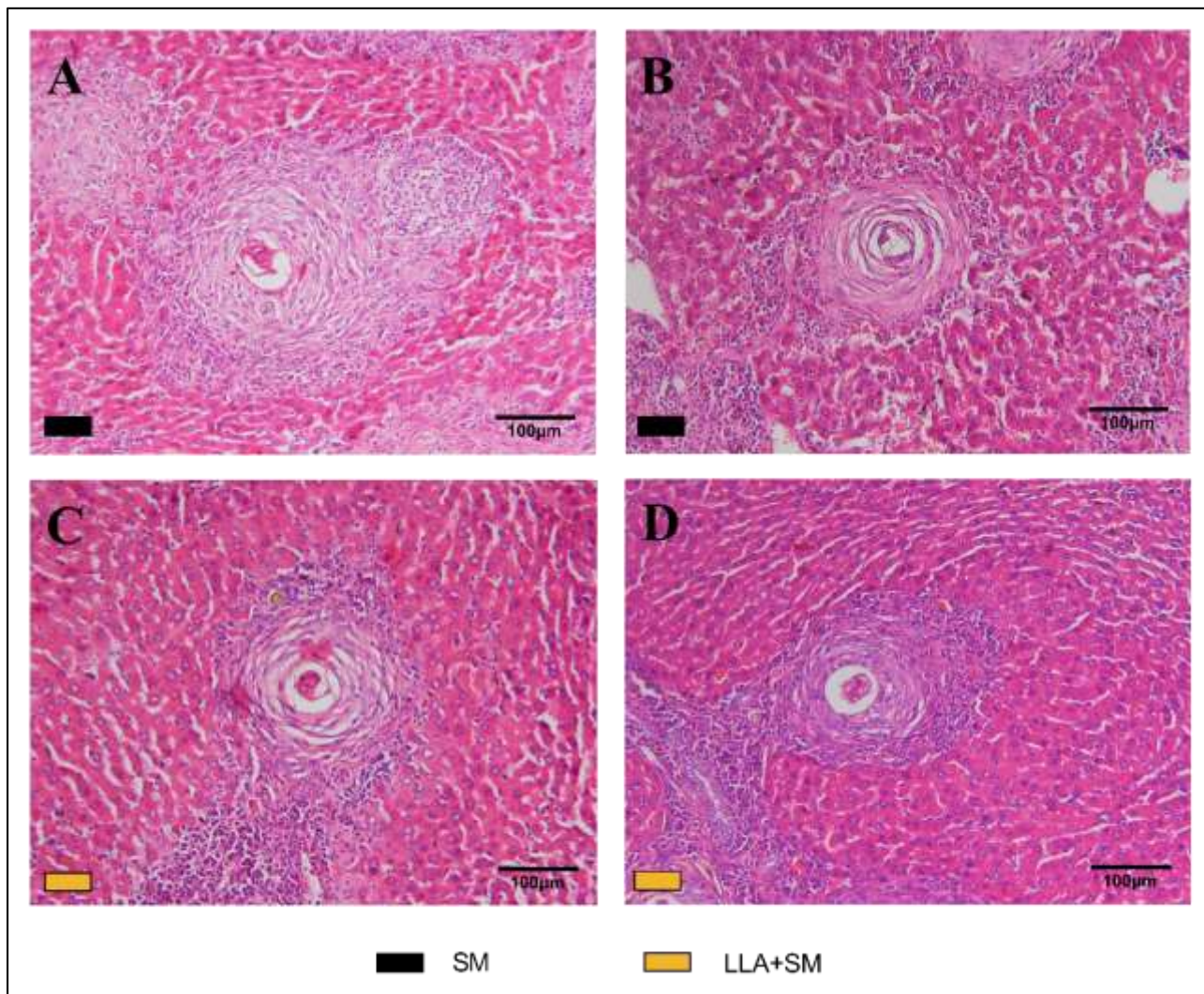


Figura 32 – Cortes histológicas do tecido hepático ilustrativos da lesão esquistossomótica. Granulomas esquistossomóticos no tecido hepático de animais monoinfectado por *S. mansoni* durante a fase aguda (A) e crônica (B) da infecção. Granulomas esquistossomóticos no tecido hepático de animais coinfectados durante a fase aguda (C) e crônica (D) da infecção. As amostras de tecido foram fixadas com formalina tamponada e embebidas em parafina, e as seções de 5 µm foram desparafinizadas e coradas do Hematoxilina-Eosina. As barras representam 100µm. Havia pelo menos 5 animais em cada grupo.

Finalmente, devido as diferenças observadas referente à área do granuloma entre os animais coinfectados e monoinfectados por *S. mansoni*, foi realizado a dosagem de prolina no parênquima hepático. Apesar da diferença na área do granuloma hepático observada na fase aguda da infecção nos animais coinfectados, a relação entre a concentração de hidroxiprolina por ovo retido no tecido foi semelhante em ambos os grupos experimentais e nas diferentes fases da Esquistossomose, sugerindo que a deposição de colágeno não foi significativamente alterada com a coinfeção por *L. amazonensis* (FIGURA 32B).

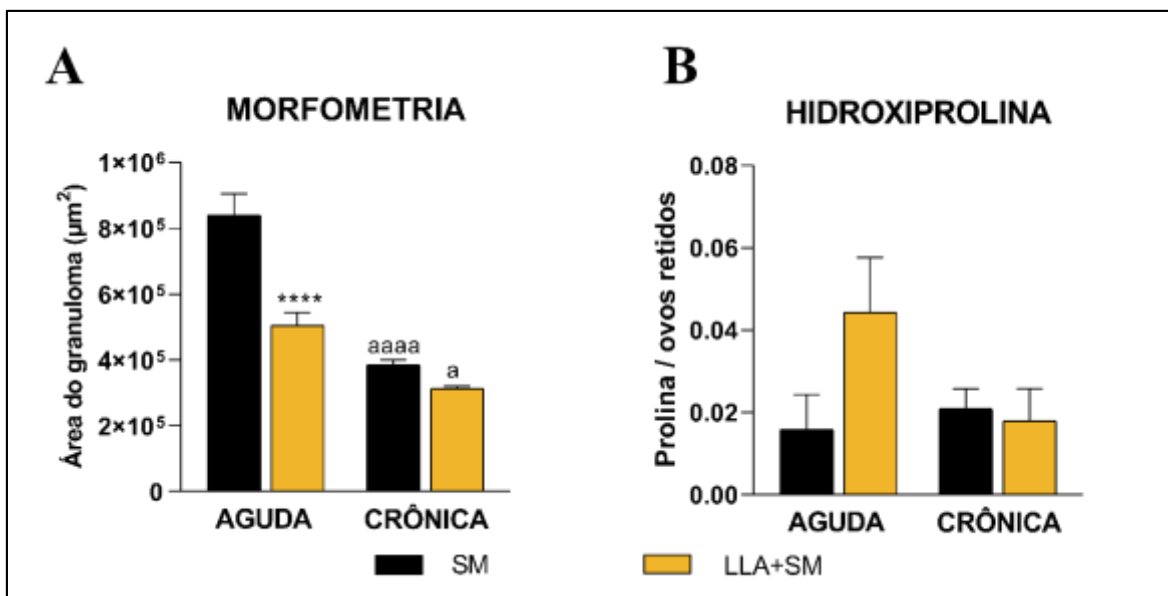


Figura 33. Análise morfométrica dos granulomas e de deposição de colágeno no tecido hepático. A: Área do granuloma hepático dos animais mono infectados por *S. mansoni* ou co infectados. B Razão hidroxiprolina / número de ovos retidos no fígado de animais mono infectados por *S. mansoni* ou co infectados. Resultados expressos média \pm erro padrão (One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test); **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao mono infectado por *S. mansoni*; a representa $p < 0,05$ quando compara os animais com mesmo tratamento entre as fases aguda e crônica da Esquistossomose e aaaa representa $p < 0,0001$.

7. DISCUSSÃO

A existência de casos de coinfeção é frequentemente relatada em estudos epidemiológicos de base populacional. A maioria destes relatos ocorre em países das regiões tropicais e subtropicais do globo (McKENZIE, 2004; PULLAN & BROOKER 2007; OLIVEIRA *et. al*, 2018). No entanto, poucos trabalhos avaliam os efeitos das coinfeções no contexto de morbidade e prognóstico da infecção, e quando o fazem apresentam algumas limitações que precisam ser consideradas, como as dificuldades de avaliar variáveis em populações humanas ou de reproduzir variáveis relevantes em modelos animais. Apesar destas limitações, o presente trabalho foi realizado para preencher algumas lacunas relacionadas às consequências imunopatológicas da coinfeção por *L. amazonensis* e *S. mansoni*, utilizando infecção experimental em camundongos BALB/c.

Os dados reportados neste estudo indicam que a coinfeção alterou de forma bilateral o prognóstico e resposta imune a ambas as infecções. Em síntese, foi observado que em relação à Leishmaniose, a coinfeção por *S. mansoni* foi capaz de diminuir o incremento inflamatório plantar do sítio da infecção, além de reduzir de forma generalizada a produção de mediadores inflamatórios nos órgãos analisados como exposto na figura 34.

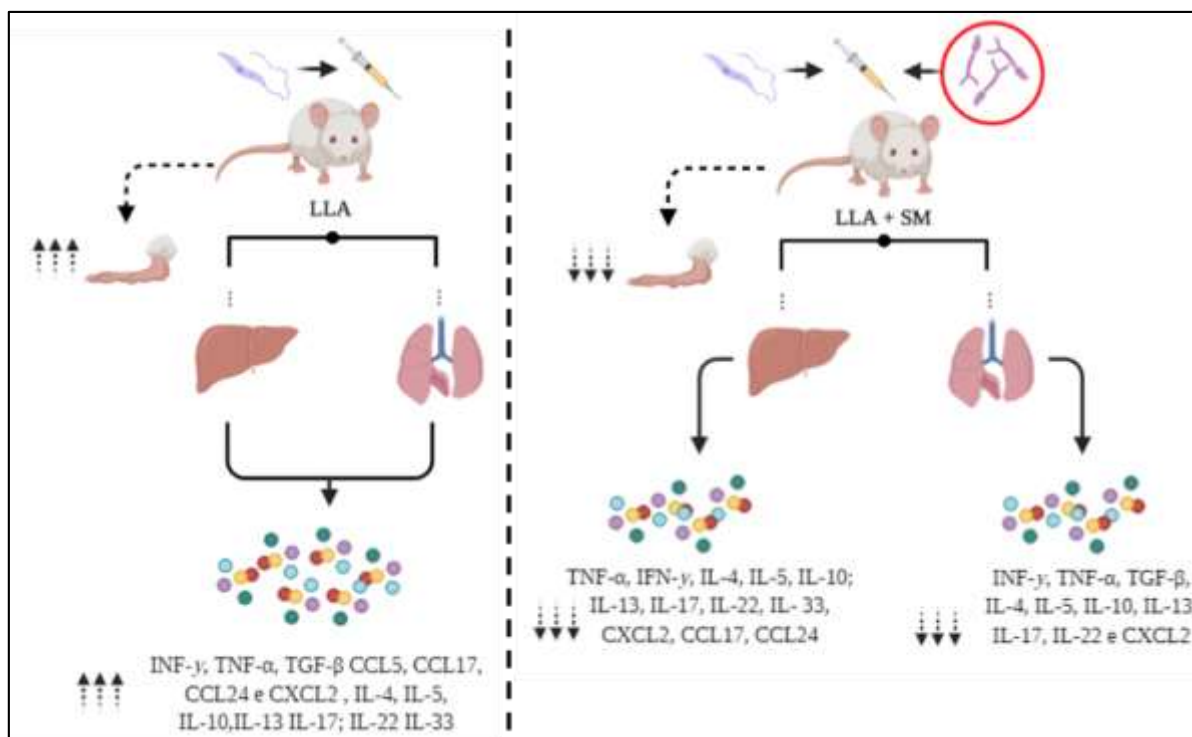


Figura 34 - Resumo das alterações relativas à Leishmaniose encontradas no modelo de coinfeção de *L. amazonensis* e *S. mansoni*.

