UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Genil Mororó Araújo Camelo Júnior

COINFECÇÃO *Schistosoma-Leishmania*: análise espacial de regiões coendêmicas e impacto da esquistossomose mansoni na leishmaniose tegumentar experimental

Belo Horizonte

2024

Genil Mororó Araújo Camelo Júnior

COINFECÇÃO *Schistosoma-Leishmania*: análise espacial de regiões coendêmicas e impacto da esquistossomose mansoni na leishmaniose tegumentar experimental

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

Belo Horizonte

2024

043 Camelo Júnior, Genil Mororó Araújo.
Coinfecção Schistosoma-Leishmania: análise espacial de regiões coendêmicas e impacto da esquistossomose mansoni na leishmaniose tegumentar experimental [manuscrito] / Genil Mororó Araújo Camelo Júnior. – 2024.
169 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Deborah Aparecida Negrão Corrêa.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Schistosoma mansoni. 3. Leishmania. 4. Coinfecção. I. Corrêa, Deborah Aparecida Negrão. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis (CRB: 6 2680)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

TESE: 359/2024/08

TÍTULO DA TESE: "COINFECÇÃO *SCHISTOSOMA-LEISHMANIA*: ANÁLISE ESPACIAL DE REGIÕES COENDÊMICAS E IMPACTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EXPERIMENTAL"

ALUNO: GENIL MORORÓ ARAÚJO CAMELO JÚNIOR

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: **IMUNOPARASITOLOGIA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **oito de julho de 2024**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelas seguintes Doutoras:

Andrea Teixeira de Carvalho

Membro externo - CPqRR/FIOCRUZ-MG

Mariângela Carneiro

Membro externo - UFMG-aposentada

Lílian Lacerda Bueno

Membro interno - UFMG

Roselene Ecco

Membro interno - UFMG

Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 08 de julho de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **Deborah Aparecida Negrão Correa**, **Professora do Magistério Superior**, em 09/07/2024, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Mariangela Carneiro**, **Professora do Magistério Superior**, em 10/07/2024, às 13:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Roselene Ecco**, **Professora do Magistério Superior**, em 10/07/2024, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Lilian Lacerda Bueno**, **Professora do Magistério Superior**, em 11/07/2024, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3362443** e o código CRC **FA720E2C**.

Referência: Processo nº 23072.237139/2024-44 SEI nº 3362443

Às vítimas da COVID-19 e da negligência.

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS

Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia – ICB/UFMG

Profª. Drª. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

Laboratório de Patologia das Leishmanioses – ICB/UFMG

Prof. Dr. Wagner Luiz Raso Tafuri

Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias – ICB/UFMG

Prof. Dr. David Soeiro Barbosa

Laboratório de Helmintos Intestinais – ICB/UFMG

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – bolsa de doutorado

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Saúde através do edital Pesquisas Sobre Doenças Transmissíveis e Negligenciadas DECIT/CNPq/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SCTIE, Nº 22/2019 – processo Nº 442994/2019-2

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – edital Universal 001/2017 – processo APQ-01637-17

Projeto de Extensão e Prestação de Serviço do Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas (CENEX-ICB)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Profª. Drª. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, minha orientadora. Aprendi bastante sob a sua orientação. A Profª. Deborah é uma profissional admirável, e dá gosto de ver o quanto ela ama e se dedica ao que faz. Mesmo após seis anos de convivência, ainda continuo a me impressionar com todo conhecimento e habilidade que ela tem. Porém, talvez o mais impressionante de tudo seja00 o quão bem ela trata o próximo, sempre com carinho, paciência e respeito. Por sorte, tive uma escolha extremamente acertada de orientadora. Ela é, acima de uma profissional maravilhosa, uma pessoa muito boa. E só posso agradecer todo o acolhimento.

Com isso, a Profª. Deborah gerou um ambiente agradável de trabalho. Acho ótima toda a cooperação que nós, do Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia, construímos. Realmente, não imaginaria escolher um laboratório melhor para cursar o meu doutorado. Com o passar do tempo, o laboratório mudou significativamente. Tantas pessoas entraram, e tantas saíram, mas todos me ajudaram na construção deste e outros trabalhos. Sinto saudades dos membros que concluíram sua formação, mas também fico feliz com a próxima geração que tem se construído. Todos, desde quem me acolheu quando entrei no laboratório até os recém-chegados que confiam em mim para compartilhar minhas experiências, são uma parte integral não só do cientista que me torno, mas da pessoa que sou. Seja nos experimentos até de madrugada, companhia de almoço, festinhas, passeios, caronas ou desabafos de quando a vida aperta, saibam que sou muito grato a cada um de vocês. Michelle de Rezende, Vanessa Rodrigues, Vinícius de Oliveira, Samira Resende, Guilherme Silva, Gustavo Rodrigues, João Marcelo Moreira, Ana Cristina Melgaço, Elis Batista, Mariela Resende, Cristiane Bernardo, Caio Gouveia, Mariana Pimentel, Jamilly Victoria, José Carlos, Elizabeth de Lacorte e, especialmente, Laura Maggi e Jeferson Silva, muito obrigado.

Também gostaria de agradecer ao excelente Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, maestrado pela Profª. Drª. Hélida Monteiro de Andrade, Sumara Aparecida Guilherme e Sibele Abreu. Toda a estrutura e apoio do programa foram imprescindíveis para que eu conseguisse dar forma ao meu trabalho. Além disso, obrigado por toda a ajuda com a burocracia. Vocês sempre foram solícitas, atenciosas e prestativas, facilitando todo o processo. Sinto-me realizado em afirmar que sou parte deste programa e que aqui me formo. Espero carregar o nome dele tão bem quanto vocês. Da mesma forma, agradeço a todos os colaboradores que ajudaram a tornar este trabalho realidade, nas pessoas do Prof. Dr. Stefan

Michael Geiger (Laboratório de Helmintos Intestinais), Prof. Dr. David Soeiro Barbosa (Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias) e Prof. Dr. Wagner Luiz Raso Tafuri (Laboratório de Patologia das Leishmanioses).

Como a vida excede os limites da universidade, não posso deixar de agradecer a quem me proporcionou suporte fora da vida acadêmica. Meus pais, Nati e Genil, minhas irmãs, Michelle e Karen, minhas sobrinhas, Paola e Laís, e meus padrinhos, Antero e Viviane, foram mais que essenciais para que eu chegasse aqui. Espero que vocês se orgulhem de mim. A todos os meus amigos, também agradeço imensamente, estejam vocês perto ou longe. Entre que estão longe, agradeço especialmente à Nicole e ao Santiago, que, apesar da distância, sempre se fizeram presentes. Dos que estão perto, devo mencionar, especialmente, Andréia Costa, Edneia Sobrinho, Gustavo de Oliveira, Valéria Lima e André Lopes, amigos da pós-graduação, mas de fora do laboratório, em quem sei que posso contar para a vida, tanto nos momentos mais leves quanto nos mais difíceis. Da mesma forma, agradeço ao Me. Gabriel Rodrigues, meu psicólogo, por toda atenção e auxílio com seu excepcional trabalho neste e em outros pontos da minha vida.