Interessantemente, mesmo após o estabelecimento de *L. amazonensis*, a infecção por *S. mansoni* foi capaz de alterar a sua evolução, sendo verificado que animais coinfectados apresentaram menor volume edemático no sitio da infecção pelo protozoário. Esta mesma alteração de tamanho e intensidade de lesão também foi detectada por Yoshida *et. al.*, (1999) e La Flamme *et. al.*, (2002) utilizando infecção de camundongos com *S. mansoni* e *L. major*. Em população humana, O'Neal *et. al.*, (2007) também verificaram que os indivíduos infectados com *L. braziliensis* e outros helmintos, incluindo *S. mansoni*, também apresentaram lesões cutâneas menores que os somente infectados pelo protozoário. Entretanto, Khayeka–Wandabwa *et. al.*, (2013) mostraram que os indivíduos coinfectados apresentaram retardo no tempo de cura.

A alteração da intensidade do processo inflamatório induzido pela infecção por *L. amazonensis* observada em camundongos co-infectados por *S. mansoni*, poderia também alterar a sobrevivência/proliferação do protozoário, contribuindo para a diminuição das lesões cutâneas. Entretanto, usando camundongos BALB/c e o protocolo experimental com infecção por *L. amazonenses* progressa à infecção por *S. mansoni*, não foi possível detectar diferença significativa na carga parasitária do protozoário, no decorrer das observações. Nossos resultados contrastam com os dados apresentados por La Flamme *et. al.* (2002), Hassan *et. al.*, (2006) e Lopes *et. al.*, (2018) que observaram que os indivíduos coinfectados com *S. mansoni* possuíam maior susceptibilidade a infecção ou maior carga parasitária de *Leishmania* spp. no modelo de coinfeção com *L. major*, *L. donovani* e *L. braziliensis* respetivamente. O aumento da carga de *Leishmania* spp. estaria associado a um aumento da resposta do tipo 2, induzida por *S. mansoni*, que seria favorável à sobrevivência e crescimento do protozoário (ALEXANDER & BROMBACHER, 2012; McMANNUS *et. al.*, 2018). Vale ressaltar que nosso estudo utilizou a técnica de diluição limitante para estimar a carga de *L. amazonensis*, sendo possível que a estimativa baseada nesta metodologia não seja suficientemente precisa para identificar possíveis diferenças entre os animais coinfectados e monoinfectados, uma vez que, a diluição limitante é uma técnica de quantificação de *Leishmania* spp. menos sensível que as técnicas de PCR em tempo real e com menores risco de perda do ensaio por contaminação (GHOTLOO *et. al.*, 2015). Outra possibilidade é relacionada ao tipo de resposta imune induzida pela infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, que foi caracterizada como uma resposta intensa e sem predomínio

de resposta Th1 (SCORZA *et. al*, 2017) o que pode favorecer a sobrevivência do protozoário em ambos os grupos experimentais, mono e coinfectados.

Consoante ao exposto, a redução da inflamação e do edema plantar não estariam associadas à diminuição da carga parasitária de *L. amazonensis*, e sim decorrente de uma diminuição generalizada da resposta imune induzida pela coinfecção por *S. mansoni*. Essa redução da resposta imune foi demonstrada por meio da redução significativa da concentração de todas as citocinas mensuradas no homogenato pulmonar e hepático dos animais coinfectados em relação aos animais monoinfectados pelo protozoário. Como relatado, as infecções por helmintos são capazes de modular outras morbidades pela indução de múltiplos mecanismos regulatórios. No caso da infecção por *S. mansoni*, o mecanismo mais comum de modulação é pela intensa estimulação de células TCD4+ que elevam os níveis da citocina IL-10 e regulam uma resposta imune exarcebada e inflamatória. (SMITS *et. al*, 2010 MAIZELS 2016; HARRIS & LOKE, 2017; ROLET *et. al*, 2018).

Em primeira análise, os pulmões e fígado dos animais monoinfectados por *L. amazonenses* demonstram níveis mais elevados de todas as citocinas mensuradas em comparação aos animais coinfectados e monoinfectados por *S. mansoni*. A elevada estimulação imunológica pode estar relacionada à capacidade de visceralização de *L. amazonenses*, induzindo uma resposta imune mista e intensa (SCORZA *et. al*, 2017).

Para Gonçalves *et. al*, (2018) a baixa carga parasitária pulmonar de *Leishmania* sp. faz com que o pulmão se torne um órgão negligenciado no estudo da Leishmaniose, tanto humana quanto animal. A infecção deste órgão por *Leishmania* spp pode resultar em quadros comuns de pneumonite intersticial; entretanto, a patogênese e as alterações pulmonares associadas à Leishmaniose permanecem pouco estudadas. Nossos dados indicam que, em animais monoinfectados por *L. amazonenses*, os pulmões revelaram a ativação de um perfil imunológico misto e com aumento significativo nas concentrações de todas as citocinas mensuradas, enquanto que nos animais coinfectados os níveis pulmonares de INF- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22 e CXCL2 foram significativamente menores. Os dados mostram que, mesmo após o estabelecimento de *L. amazonensis*, a coinfecção por *S. mansoni* foi capaz de modular a intensidade da inflamação pulmonar induzida pelo protozoário.

Um efeito de modulação da resposta inflamatória pulmonar pela coinfecção por *S. mansoni* também foi verificado por Layland *et. al* (2013), que observaram a redução da inflamação pulmonar induzida pelo modelo de asma experimental induzido pela imunização

com Ovoalbumina (OVA) em camundongos imunizados com ovos viáveis de *S. mansoni*, sendo o mecanismo modulador associado à ativação de células Foxp3+. A possível indução de mecanismos imunomodulatórios em animais coinfectados pode também estar relacionada ao espalhamento precoce de ovos de *S. mansoni* pelos tecidos do hospedeiro coinfectado em relação aos monoinfectados pelo trematódeo. Os nossos dados revelam que, já na fase aguda da esquistossomose, 90 % dos animais coinfectados apresentavam ovos de *S. mansoni* no parênquima pulmonar, situação que geralmente está relacionada com alterações vasculares detectadas somente na fase crônica da esquistossomose. Nesta situação, é possível que granulomas precocemente modulados não retem os ovos nos tecidos primariamente afetados, fígado e intestino, permitindo um espalhamento sistêmico.

De forma análoga ao observado no pulmão, o fígado dos animais coinfectados também apresentaram modulação na produção das citocinas teciduais TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10; IL-13, IL-17, IL-22, IL-33, CXCL2, CCL17 e CCL24, em comparação ao fígado dos monoinfectados por *L. amazonensis*. É de grande importância chamar a atenção novamente para o fato de que, mesmo após o estabelecimento da *L. amazonensis*, a infecção por *S. mansoni* foi capaz de modificar a resposta imune contra o protozoário.

A ausência de estudos que avaliam a produção de um amplo espectro de citocinas em resposta a infecção por *L. amazonensis* em diferentes órgãos de camundongos BALB/c, como o realizado no presente estudo, limita a discussão mais aprofundada de possíveis mecanismos envolvidos na coinfecção. Ainda assim, estes resultados estão em conformidade ao que La Flame *et. al* (2002) encontraram na coinfecção de *L. major* e *S. mansoni*, com a diminuição nas concentrações de IL-4 na cultura de células de animais coinfectados.

Sob outra perspectiva, no contexto da coinfecção com *L. amazonensis*, a Esquistossomose foi influenciada de forma menos acentuada. Entretanto, algumas alterações, observadas especialmente durante a fase aguda da esquistossomose, merecem discussão. Nesta fase, os animais coinfectados apresentaram redução do número de vermes adultos e modulação do granuloma hepático característico da Esquistossomose, conforme mostrado na figura 35. Além disso, também foi observado que camundongos coinfectados não apresentaram perda de peso e o quadro anêmico observadas na fase aguda da esquistossomose nos animais monoinfectados por *S. mansoni*.

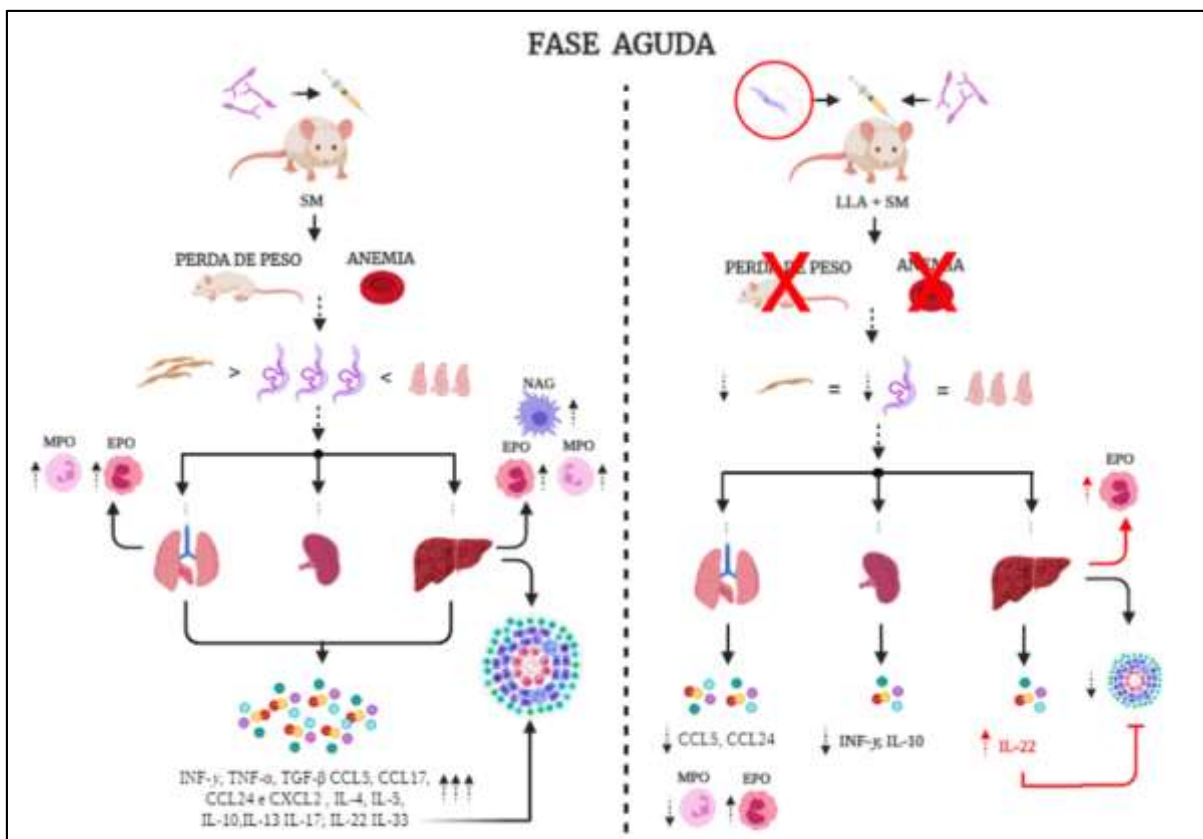


Figura 35 – Resumo das alterações relativas à Esquistossomose aguda encontradas no modelo de coinfecção de *L. amazonensis* e *S. mansoni*. Elementos diagramáticos em vermelho representam o modelo explicativo de mecanismo sugerido.

Vários estudos (FERREIRA *et. al.*, 1993; CHEEVER *et. al.*, 2000; WYNN, 2004; FRIEDMAN *et. al.*, 2005; COLEY *et. al.*, 2014) demonstram que a Esquistossomose induz perda de peso no hospedeiro e associam esta alteração clínica a inúmeras alterações induzidas pelo trematódeo. Entre os fatores que podem estar associados à perda de peso na esquistossomose relata-se redução do consumo alimentar devido a compressão estomacal decorrente da inflamação hepática e esplênica, atrofia generalizada da parede do intestino delgado em consequência da deposição de ovos que resulta em perda de superfície de absorção, e aumento da resposta inflamatória que pode levar a quadros de caquexia. Este quadro também foi verificado no presente estudo nos camundongos mono infectados por *S. mansoni* durante a fase aguda da infecção e foi parcialmente revertido na fase crônica da esquistossomose. Entretanto, a infecção por *S. mansoni* em camundongos previamente infectados por *L. amazonensis* não resultou em perda de peso durante a fase aguda, sugerindo que neste modelo experimental a coinfecção preveniu a perda de peso decorrente da Esquistossomose. Outro sinal clínico importante da Esquistossomose é a anemia, independente da carga parasitária, este sinal está fortemente associado à gravidade dos

quadros intestinais e hepatoesplênicos da doença. Entretanto, os mecanismos envolvidos neste processo ainda são discutíveis e variam desde a possível dificuldade em absorção de ferro, formação de melenas, sequestro esplênico de hemácias, hemólise intravascular mediada por processos autoimune e a intensidade da própria inflamação (FRIEDMAN *et al.* 2005; KING & DANGERFIELD-CHA 2007; COLEY *et. al.*, 2014). Diferente da intensa anemia observada por Midzi *et. al.*, (2010) em crianças coinfectadas com *S. mansoni* e *P. falciparum*, decorrente dos baixos níveis de hemoglobina plasmática, a infecção prévia por *L. amazonensis* resultou em proteção do desenvolvimento da anemia nos camundongos BALB/c coinfectados por *S. mansoni*, impedindo que o número de eritrócitos fosse reduzido durante a fase aguda da infecção. A redução dos sinais de morbidade (perda de peso e anemia) associados a fase aguda da esquistossomose nos camundongos coinfectados pode estar associado à modulação precoce do processo inflamatório dos granulomas observado em animais coinfectados, que pode diminuir as lesões hepáticas e intestinais, causando menor comprometimento da absorção de nutrientes, menor perda de sangue e, conseqüentemente, redução da anemia e da perda de peso. Apesar da melhoria dos sinais clínicos associados à esquistossomose aguda, a coinfeção não alterou a taxa de mortalidade associada a infecção por *S. mansoni* nos animais co-infectados.

Ademais, uma outra via também pode estar impedindo a perda de sangue pelo intestino, por meio de um aumento na produção de plaquetas. Manzillo *et. al.* (2006) e Momo *et. al.* (2014) analisando mielogramas de cães com Leishmaniose Visceral observaram a ocorrência de displasia de células medulares e hiperplasia de megacariócitos, células precursoras das plaquetas. Fato que corrobora com a hipótese de que a produção exacerbada de plaquetas tenha sido consumida para formação do granuloma esquistossomótico, uma vez que Ngaiza & Doenhoff (1990) enfatizam que os ovos de *Schistosoma* spp. são estruturas tromboproliferativas que demandam de plaquetas para sua contensão (granuloma) e excreção. Ainda sob esta perspectiva, é visto que a Esquistossomose grave no modelo murino CBA, causa trombocitopenia ao longo da infecção (Ngaiza & Doenhoff 1987). Além disso, a coinfeção evitou um quadro de hiperhemoglobinemia durante a fase crônica da Esquistossomose, sugerindo que este evento possa estar associado a captação de ferro pela *L. amazonensis* para a manutenção de seu metabolismo (Laranjeira-Silva *et. al.*, 2020) impedindo a síntese do grupo heme da hemoglobina.

Em relação à carga parasitária relativa à infecção por *S. mansoni*, o presente estudo mostra que os camundongos coinfectados apresentaram período pré-patente semelhante aos

monoinfectados por *S. mansoni*, entretanto a análise de eliminação de ovos nas fezes revelou que os animais coinfectados eliminaram mais ovos nas fezes durante a 9ª semana da esquistossomose em comparação aos animais apenas infectados por *S. mansoni* (FIGURA 36), sendo que a partir daí o número de ovos do trematódeo eliminados nas fezes de animais coinfectados foi semelhante aos monoinfectados. Destaca-se que, até o momento, poucos são os trabalhos que avaliaram a cinética de eliminação de ovos nas fezes de *S. mansoni* no contexto das coinfeccções. Nyakundi *et.al*, (2016) também avaliaram a cinética de eliminação de ovos de *S. mansoni* em babuíños coinfectados com este trematódeo e o *Plasmodium knowlesi*. Os autores observaram que o número de ovos eliminados nas fezes de animais coinfectados foi semanalmente semelhante aos animais monoinfectados, durante todo o protocolo experimental. Porém, Nyakundi e colaboradores utilizaram a técnica de Kato-Katz para a quantificação da carga parasitária, que apresenta uma alta especificidade, mas baixa sensibilidade para identificar cargas baixas de infecção por *S. mansoni* (Oliveira *et al*, 2018; Silva-Moraes *et. al*, 2019). Em contraste, os dados apresentados por Fagbemi *et al.* (1987) indicam que camundongos BALB/c coinfectados por *Trypanosoma brucei* e *S. mansoni*, e humanos com histórico de LTA com infecção ativa de *S. mansoni* (Miranda, 2018), apresentaram diminuição na eliminação de ovos do trematódeo em comparação aos monoinfectados.

Ademais, um outro aspecto observado foi a diferença no número de vermes adultos recuperados na circulação mesentérica; os animais coinfectados, durante a fase aguda da Esquistossomose apresentaram quase metade do número de vermes que os animais apenas infectados por *S. mansoni*. Para confirmar a diferença na recuperação de vermes observada na fase aguda da esquistossomose e verificar se o controle ocorria durante o processo de migração de esquistossomose ou só após a maturação dos vermes, foi realizado um outro experimento com maior número de cercárias, para recuperação e contagem de esquistossômulo do pulmão de camundongos mono e coinfectados. Os resultados mostraram que a redução da carga de *S. mansoni* nos animais coinfectados por *L. amazonensis* ocorre ainda durante a migração de esquistossômulos, antes mesmo da chegada nas veias mesentéricas. É possível que o controle dos esquistossômulos durante a migração pulmonar possa estar associado à intensa resposta imune previamente induzida pela infecção por *L. amazonensis*. Intensa resposta imune também foi relatada por Velasquez *et al.* (2016) em camundongos BALB/c com 6 semanas de infecção por *L. amazonensis*, que apresentam elevação da porcentagem de linfócitos CD4 e CD8 produtores de IFN- γ no linfonodo

poplíteo. É interessante mencionar que em camundongos vacinados com cercária irradiada a redução da carga parasitária observada após o desafio com *S. mansoni* também ocorreu durante a migração dos esquistossômulos e foi associada ao aumento da produção de IFN- γ induzido pela vacinação (SMYTHIES *et al.*, 1996; COULSON *et. al.*, 1998).

Por outro lado, Hoffmann *et. al* (1999) observaram que uma resposta imune mista, tipo 1 e 2, é necessária para o controle de formas imaturas do verme. Adicionalmente, Mangoud *et. al* (1998) observaram que animais coinfetados no modelo de *S. mansoni* e *L. infantum* apresentavam granulomas leishmanióticos cardíacos e pulmonares, indicando a importância da resposta inflamatória nestes órgãos. Nossos resultados, apesar de terem sido mensurados após sete semanas da passagem dos esquistossômulos por esse órgão, também mostram que os pulmões dos camundongos infectados com o protozoário apresentam uma intensa resposta imune de perfil misto e esta resposta pode ter contribuído para o controle precoce dos esquistossômulos em animais coinfetados.

Em relação a resposta imune, o que diferencia este trabalho das pesquisas anteriores foi o fato de explorar, além da resposta imune local, a resposta imune de células esplênicas, que possibilita inferir sobre a resposta imune sistêmica do indivíduo. Com isso, foi visto que células esplênicas reestimuladas com SEA, durante a fase aguda da Esquistossomose, apresentaram níveis significativamente maiores de IFN- γ e IL-10 no sobrenadante de cultura dos animais monoinfectados por *S. mansoni* em comparação ao detectado em animais apenas infectados por *L. amazonensis* ou coinfetados, sugerindo que a infecção prévia por *L. amazonensis* foi capaz de modular a produção destas citocinas em resposta a estímulo do ovo. Estudos recentes (LOPES *et al.*, 2019), relatam que células dendríticas e linfócitos autólogos provenientes de indivíduos com LTA e cultivados na presença de antígeno de *S. mansoni* (Sm29) apresentaram expressão aumentada de CD80, CD83, CD86, IL-10 e IL-10R e menor produção de IL-12 em células dendríticas, enquanto que os linfócitos apresentaram elevada expressão de CD28, CTLA-4 e CD25 com conseqüente redução dos níveis de IFN- γ , confirmando o perfil modulatório induzido pelo antígeno do trematódeo. Dessa forma, é possível que as células esplênicas de animais coinfetados por *L. amazonensis* e *S. mansoni* também possam induzir um estado de anergia ou modulação, que interfere no processo inflamatório associado a infecção.

Ainda sob esse contexto, em relação a resposta imune local, foi observado que os pulmões dos animais coinfetados possuíam concentrações reduzidas de CCL5 e CCL24 em relação aos pulmões de animais apenas monoinfectados por *S. mansoni*. Enquanto isso, a

análise indireta do infiltrado celular no parênquima pulmonar demonstrou que os pulmões de animais coinfectados apresentam menor atividade de MPO e maior atividade de EPO durante a fase aguda da infecção em comparação aos animais apenas monoinfectados por *S. mansoni*. Estes dados sugerem que a coinfecção resultou em alteração na infiltração celular pulmonar, com um aumento de eosinófilos e redução de neutrófilos. Recentemente alguns estudos demonstraram que os neutrófilos são células capazes de produzir citocinas e até mesmo, a partir delas, atrair outros neutrófilos via produção de IL-17 (Hoshino, *et. al*, 2008; Li *et. al*, 2010). Além dessa via, já foi relatado que as citocinas CCL5 e CCL24 são capazes de atrair neutrófilos para o sítio da infecção por meio da agregação plaquetária via P-selectina na lesão pulmonar (Grommes, *et. al*, 2012). Dado o exposto, parece que no contexto de fase aguda da coinfecção, os neutrófilos não são tão importantes para conter o dano causado pelos ovos do parasito no parênquima pulmonar, restando aos eosinófilos exercer essa função, como já é relatado, ao ser um bom respondedor à quimiocina CCL24 (SILVEIRA-LEMOS, *et. al*, 2010).