Por fim, agradeço a você, que está lendo a minha tese. Talvez não seja o trabalho perfeito, mas tenho orgulho do que apresentei. Escrevi com muita dedicação e espero que lhe seja útil.

“A esperança pode nos mover, mas a esperança não salva nada.”

(Ailton Krenak, 2024)

RESUMO

Esquistossomose e leishmanioses são doenças de grande impacto com de áreas de transmissão em comum. Porém, são poucos os estudos sobre áreas de ocorrência e possíveis impactos das coinfecções *Schistosoma-Leishmania*. Existem indícios de que a coinfecção cause piora clínica, afete a resposta imune e reduza a eficácia dos tratamentos. Assim, o presente trabalho visa identificar regiões coendêmicas para esquistossomose e leishmaniose tegumentar e avaliar os efeitos da infecção prévia por *S. mansoni* na imunopatogênese e parasitismo de *L. amazonensis*. Para determinar países onde coinfecções *Schistosoma-Leishmania* podem ser mais prováveis, montou-se um mapa de endemicidade global com base no *The Global Health Observatory* de 2022. Quarenta países foram coendêmicos, 23 dos quais têm altas taxas de transmissão de esquistossomose. Para análise regional, um estudo ecológico foi realizado com casos confirmados de leishmaniose tegumentar e esquistossomose registrados nas bases de dados do SINAN e no SISPCE em Minas Gerais entre 2013 e 2017, utilizando análises de indicadores de associação espacial. Análises de correlação espacial entre as duas doenças identificaram 61 municípios como agrupamentos de alta incidência conjunta, principalmente na microrregião de Caratinga. Este estudo possibilitou chamar atenção para áreas com maior potencial coendêmico, às quais devem ser destinados mais esforços de autoridades sanitárias. Já para avaliar os impactos da coinfecção experimental, foram utilizados camundongos BALB/c coinfectados com *L. amazonensis* após 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. Peso, espessura da pata e mortalidade foram avaliados por 10 semanas pós-coinfecção, e órgãos foram coletados para análise. A coinfecção induziu agravamento da hepatomegalia, assim como menor espessura de lesão e maior carga parasitária de *L. amazonensis*. Em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de animais coinfectados, houve manutenção de citocinas de perfil Th1 e aumento de IL-5 e IL-10 em relação aos somente com leishmaniose. Histopatologia de pata revelou que a coinfecção provocou áreas de necrose maiores e em maior número com amastigotas mais abundantes. Para melhor descrever a função de macrófagos, células peritoneais de camundongos sadios ou com 8 semanas de infecção por *S. mansoni* foram transferidas para camundongos infectados por *L. amazonensis*, ambas reduzindo similarmente a espessura das lesões em comparação ao controle. Logo, a infecção prévia por *S. mansoni* é capaz de alterar o microambiente imune no local de infecção por *L. amazonensis*, causando maior perda tecidual e maior proliferação de amastigotas, assim como piora da doença hepática.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; *Leishmania amazonensis*; coendemicidade; imunopatologia.

ABSTRACT

Schistosomiasis and leishmaniasis are two highly important diseases with overlapping transmission areas. However, there are only a few studies approaching the occurrence and possible impacts of *Schistosoma-Leishmania* co-infections. There is evidence that this co-infection leads to worse clinical outcomes, affects the immune response, and reduces treatment effectiveness. Therefore, the present study aims to identify regions co-endemic for schistosomiasis and tegumentary leishmaniasis and evaluate the effects of the previous *S. mansoni* infection on the immunopathogenesis and parasitism of *L. amazonensis*. To determine countries where *Schistosoma-Leishmania* co-infections are more likely to occur, an endemicity map was constructed based on data from The Global Health Observatory in 2022. Forty countries were considered co-endemic, 23 of which presented high level of schistosomiasis transmission. For a regional analysis, an ecological study using analyses of indicators of spatial association was conducted on confirmed cases of tegumentary leishmaniasis and schistosomiasis in Minas Gerais, between 2013 and 2017, obtained from SINAN and SISPCE databases. Spatial correlation analyses between the two diseases identified 61 municipalities as having concomitantly high incidences, particularly in the Caratinga microregion. This study allowed the identification of areas with a higher potential for co-endemicity, towards which health authorities should direct their efforts. To evaluate the impacts of the experimental co-infection, BALB/c mice were co-infected with *L. amazonensis* 8 weeks after *S. mansoni* infection. Weight, footpad thickness and mortality were evaluated weekly for 10 weeks post-co-infection, and organs were harvested for analysis. The co-infection induced a more pronounced hepatomegaly, as well as less footpad swelling with higher *L. amazonensis* parasite load. In footpad homogenate and popliteal-lymph node cell culture of co-infected mice, Th1 cytokine levels were maintained, and IL-5 and IL-10 concentrations were increased in relation to mice with only leishmaniasis. Histopathological analysis of footpads revealed larger and more numerous areas of necrosis in co-infected mice, along with more abundant amastigotes. To better describe macrophage function, peritoneal cells from non-infected mice and mice 8 weeks post-*S. mansoni* infection were transferred to mice infected with *L. amazonensis*, both reducing lesion thickness compared with the control. Therefore, the previous infection with *S. mansoni* can alter the immune microenvironment in the *L. amazonensis* infection site, leading to increased tissue loss and amastigote proliferation, as well as worsening liver disease.