Já em relação a resposta imune hepática não foram observadas alterações imunológicas significativas entre o perfil de citocinas e infiltração celular detectada no fígado de animais monoinfectados com *S. mansoni* e animais coinfectados durante a fase aguda a infecção. Por outro lado, quanto às análises histopatológicas hepáticas, pode-se observar que os granulomas periovulares esquistossomóticos, formados durante a fase aguda da doença, foram significativamente menores nos animais coinfectados do que aqueles formados nos fígados dos animais apenas infectados por *S. mansoni*. Esse achado distoa daqueles esperados nos modelos clássicos de estudo da imunologia da Esquistossomose, uma vez que a expectativa da redução da área do granuloma esquistossomótico seja dependente dos elevados níveis da citocina IL-10 e TGF- β (Abath, *et. al*, 2006; Hebert, *et. al*, 2008), correlação não observada neste trabalho; nem no homogenato hepático e menos ainda no sobrenadante de cultura de esplenócitos. Desta forma, é possível que outras vias imunomodulatória possam ter sido ativadas e atuem de maneira redundante à citocina IL-10.

Já na fase crônica, os animais coinfectados apresentaram peso corporal superior aos animais apenas infectados por *S. mansoni*, mas ainda, mesma taxa de mortalidade, similaridade dos parâmetros hemantimétricos e do número de vermes adultos recuperados. Entretanto, animais coinfectados apresentaram maior número de ovos no fígado, baço e pulmões em relação aos apenas monoinfectados por *S. mansoni* (FIGURA 36).

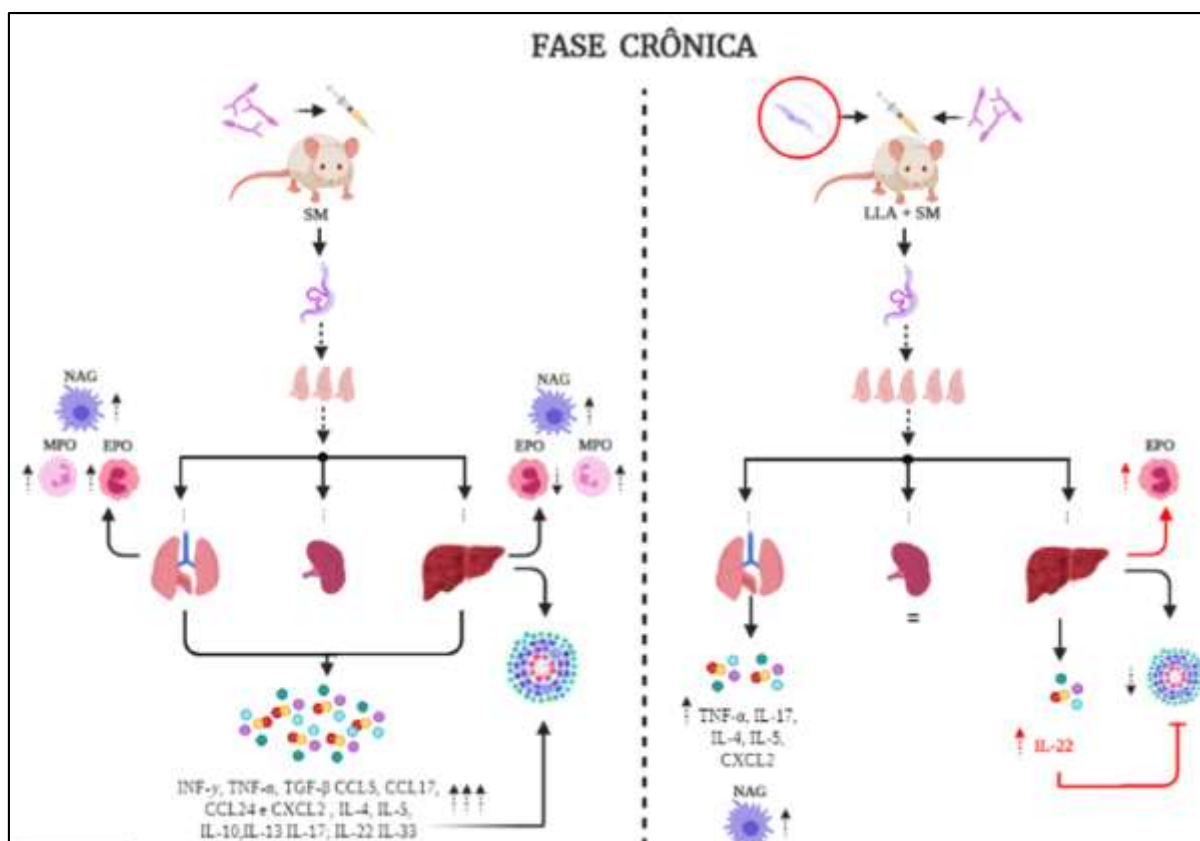


Figura 36 – Resumo das alterações relativas à Esquistossomose crônica encontradas no modelo de coinfeção de *L. amazonensis* e *S. mansoni*. Elementos diagramáticos em vermelho representam o modelo explicativo do mecanismo sugerido.

Esse maior número de ovos retidos nos órgãos dos animais coinfectados durante a fase crônica da Esquistossomose talvez seja, mais uma vez, continuação do efeito imunomodulatório precoce do granuloma que ocorre durante a fase aguda da Esquistossomose, uma vez que já é sabido que para a translocação dos ovos do parasito entre o endotélio vascular e a luz intestinal depende da resposta inflamatória (COSTAIN *et. al*, 2018), sendo possível que a alteração da resposta inflamatória observada nos animais coinfectados durante a fase aguda da esquistossomose pode afetar a saída dos ovos e consequentemente seu acúmulo em órgãos e tecidos. Apesar de ter sido identificado mais

ovos nos tecidos de animais co-infectados o aumento da fecundidade destes vermes não foi estatisticamente significativa. Vale ressaltar que o cálculo da fecundidade para *S. mansoni* ainda é bem discutível, pois não existe um consenso na forma pela qual deve ser avaliada a taxa de fecundidade, se essa deve levar em conta o número de ovos retidos acrescidos ao número de ovos eliminados, ou se deve ser considerado apenas o número de ovos retidos. A inconsistência da forma de apresentação deste parâmetro biológico dificulta possíveis comparações entre os trabalhos e aperfeiçoamento de metodologias. Em contradição aos nossos resultados, La Flame *et. al.*, (2002), observaram que o número de ovos retidos no fígado de animais coinfectedados com *S. mansoni* e *L. major* foi semelhante ao número de ovos encontrados no fígado de animais monoinfectados por *S. mansoni*. No entanto, deve-se levar em consideração que estes autores infectaram os animais primeiramente com *S. mansoni* e só após o seu estabelecimento ocorreram as infecções com *L. major* (La Flame *et. al.*, 2002), indicando que a coinfeção de *L. major* posteriormente ao estabelecimento de *S. mansoni* e/ou com outra espécie do protozoário não foi capaz de alterar significativamente a retenção de ovos no fígado dos animais.

Já em relação ao peso hepático, outro aspecto ligado à morbidade da Esquistossomose, observa-se que o peso hepático dos animais coinfectedados se assemelhou ao peso do órgão de animais monoinfectados por *S. mansoni*. Esta observação também foi relatada por Mahmoud *et. al.*, (1976), na infecção experimental de *S. mansoni* e *T. gondii*. Não obstante, a atividade plasmática de AST e ALT, marcadores de lesão hepática também apresentaram perfil semelhante entre os coinfectedados e monoinfectados por *S. mansoni*, indicando que a infecção por *L. amazonensis* não foi capaz de prevenir de maneira geral o dano hepático oriundo da infecção por *S. mansoni*.

Quanto à resposta imune local durante a fase crônica, foi observado que os pulmões dos animais coinfectedados apresentaram concentrações mais elevadas de CXCL2, IL-4, IL-5 e IL-17 quando comparados aos monoinfectados pelo trematódeo. Essas citocinas estão, juntamente aos mastócitos, correlacionadas a Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas não alérgicas (Narendra & Hanania 2019; Jogdand *et. al.*, 2020; Komi *et. al.*, 2020), que é o caso da Esquistossomose pulmonar crônica, além de níveis mais elevados de TNF- α . O aumento da concentração de IL-17, é especialmente preocupante, pois esta citocina tem sido associada com o desenvolvimento de processos fibroproliferativos. Wilson *et. al.*, (2010) e Braun *et. al.* (2008) demonstraram que a produção da citocina IL-17 estimula processos fibroproliferativos através de uma via secundária, diferente da via mais conhecida mediada

por IL-13, que é dependente de TGF- β , mas ainda não foi completamente elucidada. Adicionalmente, Nady *et. al* (2017) utilizaram granulócitos recuperados de indivíduos com infecção ativa de *S. mansoni* e induziram *in vitro* a formação do granuloma esquistossomóticos na presença de IL-17. O estudo demonstra que a estimulação com IL-17 acelera a formação de granuloma induzido por SEA, inibe as funções granulocíticas das células obtidas dos doadores e diminui a concentrações de TNF- α . As alterações no perfil de citocinas observada no pulmão dos camundongos coinfeccção de *L. amazonensi* e *S. mansoni*, também pode indicar um aumento de fibrose durante a fase crônica da esquistossomose nos animais previamente infectados por *L. amazonenses*, entretanto, não foi detectado redução da produção de TNF- α , como observada no modelo *in vitro*.

A maior atividade da enzima NAG sugere uma maior infiltração/ativação de macrófagos no tecido pulmonar de camundongos coinfectados durante a fase crônica da Esquistossomose. Acerca disso, os macrófagos são as mais numerosas células presentes no tecido pulmonar, além de serem as células mais plásticas do sistema hematopoiético (WYNN *et. al*, 2013). Apesar da grande diversidade funcional, existem basicamente dois grandes grupos de macrófagos, os macrófagos classicamente ativados ou M1 (pró-inflamatórios produtores de citocinas do perfil Th1), e os macrófagos M2 ou alternativamente ativados (anti-inflamatórios e imunorreguladores produtores de citocinas do perfil Th2 ou Treg) (FUNES *et. al*, 2018; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Assim como outras infecções helmínticas, a infecção por *S. mansoni* induz um perfil de macrófagos alternativamente ativados (BESCHIN *et. al*, 2012; RÜCKERL & COOK, 2019). A ativação de macrófagos M2 acontece basicamente pelo estímulo das citocinas IL-4, IL-10 e/ou IL-13. Ademais, a citocina IL-33 pode amplificar a ativação do fenótipo M2 via IL-13, resultando em regulação positiva da arginase-1 (Arg-1), CCL17 e CCL24, que estimula o recrutamento de eosinófilos para o pulmão e a inflamação das vias aéreas (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2009).

Sob outra perspectiva, o fígado de animais coinfectados revelaram níveis mais elevados apenas de IL-22 quando comparado ao fígado de animais monoinfectados por *S. mansoni* durante a fase crônica da Esquistossomose. A citocina IL-22 é um membro da família da IL-10 e a ativação da via IL-22 é sinalizada via STAT3; no entanto, ao contrário da IL-10, pouco se sabe sobre a IL-22. Na resposta do hospedeiro aos diversos tipos de infecção é sabido que esta citocina está envolvida nos processos de reparo e prevenção do dano tecidual (RENAULD *et. al*, 2003; WU *et. al*; 2008). Sertorio *et. al* (2015) analisaram

a resposta imune de células de indivíduos infectados, moradores de uma região endêmica para Esquistossomose, cultivadas na presença de ovos de *S. mansoni*. Com as concentrações de citocinas do sobrenadante, desenhou um modelo de correlação para avaliar quais fatores estão envolvidos na fibrose induzida pela Esquistossomose. O grau de fibrose foi avaliado por ultrassonografia hepática, selecionando medidas associadas a detecção de hipertensão portal, estenose vascular e outros parâmetros. O estudo revelou que o diâmetro da veia porta dos indivíduos estudados foi inversamente correlacionado com os níveis de IL-22, ou seja, altos níveis de IL-22 estão associados à proteção contra os estágios mais graves da fibrose hepática. Isso ocorreu devido ao controle efetivo da fibrose hepática e não à proteção de infecções sucessivas.