Keywords: *Schistosoma mansoni; Leishmania amazonensis;* co-endemicity. immunopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição global de espécies do gênero *Schistosoma* causadoras de esquistossomose em humanos 22

Figura 2. Ciclo de vida de *S. mansoni* 23

Figura 3. Sequência de indução dos diferentes perfis de resposta imune predominantes em cada período da infecção por *S. mansoni* 26

Figura 4. Representação gráfica de granuloma esquistossomótico hepático e seus constituintes 27

Figura 5. Distribuição de novos casos de leishmaniose visceral em 2022 29

Figura 6. Distribuição de novos casos de leishmaniose tegumentar em 2022 30

Figura 7. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. 31

Figura 8. Mecanismos de controle de amastigotas de *Leishmania* sp. em macrófagos 33

Figura 9. Espectro das manifestações de leishmaniose tegumentar em humanos de acordo com a resposta imune do hospedeiro 35

Figura 10. Distribuição geográfica de esquistossomose, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral no Brasil 39

Figura 11. Resumo das consequências da coinfecção *Schistosoma-Leishmania* 41

Figura 12. Mapa da estado de Minas Gerais, Brasil 56

Figura 13. Fluxograma para a notificação de caso confirmado de esquistossomose 57

Figura 14. Países coendêmicos para esquistossomose e leishmaniose tegumentar de acordo com dados do ano de 2022 60

Figura 15. Taxa de incidência média de leishmaniose tegumentar e prevalência média de esquistossomose por 100 mil habitantes em Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017 62

Figura 16. Mapas de agrupamentos de LISA univariados em Minas Gerais, Brasil, de 2013 a 2017. 64

Figura 17. Mapas de aglomerados de LISA bivariados em Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017 65

Figura 18. *Hotspots* de coendemicidade de LTA e esquistossomose em Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017 69

Figura 19. Delineamento experimental para avaliação *in vivo* da coinfecção *Schistosoma-Leishmania* 81

Figura 20. Delineamento experimental para transferência de macrófagos peritoneais de doares infectados ou não com *S. mansoni* para animais infectados com *L. amazonensis* 90

Figura 21. Curva de mortalidade e variação do peso de camundongos BALB/c no decorrer da infecção e coinfecção por *S. mansoni* e *L. amazonensis* 92

Figura 22. Carga parasitária de *S. mansoni* em camundongos BALB/c monoinfectados por *S. mansoni* ou coinfectados por *S. mansoni* e *L. amazonensis* 93

Figura 23. Peso relativo de baço (A) e fígado (B) em camundongos BALB/c não infectados, monoinfectados com *S. mansoni*, monoinfectados com *L. amazonensis* ou coinfectados 94

Figura 24. Análise sérica de função hepática em camundongos BALB/c não infectados, monoinfectados com *S. mansoni*, monoinfectados com *L. amazonensis* ou coinfectados 95

Figura 25. Aspecto histopatológico geral do fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* coinfectados ou não com *L. amazonensis* 97

Figura 26. Análise histopatológica de granulomas esquistossomóticos em fígado de camundongos BALB/c coinfectados ou não com *L. amazonensis* 98

Figura 27. Achados histopatológicos em animais coinfectados 99

Figura 28. Características da pododermatite ulcerativa induzida pela infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c previamente infectados por *S. mansoni* ou não. 101

Figura 29. Carga parasitária na pata de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni* 102

Figura 30. Atividade enzimática em homogenato de pata de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não *S. mansoni* 103

Figura 31. Concentrações de citocinas de perfil tipo 1 em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não *S. mansoni* 104

Figura 32. Concentrações de citocinas de perfil tipo 2 em pata e cultura de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni* 106

Figura 33. Concentrações de citocinas de perfil regulatório em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni* 107

Figura 34. Concentrações de citocinas de perfil Th17 em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni* 108

Figura 35. Concentrações de quimiocinas em homogenato de pata de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni* 109

Figura 36. Fotomicrografias de lesão de pata de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni* 111

Figura 37. Alteração de cinética de desenvolvimento de lesão por transferência de células peritoneais de doadores infectados ou não por *S. mansoni* para camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo do delineamento de artigos de coinfecção experimental entre *S. mansoni* e *Leishmania* spp. 46

Tabela 2. Casos de LTA e esquistossomose no estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017 61

Tabela 3. Estatísticas de Índices Globais de Moran para LTA e esquistossomose no estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017 63

Tabela 4. Agrupamentos comuns obtidos de análise univariada de autocorrelação espacial de LTA e esquistossomose 64

Tabela 5. Agrupamentos de alta incidência obtidos em análises bivariadas de associação espacial entre LTA e esquistossomose. 66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 REFERENCIAL TEÓRICO 21

2.1 A esquistossomose 21

2.1.1 Ciclo de vida de *S. mansoni* 23

2.1.2 Imunopatologia da esquistossomose mansoni 25

2.2 As leishmanioses 28

2.2.1 Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 30

2.2.2 Imunopatologia da leishmaniose tegumentar americana 32

2.3 As coinfecções *Schistosoma-Leishmania* 39

2.3.1 Consequências da coinfecção *Schistosoma-Leishmania* 40

2.3.1.1 A coinfecção *Schistosoma-Leishmania* em humanos 41

2.3.1.2 A coinfecção *Schistosoma-Leishmania* em modelos experimentais 44

3 JUSTIFICATIVA 49

4 OBJETIVOS 51

4.1 Objetivo geral 51

4.2 Objetivos específicos 51

4.2.1 Objetivos específicos – capítulo 1 51

4.2.2 Objetivos específicos – capítulo 2 51

5 CAPÍTULO 1 53

5.1 Material e métodos – capítulo 1 55

5.1.1 Aspectos éticos 55

5.1.2 Avaliação de países coendêmicos 55

5.1.3 Determinação de áreas coendêmicas em Minas Gerais 56

5.1.3.1 Área de estudo 56

5.1.3.2 Delineamento epidemiológico e bases de dados 57

5.1.3.3 Análise espacial 58
5.2 Resultados – Capítulo 1 59
5.2.1 Identificação de países endêmicos para esquistossomose e para leishmanioses no mundo 59
5.2.2 Determinação de áreas coendêmicas para esquistossomose e LTA no estado de Minas Gerais 61
5.3 Discussão – Capítulo 1 70
5.4 Conclusões – Capítulo 1 75
6 CAPÍTULO 2 77
6.1 Material e métodos – Capítulo 2 79
6.1.1 Animais 79
6.1.2 Parasitos e infecção experimental 79
6.1.3 Obtenção de antígenos 80
6.1.4 Avaliação *in vivo* de animais coinfectados 80
6.1.4.1 Análise patológica 81
6.1.4.1.1 Análise histopatológica 82
6.1.4.2 Carga parasitária 82
6.1.4.3 Avaliação sérica de função hepática 83
6.1.4.4 Dosagem de citocinas e quimiocinas em lesões cutâneas 84
6.1.4.5 Atividade de mioeloperoxidase (MPO) 85
6.1.4.6 Atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) 86
6.1.4.7 Atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) 86
6.1.4.8 Atividade de arginase 87
6.1.4.9 Dosagem de óxido nítrico 88
6.1.4.10 Cultura de células de linfonodo poplíteo 88
6.1.5 Transferência de macrófagos 89
6.1.6 Análise estatística 91
6.2 Resultados – Capítulo 2 91

6.2.1 A coinfecção *S. mansoni-L. amazonensis* acentua patologia hepática na esquistossomose 91

6.2.2 A infecção prévia por *S. mansoni* altera o microambiente imunopatológico no sítio de infecção por *L. amazonensis* 100

6.2.3 A transferência de células peritoneais aderentes altera o desenvolvimento de lesões cutâneas 112

6.3 Discussão – Capítulo 2 113

6.4 Conclusões – Capítulo 2 121

7 RESUMO DOS RESULTADOS 123

7.1 Principais resultados – Capítulo 1 123

7.2 Principais resultados – Capítulo 2 123

8 CONCLUSÃO GERAL 124

REFERÊNCIAS 125

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) 162

ANEXO B – PUBLICAÇÕES COMO COAUTOR 163

ANEXO C – PUBLICAÇÃO COMO PRIMEIRO AUTOR 167

1 INTRODUÇÃO

Pela definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de enfermidades que afetam mais de 1,7 bilhão de pessoas todos os anos, principalmente as populações mais vulneráveis em regiões tropicais e subtropicais, expostas a patógenos, assim como seus vetores e reservatórios (WHO 2020, 2021a). Entre elas, destacam-se a esquistossomose e as leishmanioses, que muito afetam a população brasileira (Martins-Melo et al. 2016, 2018).

A esquistossomose, uma doença causada por infecção com trematódeos do gênero *Schistosoma*, é endêmica em 78 países e causou, em 2016, 2,5 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs – *disease adjusted life years*) (WHO 2021a, 2023). Dos países endêmicos, 50 países necessitam de quimioterapia preventiva para tratamento em massa para esquistossomose, totalizando 241,3 milhões de pessoas (WHO 2021b, 2023). Das espécies que infectam humanos, somente *S. mansoni* ocorre na América, *S. japonicum* e *S. mekongi* afetam partes do Leste e Sudeste Asiático, enquanto a África e o Oeste Asiático são afligidos por *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. intercalatum*, sendo a África Subsaariana a região mais afetada (Weerakoon et al. 2015).

Já as leishmanioses são um conjunto de doenças causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*, sendo divididas entre manifestações que envolvem pele e mucosas, a leishmaniose tegumentar, ou órgãos internos, a leishmaniose visceral. A leishmaniose tegumentar, causada por espécies como *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major* (Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017), é endêmica em 90 países, e 205.986 casos foram registrados em 2022, sendo a América a segunda região do globo mais afetada, concentrando 18,4% destes casos (WHO 2020, Ruiz-Postigo et al. 2023). A leishmaniose visceral, causada por agentes etiológicos como *L. infantum* e *L. donovani* (Lukeš et al. 2007), é endêmica em 80 países, com 12.842 casos no mundo em 2022, 14,3% dos quais ocorreram na América (WHO 2020, Ruiz-Postigo et al. 2023).

Sendo a esquistossomose e as leishmanioses doenças negligenciadas de ocorrência simultânea em diversos locais do mundo, não é surpreendente que coinfecções ocorram. No Brasil, existem relatos de coinfecções por *S. mansoni* e espécies dermotrópicas de *Leishmania* spp. em quatro estados brasileiros: Bahia (O'Neal et al. 2007), Rio de Janeiro (Azeredo-Coutinho et al. 2016), São Paulo (Gregorio et al. 2019) e Minas Gerais (Miranda et al. 2021).

Além do mais, o fato das duas doenças serem imunopatologias (Hesse et al. 2004, Dunne & Cooke 2005, Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017) levanta a possibilidade de que o ambiente inflamatório causado por uma afete o balanço da resposta contra a outra, modificando o curso dessas infecções. Contudo, ainda resta muito a ser esclarecido sobre os efeitos dessa coinfecção.

Estudos em humanos indicam que infecções helmínticas, incluindo a esquistossomose, induzem diminuição da eficácia do tratamento da leishmaniose tegumentar e aumento da frequência de recidivas mesmo após tratamento anti-helmíntico (O'Neal et al. 2007, Unger et al. 2009, Newlove et al. 2011, Azeredo-Coutinho et al. 2016, Gregorio et al. 2019). Esses eventos negativos possivelmente estão atrelados a alterações na resposta imune típica à leishmaniose em indivíduos coinfectados, nos quais há aumento de indicativos de respostas do tipo 2 e regulatórias, que favorecem a proliferação de *Leishmania* spp. (O'Neal et al. 2007, Bafica et al. 2011, 2012, Lopes et al. 2014, 2018, 2019).

Estudos em modelos experimentais também têm contribuído para elucidar as alterações que ocorrem na coinfecção *Schistosoma-Leishmania*. Apesar de alguns trabalhos relatarem ausência de alteração nas lesões cutâneas de animais infectados simultaneamente por *S. mansoni* e *L. major* (Yoshida et al. 1999, Khayeka–Wandabwa et al. 2013), a infecção por *S. mansoni* encurtou o tempo para o aparecimento de lesões de *L. mexicana* em camundongos não-isogênicos (Coelho et al. 1980), retardou a resolução de lesões de *L. major* em camundongos C57BL/6 (la Flamme et al. 2002) e levou a maiores lesões de *L. major* nas patas de camundongos BALB/c (Yole et al. 2007). Quanto à resposta imune, células de linfonodo poplíteo e macrófagos peritoneais de animais infectados por *S. mansoni* apresentaram menor capacidade de controlar *L. major* devido à baixa produção de óxido nítrico (la Flamme et al. 2002).

A maioria dos artigos de coinfecção por *Schistosoma-Leishmania* publicados até agora foi realizada com *L. major* e *L. braziliensis* (la Flamme et al. 2002, Yole et al. 2007, Bafica et al. 2011, 2012, Lopes et al. 2014, 2018, 2019). Como a resposta imune e doença pode diferir muito entre espécies de *Leishmania* (Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017), é importante que outras espécies de *Leishmania* sejam investigadas. Atualmente, apesar de *L. amazonensis* ser o principal agente etiológico de uma das formas mais graves de leishmaniose tegumentar, a leishmaniose cutânea difusa (Barrientos 1948, Barral et al. 1991), apenas um trabalho avaliou impacto da esquistossomose sobre essa espécie, indicando maior carga de *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 (Thorstenberg et al. 2024).