Apesar da concentração de IL-22 no homogenato hepático de animais coinfectados só apresentar aumento significativo durante a fase crônica da Esquistossomose, é possível que a redução da área da reação granulomatosa periovular detectada na fase aguda da esquistossomose dos animais coinfectados possa ter a participação de mecanismos modulatórios estimulados pela produção de IL-22, assim como descrito por Sertorio *et. al* (2015). Esse resultado de animais coinfectados apresentando granulomas com áreas menores em relação aos monoinfectados por *S. mansoni* é fortalecido pelos dados de Nady *et. al* (2017) em modelo de formação de granuloma *in vitro*. Estes autores demonstraram que a adição de IL-17 na cultura promove formação de granuloma, enquanto que a estimulação com IL-22 não tem este efeito. De maneira interessante, ao estimular a cultura com as duas citocinas simultaneamente, além de inibir a IL-17, a citocina IL-22 impediu a formação de granuloma e acentuou a atividade dos granulócitos.

Na fase crônica da esquistossomose, a área do granuloma foi reduzida em ambos os grupos de animais, mono e coinfectados. Em animais monoinfectados, a modulação do granuloma hepático decorre do aumento progressivo das citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β , que responsável por reduzir o tamanho da reação granulomatosa periovular, diminuindo o infiltrado celular e consequente danos gerados pela degranulação das células polimorfonucleares, principalmente eosinófilos (PEARCE & MCDONNALD, 2002; DUNNE & COOKE, 2005; KAMDEM *et. al*, 2018). Aparentemente, os dados indicam que este processo não foi significativamente alterado nos animais coinfectados, onde também não foi verificado aumento significativo do dano hepático, avaliado pela atividade de transaminases hepáticas em relação aos mo infectados. Entretanto, é importante verificar que na fase crônica da Esquistossomose nos animais coinfectados a atividade de EPO não foi

reduzida no homogenato hepático, sugerindo que a infiltração de eosinófilos não foi modulada nestes animais. Contrastando ao exposto, Bersnard *et. al*, (2011) demonstraram que no modelo de alergia e asma que camundongos competentes para IL-22 possui baixas concentrações de IL-13, IL-5 e eosinófilos. Shabsavan *et. al*, (2019) também demonstraram, em humanos com rinite alérgica, que altos níveis plasmáticos de IL-22 estão fortemente correlacionados com a diminuição do infiltrado eosinófilo na mucosa nasal.

Por fim, foi visto que as concentrações de hidroxiprolina por ovos por grama de tecido hepático analisado foi semelhante entre animais coinfectados e monoinfectados por *S mansoni*. Estes achados corroboram a possível ação modulatória da citocina IL-22, responsável por diminuir as concentrações de citocinas fibroproliferativas e que as alterações morfométrias encontradas no granuloma de animais coinfectados não é fruto somente da deposição de colágeno, mas também da intensidade de células infiltrativas do parênquima hepático.

Contudo, é perceptível a importância de se estudar os modelos de coinfeção, não só para avaliar o prognóstico da morbidade ou entender os processos imunopatológicos gerais envolvidos nesta relação, mas também para utilizar das considerações desse processo para inferir em estratégias para a melhoria do manejo destas importantes parasitoses.

8. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho confirmam a hipótese de que a infecção por *S. mansoni* em camundongos previamente infectados por *L. amazonensis* altera a resposta imunológica e patologia associada à cada infecção isoladamente.

No caso da Leishmaniose, a coinfeção com *S. mansoni*, mesmo com três semanas de estabelecimento da *L. amazonensis*, não foi capaz de alterar a carga parasitológica do protozoário, mas foi responsável por reduzir significativamente a intensidade da resposta imune sistêmica induzida pelo protozoário durante todo o período de análise, resultando em significativa redução da lesão de pata.

Já no caso da Esquistossomose, a infecção prévia por *L. amazonensis* resultou em redução do número vermes e preveniu a perda de peso e a anemia que ocorre durante a esquistossomose aguda. A modulação da morbidade de fase aguda da Esquistossomose pode ser associada à redução do número de vermes, e redução da inflamação granulomatosa induzida pela deposição de ovos nos tecidos, uma vez que os granulomas hepáticos foram estatisticamente menores nos camundongos coinfectados. Nossos resultados revelam que a redução da carga de *S. mansoni* nos animais previamente infectados por *L. amazonensis* ocorreu nos primeiros dias da infecção, ainda durante a migração de esquistossomulo pelo pulmão dos animais infectados e pode ter sido influenciado pela resposta imune induzida pelo protozoário

Na fase crônica da Esquistossomose, as diferenças entre os camundongos monoinfectados e coinfectados foram menos intensas; entretanto, um desbalanço da resposta imune foi mais evidente no perfil de citocinas pulmonares, que apresentou alterações mais expressivas que nos outros órgãos dos animais coinfectados. A sensibilização prévia dos órgãos contra a infecção por *L. amazonensis* resultou em resposta inflamatória pulmonar mais intensa e mista, com aumento tanto de citocinas de perfil Th1, Th17 e Th2, levando à maior infiltração de neutrófilos e macrófagos nos animais coinfectados. Estes resultados sugerem que na evolução crônica da Esquistossomose o perfil modulatório observado nos animais previamente infectados por *L. amazonensis* pode ser revertido. Entretanto, no fígado dos animais coinfectados este desbalanço da resposta imune não foi verificado, podendo estar associado ao papel modulador da produção aumentada de IL-22 observada neste órgão.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C., MORAIS, C. N. L., MONTENEGRO, C. E. L., WYNN, T. A., & MONTENEGRO, S. M. L. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends Parasitol**, 22(2), 85–91, 2006. doi:10.1016/j.pt.2005.12.004
- ALEXANDER J.; BROMBACHER F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Front Immunol**, 3:1-13, 2012. doi: 10.3389/fimmu.2012.00080. eCollection 2012.
- ALEIXO J.A. *et. al.* Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 100: 79-82, 2006. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.06.025
- ALEXANDER J.; RUSSELL D.G. The Interaction of *Leishmania* Species with Macrophages. **Adv Parasitol**, 31:175–254, 1992. doi:10.1016/s0065-308x(08)60022-6
- ALVAR J, *et. al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, 2;7(5):e35671, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671
- ANDRADE B.B.; DE OLIVEIRA, C.I.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scand J Immunol**, 66(2-3), 122–127, 2007. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01964.x.
- ANDRADE, Z.A.; WARREN, K.S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 58:53-57, 1964. doi: 10.1016/0035-9203(64)90068-9.
- ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol**. 6(10), 392–401, 1998. doi:10.1016/s0966-842x(98)01324-9
- ANVERSA L.; TIBURCIO, MGS, RICHINI-PEREIRA VB, RAMIREZ LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev Assoc Med Bras**, 64(3):281-289, 2018. doi: 10.1590/1806-9282.64.03.281.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonose. **Int J Parasitol**, 1269-81. 2000. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00136-3.
- ATAYDE, V.D.; HASSANI, K.; DA SILVA LIRA FILHO, A.; BORGES, A.R.; ADHIKARI, A.; MARTEL, C.; OLIVIER, M. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cell Immunol**, 309, 7–18, 2016. doi:10.1016/j.cellimm.2016.07.013

- BAFICA, A.M.B., *et al.* Chances in T-Cell and Monocyte Phenotypes *In Vitro* by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients. **J Parasitol Res**, 1-10, 2012.
- BAFICA, A.M.B. *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 106: 856-863, 2011.
- BARBOSA, M.A.; PELLEGRINO, J.; COELHO, P.M.Z.; SAMPAIO, L.B.M. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. **Rev. Int. Med. Trop.**, 20: 121-132, 1978.
- BARRAL, A.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; GRIMALDI, J.R.M.; MOMEM, H.; CARVALHO, E.M. Isolation of *Leishmania Mexicana Amazonensis* from the Bone Marrow in a Case of American Visceral Leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 35, 4: 732 – 734, 1986. doi:10.4269/ajtmh.1986.35.732
- BARRAL, A., *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**, 44(5):536-46, 1991. doi: 10.4269/ajtmh.1991.44.536.
- BARCELOS, L.S., *et al.* Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **J Leuk Biol**; 78 (2) 352–358, 2005. doi: 10.1189/jlb.1104682.
- BATES, P.A. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. **Parasitology**; 108; 1-9, 1994a. DOI: 10.1017/s0031182000078458
- BATES, P.A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.** 79 (2): 215-218, 1994b. doi: 10.1006/expr.1994.1084.
- BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Curr Mol Med**, 4, 601-9, 2004. DOI: 10.2174/1566524043360285
- BAZZONE, L.E.; *et al.* Coinfection with the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* markedly reduces hepatic egg-induced immunopathology and proinflammatory cytokines in mouse models of severe schistosomiasis. **Infect Immun**, 76(11):5164-72, 2008. doi: 10.1128/IAI.00673-08.
- BESCHIN A, DE BAETSELIER P., & VAN GINDERACHTER, J. A. Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection. **J Pathol**, 229(2), 186–197, 2012. doi:10.1002/path.4112
- BICKLE, Q.D.; SOLUM, J.; HELMBY, H. Chronic intestinal nematode infection exacerbates experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Infect. Immun**, 76, 5802–5809, 2008.
- BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Med Microbiol Immunol**, 204(6), 619–634, 2015. doi:10.1007/s00430-015-0422-1

- BISANZIO, D.; MUTUKU, F.; BUSTINDUY, A.L.; MUNGAI, P.L.; MUCHIRI, E.M.; KING, C.H.; KITRON, U. Cross-sectional Study of the Burden of Vector-Borne and Soil-Transmitted Polyparasitism in Rural Communities of Coast Province, Kenya. **PLoS Negl Trop Dis**, 8(7): e2992, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0002992.
- BOISSON, S, *et al.* Water, Sanitation and Hygiene for accelerating and sustaining progress on Neglected Tropical Diseases: A new Global Strategy 2015-20. **Int Health**; 8(Suppl 1), i19–i21, 2016. doi: 10.1093/inthealth/ihv073.
- BORGES, D.S.; DE SOUZA, J.S.; ROMANZINI, J.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Seeding experiments demonstrate poor performance of the hatching test for detecting small numbers of *Schistosoma mansoni* eggs in feces. **Parasitol Int**, 62(6), 543–547, 2013. doi:10.1016/j.parint.2013.08.002
- BOROS, D.L.; WARREN, K.S. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **J Exp Med**, 132(3), 488–507, 1970. doi:10.1084/jem.132.3.488
- BOROS, D.L. The Role of Cytokines in the Formation of the Schistosome Egg Granuloma. **Immunobiology**, 191(4-5), 441–450, 1994. doi:10.1016/s0171-2985(11)80450-x
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoní : diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 144 p. : il.**
- BRASIL – Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.**
- BRASIL – Situação epidemiológica: esquistossomose. **Ministério da Saúde**. 2017. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 08 Ago de 2018.
- BRAUN, R.K., *et al.* IL-17 Producing $\gamma\delta$ T Cells are Required for a Controlled Inflammatory Response after Bleomycin-induced Lung Injury. **Inflammation**, 31(3), 167–179, 2008. doi:10.1007/s10753-008-9062-6
- BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, 15;392(10151):951-970, 2018. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- BUTROUS G. Schistosome infection and its effect on pulmonary circulation. **Glob Cardiol Sci Pract**, 1:5, 2019. <https://doi.org/10.21542/gcsp.2019.5>
- CARDOSO, D.T.; DE SOUZA, D.C.; DE CASTRO, V.N.; GEIGER, S.M.; BARBOSA, D.S. Identification of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial

analysis approaches in Southeastern Brazil. **BMC Infect Dis**, 19:1, 2019. doi: 10.1186/s12879-019-3940-4.