Portanto, neste estudo, inicialmente, utilizou-se análise espacial para identificar regiões possivelmente coendêmicas para esquistossomose e leishmaniose tegumentar. Em seguida, foram investigadas, em modelos experimentais, alterações na resposta imune causadas pela infecção por *S. mansoni* que possam resultar em mudanças na patogênese e parasitismo de *L. amazonensis*. Para isso, este trabalho foi estruturado em um referencial teórico geral sobre o tema, seguido de dois capítulos, o primeiro sobre as análises espaciais, e o segundo acerca das coinfecção em modelos experimentais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A denominação de DTNs engloba um grupo de enfermidades que impactam mais de 1 bilhão de pessoas mundialmente, principalmente populações vulneráveis e marginalizadas de regiões tropicais e subtropicais (WHO 2020). No Brasil, a esquistossomose e as leishmanioses figuram, respectivamente, em segundo e quinto lugar de DTNs com maior impacto na saúde da população (Martins-Melo et al. 2018). Juntas, essas doenças foram responsáveis, somente no ano de 2016, por 143.226,7 DALYs no País (Martins-Melo et al. 2018).

2.1 A esquistossomose

Causada pelos trematódeos do gênero *Schistosoma*, a esquistossomose é uma doença parasitária endêmica em 78 países (figura 1), dos quais 50 requerem quimioterapia preventiva como forma de controle (WHO 2023). Estima-se que, em 2016, a esquistossomose tenha causado, aproximadamente, 24 mil mortes e 2,5 milhões de DALYs mundialmente (WHO 2020).

A África corresponde ao continente mais afetado pela esquistossomose, com estimativa de 166 milhões de pessoas infectadas, sendo a Nigéria o país com maior prevalência no mundo (Aula et al. 2021). No Brasil, a esquistossomose é a segunda principal DTN em morbidade e mortalidade (Martins-Melo et al. 2014b, 2016, 2018, Pinheiro et al. 2020). Segundo a OMS, o Brasil ainda apresenta áreas onde o controle da esquistossomose deveria utilizar quimioterapia preventiva; entretanto, não houve campanhas de tratamento no ano de 2022, e apenas 3.800 pessoas receberam tratamento direcionado para esquistossomose nesse ano (WHO 2023). O último Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses (Katz 2018) indicou que 0,99% da população analisada foi positiva para *S. mansoni* a partir da análise de duas lâminas de Kato-Katz de uma amostra de fezes.

A esquistossomose humana é causada por seis espécies de *Schistosoma*: *S. haematobium, S. japonicum, S. mekongi, S. guineensis, S. intercalatum* e *S. mansoni*, sendo que apenas *S. haematobium* causa esquistossomose urogenital, enquanto as outras espécies causam a forma intestinal da doença (Gryseels 2012, Colley et al. 2014, Weerakoon et al. 2015). Das espécies que parasitam o ser humano, *S. mansoni* é a única que se estabeleceu e é transmitida

em países endêmicos localizados no continente americano (Pirajá da Silva 1909, Weerakoon et al. 2015, WHO 2022).

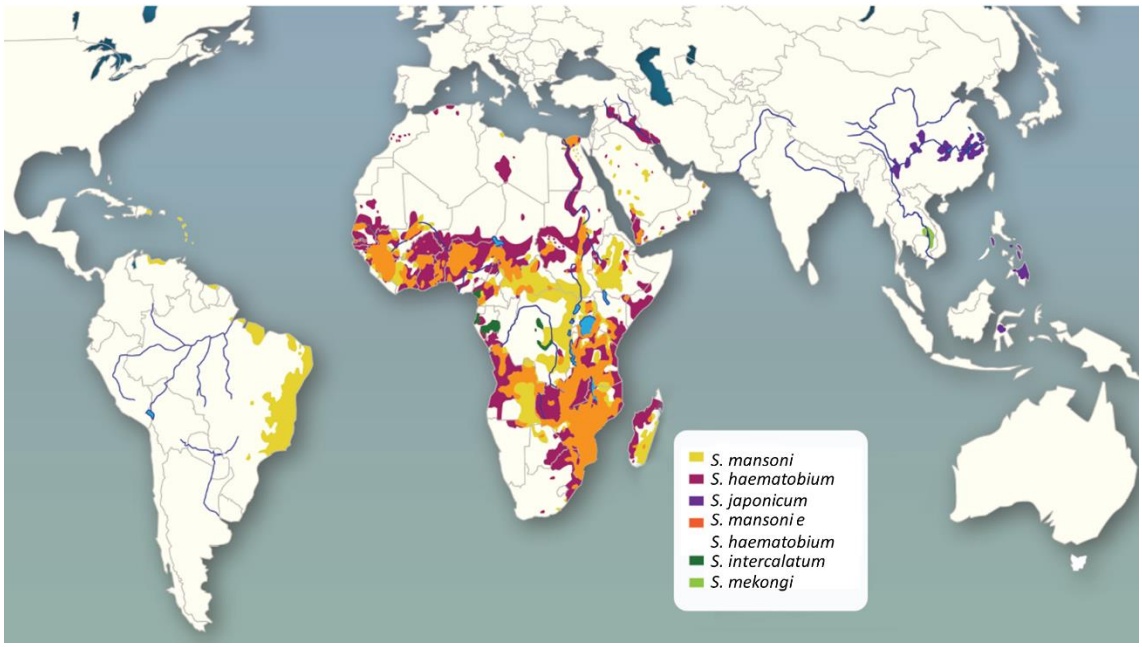


Figura 1. Distribuição global de espécies do gênero *Schistosoma* causadoras de esquistossomose em humanos. Fonte: Adaptado de Weerakoon et al. 2015.

Atualmente, o controle da esquistossomose enfrenta vários desafios. Existem relatos de baixa eficácia do tratamento em áreas endêmicas, principalmente na África (Stelma et al. 1995, Ismail et al. 1996, Melman et al. 2009). A hibridização entre diferentes espécies de *Schistosoma* spp., como *S. haematobium* e *S. bovis*, pode permitir a colonização de novos ambientes pelo parasito, aumentando a sua área de transmissão, como ocorreu na Ilha de Córsega, na França (Webster et al. 2013, Leger & Webster 2017, Catalano et al. 2018, Kincaid-Smith et al. 2021). Também, a baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos impede diagnóstico acurado, especialmente em regiões predominantemente de indivíduos com baixa carga (Oliveira et al. 2018), e há a possível participação de roedores silvestres como reservatórios da infecção em áreas da África e da América, mantendo o ciclo do parasito e favorecendo a formação de novos híbridos (Gentile et al. 2010, Miranda et al. 2015, 2022, Catalano et al. 2018). Devido à ausência de vacina, o acesso à água de qualidade, saneamento básico e tratamento em massa são os principais meios de controle da doença (WHO 2020, 2022, Kokaliaris et al. 2022). Logo, se faz necessário compreender o ciclo de vida do parasito para aplicação de intervenções mais efetivas de controle.

2.1.1 Ciclo de vida de *S. mansoni*

O trematódeo *S. mansoni* é um parasito de ciclo de vida heteroxênico, do qual fazem parte hospedeiros vertebrados e invertebrados, como se observa na figura 2 (McManus et al. 2018). Os ovos do parasito são eliminados nas fezes, e os miracídios eclodem ao atingir corpos de água doce; aqueles, por sua vez, penetram em caramujos do gênero *Biomphalaria* susceptíveis, desenvolvendo esporocistos, os quais, após reprodução assexuada e maturação, liberam cercárias (Pirajá da Silva 1912, Lutz 1918, 1919, Wolmarans et al. 2002, Colley et al. 2014).

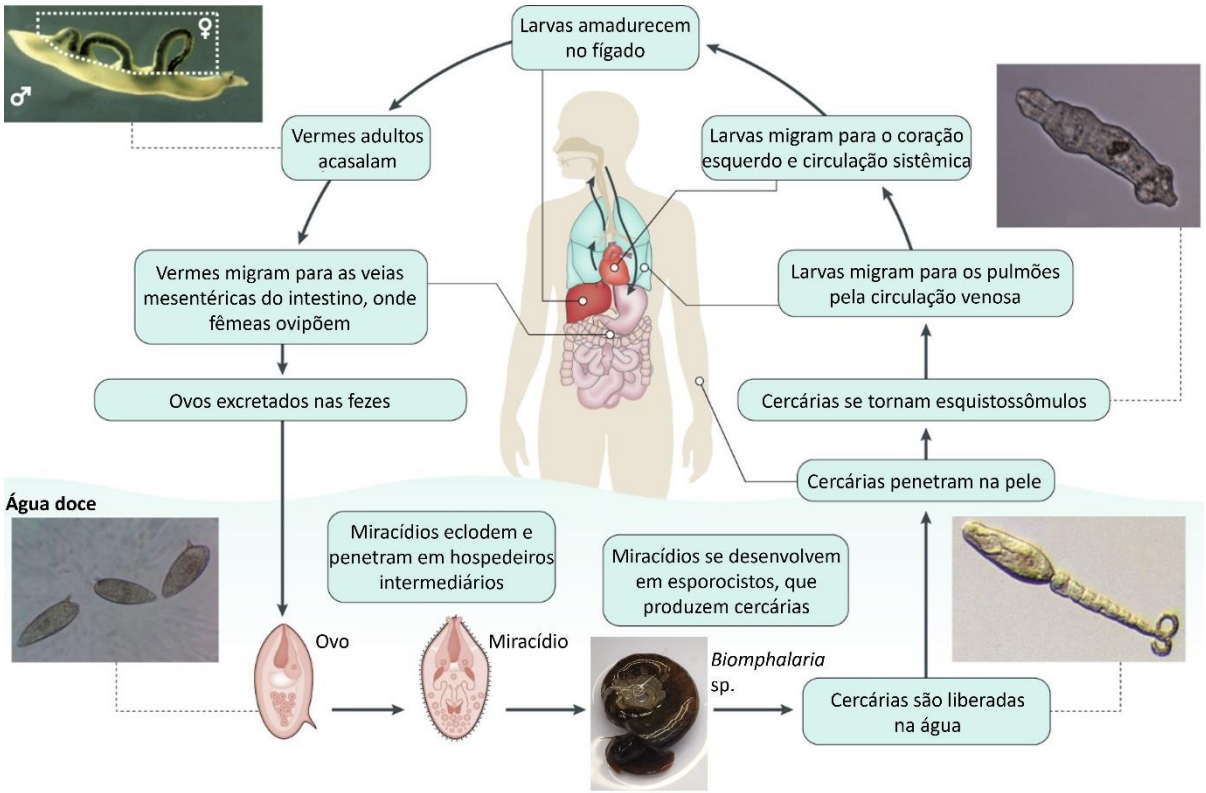


Figura 2. Ciclo de vida de *S. mansoni*. Após a eliminação dos ovos nas fezes, os miracídios eclodem e penetram em caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários. Após diferenciação em esporocistos e produção de cercárias, estas emergem dos caramujos e penetram no hospedeiro definitivo, no qual se tornam esquistossômulos e migram até a circulação porta-hepática, onde acasalam e amadurecem. Uma vez fecundadas, as fêmeas migram para as veias mesentéricas intestinais, onde ovipõem. Os ovos atravessam a parede intestinal e, uma vez alcançando o lúmen do intestinal, são eliminados com as fezes. Fonte: Adaptado de McManus et al. 2018.

As cercárias são a forma infectante para o hospedeiro vertebrado, penetrando através do tegumento em contato com água contaminada (Lutz 1919, Gryseels 2012, Colley et al. 2014).

Nesse processo, as cercárias perdem a cauda e se tornam esquistossômulos (Lutz 1919, Hockley & McLaren 1973, Wilson et al. 1978, Gobert et al. 2010), os quais se deslocam em direção a vasos sanguíneos, direcionados por gradiente de concentração de alguns nutrientes (Haas et al. 2002) e com o auxílio de enzimas proteolíticas (He et al. 2005). Durante a migração sanguínea dos esquistossômulos, eles passam majoritariamente pelo coração e o pulmão, ganhando a circulação sistêmica e se estabelecendo no sistema porta hepático entre o sétimo e o décimo dia pós-infecção (Barbosa et al. 1978, Wilson et al. 1978, Gobert et al. 2010). Durante o amadurecimento, há formação de casais, e machos secretam feromônios que contribuem para a maturação sexual das fêmeas (Lutz 1919, Armstrong 1965, Wilson et al. 1978, Jeremias et al. 2017, Chen et al. 2022).

Por volta do 25º e 30º dia pós-infecção, dá-se o início da oviposição, que ocorre preferencialmente nas veias mesentéricas ao redor do ceco e do cólon em humanos e no íleo em camundongos (Cao et al. 2010, Turner et al. 2012, Schwartz & Fallon 2018). Fêmeas depositam cerca de 300 ovos diariamente (Moore & Sandground 1956), os quais podem aderir à face interna do endotélio por meio de moléculas de adesão e componentes hemostáticos (Ritter & McKerrow 1996, Lejoly-Boisseau et al. 1999, Wu et al. 2007). Uma vez aderidos, cerca de um quarto à metade dos ovos atravessa a parede intestinal graças à secreção proteolítica e à própria resposta imune do hospedeiro, chegando à luz intestinal e sendo eliminados nas fezes, enquanto o restante pode ser passivamente carreado pela circulação e/ou ficar retido em diferentes tecidos do hospedeiro, especialmente fígado e intestino (Moore & Sandground 1956, Ashton et al. 2001, Turner et al. 2012, Hams et al. 2013, Schwartz & Fallon 2018). O percurso da circulação até o lúmen demora, aproximadamente, 7 dias, tempo que também é o necessário para a maturação dos miracídios (Ashton et al. 2001, Hams et al. 2013, Schwartz & Fallon 2018).