CARVALHO, O. Dos S. Intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 87(suppl 4), 307–309, 1992. doi:10.1590/s0074-02761992000800048

CHANG, K.P. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. **Int Rev Cytol Suppl.** 14:267-305, 1983.

CHEEVER, A.W. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide Digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. **Bull World Health Organ**; 39(2): 328-331, 1968.

CHEEVER, A.W.; MACEDONIA, J.G.; MOSIMANN, J.E.; CHEEVER, E.A. Kinetics of Egg Production and Egg Excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in Mice Infected with a Single Pair of Worms. **Am J Trop Med Hyg**, 50,3:281–295, 1994. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.281>

CHEEVER, A. W., HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today**, 21(9), 465–466, 2000. doi:10.1016/s0167-5699(00)01626-1

CHEEVER, A.W.; LENZI, J.A.; LENZI, H.L.; ANDRADE, Z.A. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 97 (7):917-940, 2012. Doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700002>

CHENSUE, S.W., *et. al.* Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. **J Immunol.** 1;163(1):165-73, 1999.

CHRISTENSEN, N.O.; NANSEN, P.; FRANDBSEN, F.; BJORNEBOE, A.; MONRAD, J. *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*—cross-resistance in mice. **Exp. Parasitol.** 46, 113–120, 1978.

CHUAH, C.; JONES, M.K.; BURKE, M.L.; MCMANUS, D.P.; GOBERT, G. N. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends Parasitol**, 30(3), 141–150, 2014. doi:10.1016/j.pt.2013.12.009

COELHO, J.R.; BEZERRA, F.S.M. Theeffectsof temper- ature change on the infection rate of *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101, 223–224, 2006. DOI: 10.1590/s0074-02762006000200016

COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E.; KING. C.H. Human schistosomiasis. **Lancet**; 383:2253-2264, 2014. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2.

COLEY, D.G.; SECOR, W.E. Immunology of Human Schistosomiasis. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**; 36(8), 347–357, 2014. doi:10.1111/pim.12087

COSTAIN, A.H.; MACDONALD, A.S.; SMITS, H.H. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. **Front Immunol**, 9, 2018 .doi:10.3389/fimmu.2018.03042

COULSON, P. S. Nitric oxide produced in the lungs of mice immunized with the radiation-attenuated schistosome vaccine is not the major agent causing challenge parasite elimination. **Immunology**, 93(1), 55–63, 1998. doi:10.1046/j.1365-2567.1998.00405.x

COURA, J.R. *et. al.* Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro. Estudo de 22 casos. **Rev Soc Bras Med Trop**, 8: 193-198, 1970.

Da COSTA, S.M.; CORDEIRO, J.L.P.; RANGEL, E.F. Environmental suitability for *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and the occurrence of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Parasit Vectors**; 7;11(1):155, 2018. doi: 10.1186/s13071-018-2742-7

DAVID SIBLEY, L. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol Reviews**, 240(1), 72–91, 2011. 10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x

De MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; da ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasit Vectors**, 2016 9(1). doi:10.1186/s13071-016-1540-3

DESPRES, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; COMBES, C.; BONHOMME, F. Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of schistosomes (Platyhelminthes: Trematoda). **Mol Phylogenet Evol**, 1992 1(4), 295–304. 10.1016/1055-7903(92)90005-2

DINIZ, M.M.C.S.L.; OVALLOS, F.G.; GOMES, C.M.C.; LAVITSCHKA, C.O.; GALATI, E.A.B. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasit Vectors**, 7:139, 2014. doi: 10.1186/1756-3305-7-139.

DUNNE, D.W.; LUCAS, S.; BICKLE, Q.; PEARSON, S.; MADGWICK, L.; BAIN, J.; DOENHOFF, M.J. Identification and partial purification of an antigen (ω1 from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 75(1), 54–71, 1981. doi:10.1016/0035-9203(81)90013-4

DUNNE, D.W.; PEARCE, E.J. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. **Microbes Infect**, (1) 533-560, 1999. 10.1016/s1286-4579(99)80095-1

DUNNE, D.W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Rev**, 5:420-426, 2005. doi: 10.1038/nri1601.

FAGBEMI, B.O.; Christensen, N.O. DIPEOLU. O.O., (1987) *Trypanosoma brucei* and *Babesia microti* infection on the primary granulomatous reaction to *Schistosoma* eggs in mice. **La. Anim**. 21, 121-124, 1987. doi: 10.1177/002367728702100207

FERREIRA, H. S.; COUTINHO, E. M.; TEODÓSIO, N. R.; CAVALCANTI, C. L.; SAMICO, M. J. A. Intestinal protein absorption in malnourished mice with acute

schistosomiasis mansonii. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 88(4), 581–587, 1993. doi:10.1590/s0074-02761993000400015

FRIEDMAN, J. F.; KANZARIA, H. K.; MCGARVEY, S. T. Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms. **Trends in Parasitol**, 21(8), 386–392, 2005. doi:10.1016/j.pt.2005.06.006

FUNES, S. C.; RIOS, M.; ESCOBAR-VERA, J.; KALERGIS, A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, 154(2), 186–195, 2018. doi:10.1111/imm.12910

GOTO, H; LAULETTA LINDOSO, J.A. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect Dis Clin N Am**; 26:293–307, 2012. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.001

FERRERAS, M.C., *et al.* Histopathological and immunohistochemical study of lambs experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis*. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health** 47, 763–773, 2000. 10.1046/j.1439-0450.2000.00410.x

FORD, M.J.; TAYLOR, M.G.; MCHUGH, S.M.; WILSON, R.A.; HUGHES, D.L. Studies on heterologous resistance between *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica* in inbred rats. **Parasitology**, 94, 55–67, 1987.

GHARIB, B.; ABDALLAHI, O.M.S.; DESSEIN, H.; REGGI, M.D. Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **J Hepat**, 30(4), 594–602, 1999. doi:10.1016/s0168-8278(99)80189-5

GENARO, O.; BRENER, Z.; COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni*: immunodepression of hepatic schistosome granuloma formation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 19, 35–37, 1986. doi: 10.1590/s0037-86821986000100008.

GENTILE R, NETO SFN, D'ANDREA OS (2010). Uma revisão sobre a participação do rato d'água *Nectomys squamipes* na dinâmica de transmissão da esquistossomose mansônica: um estudo multidisciplinar de longo prazo em uma área endêmica. **Rev. Oecol Aust**; 14(3):711-725, 2010. Disponível em: <http://www.oecologiaaustralis.org/ojs/index.php/oa/article/view/oeco.2010.1403.07>.

GHOTLOO, S.; HAJI MOLLAHOSEINI, M.; NAJAFI, A.; YEGANEH, F. Comparison of Parasite Burden Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay and Limiting Dilution Assay in *Leishmania major* Infected Mouse. **Iran J Parasitol**, 10(4):571-6, 2015.

GLASS, E.J.; CRUTCHLEY, S.; JENSEN, K. Living with the enemy or uninvited guests: Functional genomics approaches to investigating host resistance or tolerance traits to a protozoan parasite, *Theileria annulata*, in cattle. **Vet Immunol Immunopathol**, 148(1-2), 178–189, 2012. doi:10.1016/j.vetimm.2012.03.006

- GONÇALVES, R.; SILVA, S.O.; DE ALMEIDA, G.G.; DE SOUZA, C.C.; TAFURI, W.L.; NORMA MELO, M. Detection of *Leishmania infantum* DNA in the non-parasitized lung of dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 2018. doi:10.1186/s12917-018-1730-7
- GRAHAM, C.F. A device for the diagnosis of *Enterobius* infection. *Am J Trop Med*; 1–21(1):159–161, 1941.
- GREEN, A.P.; MANGAN, F.; ORMEROD, J.E. Induction of cell infiltration and acid hydrolase release into the peritoneal cavity of mice. *Inflammation*; 4:205–213, 1980.
- GROMMES, J. *et al.* Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 628–636, 2012.
- GRYSEELS, G. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin N Am* 26: 383-397, 2012.
- HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P.G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol*; 4: 89-97, 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00089.
- HARRIS, N.L.; LOKE, P. Recent Advances in Type-2-Cell-Mediated Immunity: Insights from Helminth Infection. *Immunity*, 47(6), 1024–1036, 2017. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.015.
- HASSAN, M.F.; ZHANG, Y.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M.; SHARP, H.; BICLE, Q.D. The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. *Am. J. Pathol.* 169, 943-953, 2006. DOI: 10.2353/ajpath.2006.051319
- HERBERT, D. R.; OREKOV, T.; PERKINS, C.; FINKELMAN, F. D. IL-10 and TGF-Redundantly Protect against Severe Liver Injury and Mortality during Acute Schistosomiasis. *J Immunol*, 181(10), 7214–7220, 2008. doi:10.4049/jimmunol.181.10.7214
- HIATT, R.A.; SOTOMAYOR, Z.R.; SANCHEZ, G.; ZAMBRANA, M.; KNIGHT, W.B. Factors in the Pathogenesis of Acute Schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis*, 139(6), 659–666, 1979. doi:10.1093/infdis/139.6.659
- HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. *Nature* 212(5068), 1385–1386, 1956. doi:10.1038/2121385a0.
- HOSHINO, A. *et al.* MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. *J. Autoimmun.* 31, 79–89, 2008.
- HOTEZ, P.J.; BRINDLEY, P.J.; BETHONY, J.M.; KING, C.H.; PEARCE, E.J.; JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest*; 118(4):1311–1321, 2008. doi: 10.1172/JCI34261.

INCANI, R.N.; MCLAREN, D.J. Histopathological and ultrastructural studies of cutaneous reactions elicited in naive and chronically infected mice by invading schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Int J Parasitol**, 14(3), 259–276, 1984. doi:10.1016/0020-7519(84)90077-8

JOGDAND P., *et al.* Eosinophils, Basophils, and Type 2 Immune Microenvironments in COPD-Affected Lung Tissue. **Eur Respir J**. 14. pii: 1900110, 2020. doi: 10.1183/13993003.00110-2019.

JIA, L.; WU, C. The Biology and Functions of Th22 Cells. T Helper Cell Differentiation and Their Function, **Adv Exp Med Biol**, 209–230, 2014. doi:10.1007/978-94-017-9487-9_8

KATSUMATA, T.; KOHNO, T. YAMAGUEHI, K.; HARA, K.; AOKIK, K. Hatching of *Schistosoma mansoni* eggs is a Ca²⁺/calmodulin-dependent process. **Parasitol Res** 76: 90-91, 1989. doi: 10.1007/BF00931079.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintos**. – Belo Horizonte: CPqRR, 2018.

KAMDEM, S.D.; MOYOU-SOMO, R.; BROMBACHER, F.; NONO, J.K. Host Regulators of Liver Fibrosis During Human Schistosomiasis. **Front Immunol**. 2018; 9:1-9.