Durante o parasitismo do hospedeiro vertebrado descrito neste tópico, existem alterações patológicas características em cada fase da infecção por *S. mansoni*. Patogênese, sintomas e sinais clínicos são diretamente relacionados à própria resposta imune do hospedeiro, cuja relação será abordada em mais detalhes no próximo tópico.

2.1.2 Imunopatologia da esquistossomose mansoni

São descritas três fases distintas da esquistossomose em hospedeiros vertebrados: a fase aguda pré-postural, a aguda pós-postural e a crônica. Cada uma delas tem sido associada a perfis de resposta imune próprios, como ilustrado na figura 3 (Dunne & Cooke 2005).

Até a quinta semana de infecção, ocorre resposta à penetração das cercárias pelo tegumento e ao seu desenvolvimento em esquistossômulos e, subsequentemente, em adultos, a fim de controlar a carga parasitária (Smithers & Gammage 1980, Smithers & Miller 1980, Menson & Wilson 1989, Reynolds & Harn 1992). Nesse período, ocorre predominantemente um perfil inflamatório do tipo 1, com pico na terceira semana pós-infecção (Dunne & Cooke 2005). Macrófagos, quando estimulados *in vitro* com IFN-γ e antígenos secretados e excretados de esquistossômulos, aumentam a produção de TNF-α e são capazes de matar esse estágio do parasito por meio de aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (James et al. 1990, El Ridi et al. 2010, Egesa et al. 2018). Durante essa fase, pode ser comum ocorrer urticária, tosse, febre, dor de cabeça e dores musculares (Rocha et al. 1995, Gryseels 2012, Barsoum et al. 2013).

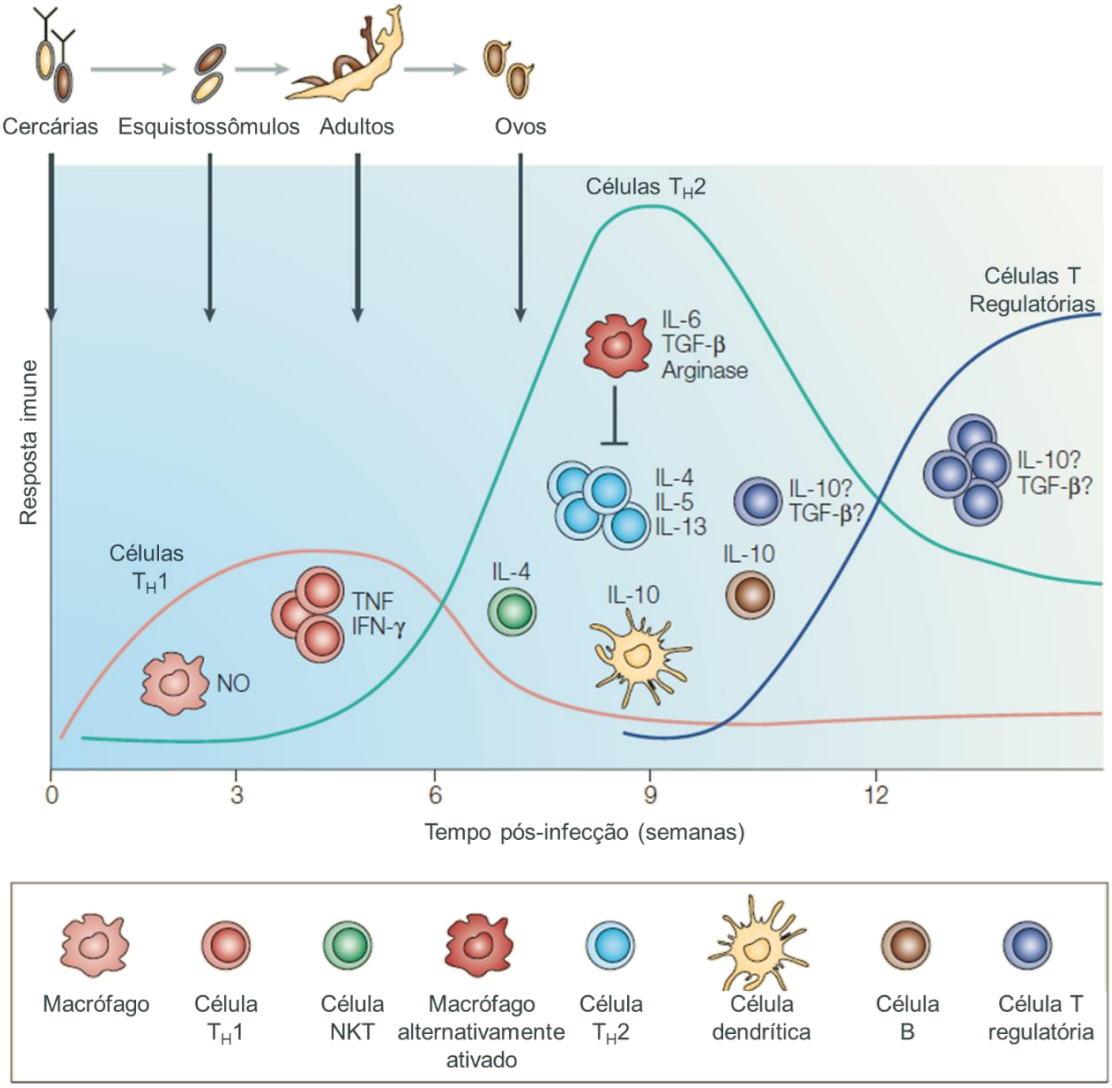


Figura 3. Sequência de indução dos diferentes perfis de resposta imune predominantes em cada período da infecção por *S. mansoni*. Com a penetração das cercárias e desenvolvimento dos vermes adultos, há estimulação de uma resposta predominantemente Th1, que é substituída por uma resposta majoritariamente Th2 em resposta a antígenos dos ovos e, sequencialmente, por uma resposta de perfil regulatório. NO: óxido nítrico. NKT: *natural killer* T. Fonte: Adaptado de Dunne & Cooke 2005.