KING, C.H.; DANGERFIELD-CHA, M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. **Chronic Illness**, 4(1), 65–79, 2018. doi:10.1177/1742395307084407

KHAYEKA-WANDABWA, C., *et al.* 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. doi: 10.1186/1756-3305-6-244.

KLING, J.C.; KÖRNER, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. **Internat J Parasitol**, 43(6), 417–425, 2013. doi:10.1016/j.ijpara.2013.02.001

KLOETZEL, K.; FALEIROS, J.; MENDES, S.R.; STANLEY, C.T.; ARIAS, H.S. Concomitant infection of albino mice by *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni* parasitological parameters. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 67 (5): 652-658, 1971.

KNIGHT, M. *et al.* Susceptibility of snails to infection with schistosomes is influenced by temperature and expression of heat shock proteins. **Epidemiol**, 5, 189(Sunnyvale), 2015. doi: 10.4172/2161-1165.1000189

KOMI, D.E.A.; MORTAZ, E.; AMANI, S.; TIOTIU, A.; FOLKERTS, G.; ADCOCK, I.M. The Role of Mast Cells in IgE-Independent Lung Diseases. **Clinic Reviews Allergy Immunol**, 2020. doi:10.1007/s12016-020-08779-5

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 **Cells. Ann Review Immunol**, 27(1), 485–517, 2009. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710

KRISHNAMURTHY, D.; KATSIKIS, G.; BHARGAVA, A.; PRAKASH, M. *Schistosoma mansoni* cercariae swim efficiently by exploiting an elastohydrodynamic coupling. **Nature Physics**, 13(3), 266–271, 2016. doi:10.1038/nphys3924

LA FLAMME, A.C.; SCOTT, P.; PEARCE, E.J. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. **Parasite Immunol**; 24: 339-345, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-3024.2002.00473.x

LACORCIA, M.; PRAZERES DA COSTA, C.U. Maternal Schistosomiasis: Immunomodulatory Effects With Lasting Impact on Allergy and Vaccine Responses. **Front Immunol**, 9, 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.02960

LAYLAND LE, *et al.* *Schistosoma mansoni*-Mediated Suppression of Allergic Airway Inflammation Requires Patency and Foxp3+ Treg Cells. **PLoS Negl Trop Dis**, 7(8), e2379, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002379

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **Evolution, classification and geographical distribution.** In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (eds.). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; vol. 1, p. 1-120, 1987a.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Osv. Cruz**; 82 (3): 421-4, 1987b. doi: 10.1590/s0074-02761987000300015.

LANGENBERG, M.C.C., *et al.* Katayama Syndrome Without *Schistosoma mansoni* Eggs. **Ann Intern Med**. May 21;170(10):732-733, 2019. doi: 10.7326/L18-0438.

LI, L. *et al.* IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. **J. Clin. Invest.** 120, 331–342, 2010.

LIMA, C.W.R.; OLIVEIRA, N.M.C.D.E.; SILVA, S.V.D.D.A.; DUARTE, M.E.L.; BARBOSA, A.P.F. Ectopic forms of schistosomiasis mansoni in the second macroregion of Alagoas: case series report and review of the literature. **Rev Soc Bras Med Trop.** 50(6), 812–818, 2017. doi:10.1590/0037-8682-0087-2017

LOCKARD, R.D.; WILSON, M.E.; RODRÍGUEZ, N.E. Sex-Related Differences in Immune Response and Symptomatic Manifestations to Infection with *Leishmania* Species. **J Immunol Res**, 2019. doi: 10.1155/2019/4103819.

LOPES, D.M., *et al.* Dendritic Cell Profile Induced by *Schistosoma mansoni* Antigen in Cutaneous Leishmaniasis Patients. **Biomed Res Int**: 1-11, 2014. doi: 10.1155/2014/743069

- LOPES, D.M., *et. al.* Susceptibility of dendritic cells from individuals with schistosomiasis to infection by *Leishmania braziliensis*. **Mol Immunol** 93: 173-183, 2018. doi: 10.1016/j.molimm.2017.11.018
- LOPES, D.M.; OLIVEIRA, S.C.; PAGE, B.; CARVALHO, L.P.; CARVALHO, E.M.; CARDOSO, L.S. *Schistosoma mansoni* Sm29 Antigen Induces a Regulatory Phenotype on Dendritic Cells and Lymphocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Front Immunol**; 9: 3122, 2019.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J Biol Chem.** 193, 265:276, 1951.
- MAHMOUD, A.A.F.; WARREN, K.S.; STRICKLAND, G.T. Acquired resistance to infection with *Schistosoma mansoni* induced by *Toxoplasma gondii*. **Nature.** 263, 56-57, 1976. doi: 10.1038/263056a0.
- MAHMOUD, A.A.F.; STRICKLAND, G.T.; WARREN, K.S. Toxoplasmosis and host-parasite relationship in murine schistosomiasis mansoni. **J. Infect. Dis.** 135, 408–413, 1977. doi: 10.1093/infdis/135.3.408.
- MAIZELS, R.M. Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. **Clin Microbiol Infect** ,22: 481–486, 2016
- MALDONADO, A.; COURA, R.; GARCIA, J.D.; LANFREDI, R.M.; REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 96, 193–198, 2001. doi: 10.1590/s0074-02762001000900030.
- MANGOUD, A.M.; RAMADAN, M.E.; MAKLED, K.M.; MOSTAFA, S.M. The pathology of the heart and lung in Syrian gold hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum* on top pre-existing *Schistosoma mansoni* infection. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** 28, 101-117, 1998.
- MANZILLO, V.F.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **Vet Record**, 158(20), 690–694, 2006. doi:10.1136/vr.158.20.690
- MARTINS-MELO, F.R.; CARNEIRO, M.; RAMOS, J.R.A.N.; HEUKELBACH, J.; RIBEIRO, A.L.P.; WERNECK, G.L. 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, 2018.
- MCGEACHY, M. J., CUA, D. J.; GAFFEN, S. L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. **Immunity**, 50(4), 892–906, 2019. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.021
- MCGWIRE BS, SATOSKAR AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**;107(1):7-14, 2014. doi: 10.1093/qjmed/hct116

MCKENZIE, F. Polyparasitism. **Inter J Epidemiol**, 34(1), 221–222, 2004. doi:10.1093/ije/dyh399

MCMANUS, D.P.; DUNNE, D.W.; SACKO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALD, B.J.; ZHOU, X.N. Schistosomiasis. **Nature Reviews**; 4:13, 2018. doi: 10.1038/s41572-018-0013-8.

MIDZI, N., *et.al.* (2010). Consequences of polyparasitism on anemia among primary school children in Zimbabwe. **Acta Trop**. 115, 103-111.

MIRANDA GS, *et. al.* The wild water-rats and their relevance in the context of schistosomiasis mansoni in Brazil: what we know and recommendations for further research. **Helminthol Research Note** 54(2), 165–169, 2017. doi:10.1515/helm-2017-0013

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.

MOMO, C.; JACINTHO, A.P.P.; MOREIRA, P.R.R.; MUNARI, D.P.; MACHADO, G.F.; VASCONCELOS, R. De O. Morphological Changes in the Bone Marrow of the Dogs with Visceral Leishmaniasis. **Vet Med Inter**, 1–5, 2014. doi:10.1155/2014/150582

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SOUZA, D.G.; PINHO, V.; BARSANTE, M.M.; SOUZA, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. **Infect Immun**, 72:1135-1142, 2004.

NADY S, SHATA MT, MOHEY MA, EL-SHORBAGY A. Protective role of IL-22 against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen-induced granuloma in Vitro. **Parasite Immunol**, 39(1), 2017. doi: 10.1111/pim.12392. Epub 2016 Dec 12.

NARENDRA, D.K.; HANANIA, N.A. Targeting IL-5 in COPD. **Inter J Chro Obstruct Pulm Dis**, 14:1045–1051, 2019. doi:10.2147/copd.s155306

NGAIZA, J.R.; DOENHOFF, M.J. *Schistosoma mansoni*-induced thrombocytopenia in mice. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, (81) 655-656, 1987. doi: 10.1016/0035-9203(87)90444-5

NGAIZA, J.R.; DOENHOFF, M.J. Blood platelets and schistosome egg excretion. **Proc Soc Exp Biol Med**, (193) 73–79, 1990. doi: 10.3181/00379727-193-42993.

NYAKUNDI, R. K., *et. al.* Protective Effect of Chronic Schistosomiasis in Baboons Coinfected with *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium knowlesi*. **Infect Immun**, 84(5), 1320–1330, 2016. doi:10.1128/iai.00490-15

NOVAIS, F.O., *et. al.* Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of *Leishmania braziliensis* by Reactive Oxygen Species. **J Infect Dis**, 1209 (8):1288–1296, 2014. doi: 10.1093/infdis/jiu013.

NOVATO-SILVA, E.; GAZZINELLI, G.; COLEY, D.G. Immune response during Human Schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonate. **Scand J Immunol**. 35 (3) 429-437, 1992. doi: 10.1111/j.1365-3083.1992.tb02878.x.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, 34(12):551-61, 2012.

OLIVEIRA, W.J., *et. al.* 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 Neglec Trop Dis**, 12(2), e0006232, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006232

OLIVEIRA, M.R.; TAFURI, W.L.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; MELO, M.N.; VIEIRA, L.Q. Influence of microbiota in experimental cutaneous leishmaniasis in swiss mice. **Rev Inst Med Trop, S**; 41 (2): 87-94, 1999.

OLIVIER, M.; ATAYDE, V.D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M.T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Micro Infect**, 14(15), 1377–1389, 2012. doi:10.1016/j.micinf.2012.05.014

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 94 (3): 489-93, 2016. doi: 10.4269/ajtmh.15-0408

O'NEAL, S.E., *et. al.* Influence of Helminth Infections on the Clinical Course of and Immune Response to *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis. **J Infec Dis**; 195: 142-148, 2007. doi: 10.1086/509808.

OLIVEIRA, C.I.; BRODSKYN, C.I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Front Immunol**, 3:1-9, 2012. doi: 10.3389/fimmu.2012.00145.

OLIVEIRA, R.G. Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios. **Ciênc Saúd colet**; 23(7):2291-2302, 2018.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Ann Rev Immunol**, 29(1), 71–109, 2011. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101312

PAHO (2019) - **Epidemiological Report of the Americas Leishmaniases** (March, 2019). Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>> Acesso em: 07 de Ago de 2019.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect**,1-9, 2014

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Rev Immunol**, 2 499-511, 2002. doi: 10.1038/nri843.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. **Adv. Parasitol**; 6:233-90, 1968.

PELLEGRINO, J.; MACEDO, D. G. A simplified method for the concentration of cercariae. *J. Parasit*; 41:329-30, 1955.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A.F. Técnica de perfusão para colheita de *S. mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Rev Bras Malariol Doenças Trop**, 8: 589-597, 1965.

PIMENTA PF.; TURCO SJ; MCCONVILLE MJ.; LAWYER PG; PERKINS PV; SACKS DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, 256 (5065) 1812-15, 1992. doi: 10.1126/science.1615326.

PITTELLA, J.E.H. Neuroschistosomiasis. **Brain Pathol**; 7: 649-662, 1997.

PULLAN, R.; BROOKER, S. The health impact of polyparasitism in humans: are we underestimating the burden of parasitic diseases? **Parasitol**, 135: 783-794, 2008. doi: 10.1017/S0031182008000346

RASO, P.; PEDROSO, E.R.P.; NEVES. J. Patologia da forma aguda toxêmica da esquistossomose mansônica. **Rev Soc Bras Med Trop**, 19: 45-55, 1986.

REIS, A.B.; GONTIJO, C.M.F. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves, D. P. **Parasitologia humana**. 13 ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**; 7:581-596, 2017. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8

RENAULD, J. C. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. **Nat. Rev. Immunol**. 3: 667–676, 2003. doi: 10.1038/nri1153.

RENNEDY, G.K.; ENWEMEKA, C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clin Biochem**; 29: 225-229, 1956. doi: 10.1016/0009-9120(96)00003-6.

REQUENA, J.M.; MONTALVO, A.M.; FRAGA, J. Molecular Chaperones of *Leishmania*: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes. **BioMed Res Inter**, 1–21, 2015. doi: 10.1155/2015/301326

ROGERS, M.E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A.V.; FERGUSON, M.A.J.; BATES, P.A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**; 430: 463-67, 2004. doi: 10.1038/nature02675.

ROGERS, M.E.; BATES, P.A. *Leishmania* Manipulation of Sand Fly Feeding Behavior Results in Enhanced Transmission. **Plos Pathog**; 3 Issue 6 e91, 2007. doi: 10.1371/journal.ppat.0030091.

ROGERS, M. E. The Role of *Leishmania* Proteophosphoglycans in Sand Fly Transmission and Infection of the Mammalian Host. **Front Microbiol.** 3, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00223.

ROSS R. Further notes on leishman's bodies. **Br Med J**; 28; 2(2239):1401, 1903. doi:10.1136/bmj.2.2239.1401

RÜCKERL, D.; COOK, P.C. Macrophages assemble! But do they need IL-4R during schistosomiasis? **Europ J Immunol**, 49(7), 996–1000, 2019. doi:10.1002/eji.201948158

SACKS, D.L., PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, 1984. 223(4643), 1417–1419. doi: 10.1126/science.6701528.

SALAH, I.; ABBASI, I.; WARBURG, A.; DAVIDOVITCH, N.; KOTLER, B. Ecology of Leishmaniasis in an urbanized landscape: Relationship of sand fly densities, and *Leishmania tropica* infection rates with reservoir host colonies, **Acta Tropica**, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105332>

SANIN, D.E.; MOUNTFORD, A.P. Sm16, a major component of *Schistosoma mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical activation and delays antigen processing. **Parasit Vectors**; 8(1), 1, 2015. doi:10.1186/s13071-014-0608-1

SCHWARTZ, C.; FALLON, P.G. Schistosoma "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Front Immunol**, 9:2492, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.02492.

SCORZA, B.M.; CARVALHO, E.M.; WILSON, M.E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **Int J Mol Sci**, 18, 1296, 2017. doi:10.3390/ijms18061296

SCOTT P, NOVAIS FO. Cutaneous leishmaniasis: immune response in protection and pathogenesis. **Nature Rev Immunol**; 16:581-592, 2016.

SERAFIM, T.D., COUTINHO-ABREU, I.V; OLIVEIRA, F.; MENESES, C.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J.G. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiol**, 3(5), 548–555, 2018. doi:10.1038/s41564-018-0125-7

SERTORIO, M., *et al.* IL-22 and IL-22 binding protein (IL-22BP) regulate fibrosis and cirrhosis in hepatitis C virus and schistosome infections. **Hepatology**, 61(4), 1321–1331, 2015. doi:10.1002/hep.27629

SHAPOURI-MOGHADDAM A, *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol**, 233(9), 6425–6440, 2018. doi:10.1002/jcp.26429

- SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. In: FARREL J., ed., **World Class Parasites: *Leishmania***, v.4, Kluwer Academic Publishers. Boston, Dordrecht, London, 2003.
- SIEBOLD, C. T. Ein Beitrag zur Helminthographia humana, aus brieflichen Mittheilungen des Dr. Bilharz in Cairo, nebst Bemerkungen von Prof. C. Th. v. Siebold in Breslau. *Zeitschrift fur wissenschaftlich Zoologie*, 4: 53- 76, 1852.
- SILVA-MORAES, V., *et. al.* Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 114(0), 2019. doi:10.1590/0074-02760180478
- SILVA, E.M.; BERTHO, A.L.; MENDONÇA, S.C.F. Effect of in vivo depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. **Acta Trop**, 56(1):111-120, 1994. doi: 10.1016/0001-706x(94)90045-0.
- SILVEIRA, M.R., *et. al.* Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infection and Immunity*; 70: 6263-6272, 2002. doi: 10.1128/IAI.70.11.6263-6272.2002
- SMITS HH, EVERTS B, HARTGERS FC, YAZDANBAKHS M. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. **Curr Allergy Asthma Rep.**, 10(1), 3-12,2010. doi: 10.1007/s11882-009-0085-3.
- SMYTHIES, L.E.; BETTS, C.; COULSON, P.S.; DOWLING, M.A.; WILSON, R.A. Kinetics and mechanism of effector focus formation in the lungs of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol**, 18(7), 359–369, 1996. doi:10.1046/j.1365-3024.1996.d01-115.x
- SOARES ME, *et. al.* Epidemiological profile of individuals with American cutaneous leishmaniasis in Jequitinhonha Valley, Brazil. **East Mediterr Health J**, 19 (3):81-8, 2014.
- SOBOTKOVÁ K, PARKER W, LEVÁ J, RŮŽKOVÁ J, LUKEŠ J, POMAJBÍKOVÁ KJ. Helminth Therapy – From the Parasite Perspective. **Trends in Parasitol**; 35 (7), 2019. doi: 10.1016/j.pt.2019.04.009.
- STECK, E. A. The Leishmaniases. Progress in Drug Research / Fortschritte Der Arzneimittelforschung / **Progrès Des Recherches Pharmaceutiques**, 289–351, 1974. doi:10.1007/978-3-0348-7087-0_22
- STRACHAN DP. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, 299(6710), 1259–1260, 1989. doi: 10.1136/bmj.299.6710.1259.
- STRATH, M.; WARREN, D.J.; SANDERSON, C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods**; 83(2): 209-215, 1985. doi: 10.1016/0022-1759(85)90242-x.

SUPALI T, *et. al.* Polyparasitism and its impact on the immune system. **Internat J Parasitol**; 40(10):1171-1176, 2010. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.05.003.

TELES, G. da C.; FONSECA, F.R.; GONÇALVES, M.J.F. American Tegumentary Leishmaniasis in the Brazilian Amazon from 2010 to 2014. **Rev Inst Med Trop São Paulo**; 61(0), 2019. doi:10.1590/s1678-9946201961022

TITUS, R.G.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J.A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol**; 7:545-555, 1985. doi: 10.1111/j.1365-3024.1985.tb00098.x.

TOMIOTTO-PELLISSIER F, *et. al.* Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Front Immunol**, 9, 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.02529

TOPNO, R.K., *et. al.* Asymptomatic infection with visceral leishmaniasis in a disease-endemic area in bihar, India. **Am J Trop Med Hyg**, 83(3):502-6, 2019. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0345.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M.R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **Faculty Rev**, 6: 1-15, 2017. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.

VALADARES, T.E.; COELHO, P.M.; PELLEGRINO, J.; SAMPAIO, I.B. *Schistosoma mansoni*: comparison of oviposition of the LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) and ST (Liberia) strains in mice. **Rev Inst Med Trop**; 23(1): 1-5, 1981.

van der WERF MJ, *et. al.* Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop**, 86(2-3):125-39, 2003. doi: 10.1016/s0001-706x(03)00029-9.

Van der ZANDE, H.J.P.; ZAWISTOWSKA-DENIZIAK, A.; GUIGAS, B. Immune regulation of metabolic homeostasis by helminths and their molecules. **Trends in Parasitol**, 2019. Doi:10.1016/j.pt.2019.07.014

VELASQUEZ, L. G., *et. al.* Distinct courses of infection with *Leishmania (L.) amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. **Parasitol**, 143(06), 692–703, 2016. doi:10.1017/s003118201600024x

WAHL, S.M.; FRAZIER-JESSEN, M.; JIN, W. W.; KOPP, J.B.; SHER, A.; CHEEVER, A.W. Cytokine regulation of schistosome-induced granuloma and fibrosis. **Kidney Internat**, 51(5), 1370–1375, 1997. doi:10.1038/ki.1997.187

WEERAKOON, K. G. A. D.; GOBERT, G. N.; CAI, P.; MCMANUS, D. P. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clinic Microbiol Rev**, 28 (4): 939– 967, 2015. doi: 10.1128/CMR.00137-14.

WEINLAND, D. F. Human Cestoides: an essay on the tapeworms of man etc., to which is added an appendix, containing a catalogue of all species of helminthes hitherto found in man. **Cambridge: Metcalf & Co**, 1858.

WEN, X., *et al.* Dynamics of Th17 cells and their role in *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mice. **PLoS Negl Trop Dis**, 5(11):e1399, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001399. Epub 2011 Nov 15

WENDT GR, COLLINS JJ. Schistosomiasis as a disease of stem cells. **Curr Opin Genet Dev**; 40:95–102, 2017. doi: 10.1016/j.gde.2016.06.010.

WHO – **Leishmaniasis**: epidemiological situation. 2019. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 06 Ago de 2019.

WHO - **Leishmaniasis in high-burden countries**: an epidemiological update based on data reported in 2014. 2016. Disponível em: < https://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_wer9122/en/> Acesso: 09 ago de 2019.

WHO – **Schistosomiasis**: epidemiological situation. 2019. Disponível em: < <http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/en/>> Acesso: 09 ago de 2019.

WILSON, M.S., *et al.* Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. **J Exp Med**, 207(3), 535–552, 2010. doi:10.1084/jem.20092121

WILSON, M.S.; MENTINK-KANE, M.M.; PESCE, J.T.; RAMALINGAM, T.R.; THOMPSON, R.; WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biol**, 85(2), 148–154, 2006. doi:10.1038/sj.icb.7100014

WILSON, R.; *et al.* Stage-Specific Adhesion of Leishmania Promastigotes to Sand Fly Midguts Assessed Using an Improved Comparative Binding Assay. **Plos Negl Trop Dis**; (4): 9 e816, 2010. doi: 10.1371/journal.pntd.0000816.

WRIGHT, J.H. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). **J Med Res**;10(3):472-82, 1903.

WU, P.W., *et al.* IL-22R, IL-10R2, and IL-22BP binding sites are topologically juxtaposed on adjacent and overlapping surfaces of IL-22. **J. Mol. Biol**, 382: 1168–1183, 2008. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.046.

WYNN, T.A., *et al.* Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, 1;153(11):5200-9, 1994.

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. **Nature Rev Immunol**, 4(8), 583–594, 2004. doi:10.1038/nri1412

WYNN, T.A.; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Semin. Liver Dis**; 30:245–257, 2010. doi: 10.1055/s-0030-1255354.

WYNN, T.A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**; 496(7446), 445–455, 2013. doi:10.1038/nature12034

YAGI AI, *et. al.* Studies on heterologous resistance between *Schistosoma bovis* and *Fasciola gigantica* in Sudanese cattle. **J. Helminthol.** 60, 55–59, 1986. doi: 10.1017/s0022149x00008233.

YOSHIDA, A.; MARUYAMA, H.; YABU, Y.; AMANO, T.; KOBAYATAWA, T.; OHTA, N. Immune responses against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol Int**, 48: 73-79, 1999. doi: 10.1016/s1383-5769(99)00006-9.

ANEXO – DECISÃO FINAL



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 Negroa 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