Com o início da oviposição, por volta da sexta semana pós-infecção, acontece uma mudança no perfil imune, com a resposta do tipo 2 se tornando predominante, caracterizando a fase aguda pós-postural da esquistossomose (Dunne & Cooke 2005). A partir do momento em que o hospedeiro é exposto a antígenos do ovo, como ω1, α1 e LNFPIII, dá-se o desenvolvimento e polarização para uma resposta Th2, com predomínio de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 e envolvimento de células como eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados (Dunne et al. 1991, Okano et al. 1999, 2001, Herbert et al. 2004, Everts et al. 2009, 2012, Souza et al. 2020, Malta et al. 2022). Isso ocorre tanto pelo reconhecimento de porções de carboidratos quanto por ação citotóxica de alguns antígenos (Okano et al. 1999, Fitzsimmons

et al. 2005). O tipo de resposta promovido é do tipo granulomatosa, ilustrada na figura 4, que promove uma resposta de reparo tecidual capaz de conter os antígenos citotóxicos do ovo para preservar o parênquima dos órgãos do hospedeiro (Hoffmann et al. 2000, Hesse et al. 2001, Herbert et al. 2004). A formação apropriada do granuloma é essencial para a excreção de ovos e sobrevivência do hospedeiro, havendo aumento da mortalidade em camundongos geneticamente incapazes de estimular a resposta imune adequada (Doenhoff et al. 1978, Amiri et al. 1992, Brunet et al. 1997, Fallon et al. 2000, Hoffmann et al. 2000, Maggi et al. 2021).

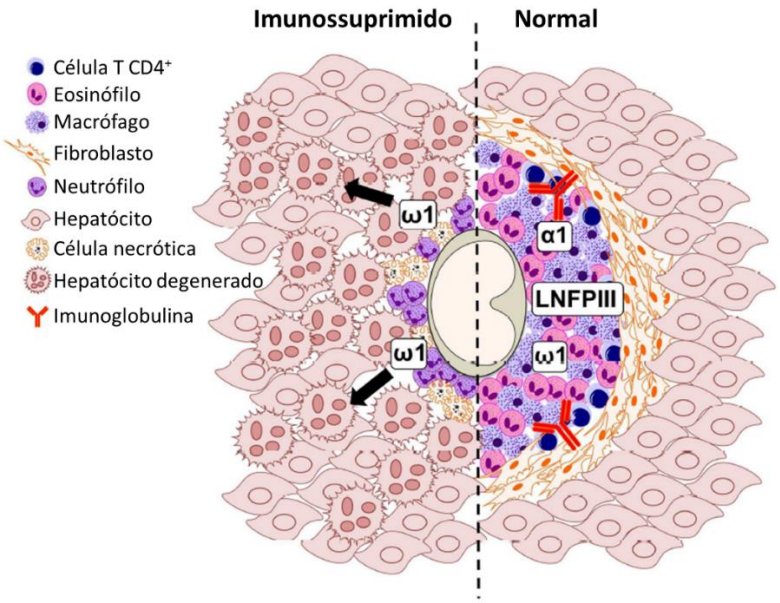


Figura 4. Representação gráfica de granuloma esquistossomótico hepático e seus constituintes. Dois granulomas são representados: à direita, um granuloma devidamente formado, com infiltrado inflamatório e deposição de colágeno por fibroblastos, contendo os antígenos citotóxicos liberados do ovo e mantendo a integridade do parênquima hepático; à esquerda, a reação granulomatosa insatisfatória em um ambiente de imunossupressão, deixando que antígenos citotóxicos extravasem e lesionem os hepatócitos. Seta: difusão de antígenos citotóxicos do ovo. Fonte: Adaptado de Hams, Aviello & Fallon 2013.

Além de variarem de órgão a órgão e fase de desenvolvimento (Weinstock & Boros 1983), os granulomas formados assumem aspectos diferentes conforme a doença se cronifica. Na fase aguda, os granulomas são maiores e mais celulares, enquanto na fase crônica, a partir da 11ª semana pós-infecção, eles têm aspecto menor e com maior deposição de matriz extracelular (Hams et al. 2013, Schwartz & Fallon 2018). Isso ocorre porque, ainda enquanto as respostas de fase aguda pré- e pós-postural são predominantes, desenvolve-se em paralelo uma resposta de perfil regulatório, havendo indução de citocinas como IL-10 e TGF-β (Hesse

et al. 2004, Dunne & Cooke 2005, Taylor et al. 2006, Turner et al. 2011, Gomides et al. 2024). Nesse processo, há o envolvimento de células T e B regulatórias e macrófagos, os quais agora assumem um papel maior de modulação e deposição de colágeno (Villanueva et al. 1994, Taylor et al. 2006, Layland et al. 2007, Zaccone et al. 2009, Haeberlein et al. 2017).

Contudo, apesar de indispensável, o granuloma também é a principal causa de patologia da esquistossomose. A patogênese, nesse caso, costuma ser reflexo do acúmulo gradual de ovos e, consequentemente, da evolução de granulomas para fibrose e calcificação (Gryseels 2012, Hams et al. 2013, Barsoum et al. 2013). Os ovos que ficam retidos na parede intestinal podem causar congestão de vasos, edema, formação de pólipos, ulceração, diarreia, sanguinolenta ou não, e fibrose intestinal e consequente piora na absorção de nutrientes pelo hospedeiro (Gryseels 2012, Barsoum et al. 2013). A outra parte dos ovos, porém, acaba sendo carreada pela circulação e fica retida majoritariamente no fígado (Moore & Sandground 1956, Gryseels 2012). Nesse órgão, os granulomas levam à fibrose hepática e consequente hipertensão porta pré-sinusoidal, sendo a esquistossomose a segunda maior causa de hipertensão portal no mundo (Hesse et al. 2001, Gryseels 2012, Barsoum et al. 2013, Bosch & Iwakiri 2018). Por causa disso, ocorre hepatomegalia, juntamente com esplenomegalia por aumento do retorno venoso e resultante congestão (Freitas et al. 1999, Gryseels 2012, Barsoum et al. 2013), caracterizando a esquistossomose hepatoesplênica. Nela, também podem ocorrer ascite, caquexia e, em crianças, retardo do crescimento (Gryseels 2012, Barsoum et al. 2013). Ademais, isso gera, juntamente com a angiogênese estimulada por antígenos dos ovos, o aparecimento de varizes, as quais podem levam à morte por hemorragia interna em caso de rompimento (Freedman & Ottesen 1988, Loeffler et al. 2002, Shariati et al. 2011, Gryseels 2012).

2.2 As leishmanioses

Assim como a esquistossomose, as leishmanioses fazem parte das doenças tropicais negligenciadas, podendo ser causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania* spp., pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Momen & Cupolillo 2000, Reithinger et al. 2007, Scorza et al. 2017, WHO 2020), sendo responsáveis por dois tipos principais de doenças: a leishmaniose visceral, que afeta órgãos internos, e a leishmaniose tegumentar, que afeta principalmente a pele e as mucosas das pessoas infectadas. O Brasil é o único país considerado de alta morbidade para ambas as leishmanioses (Ruiz-Postigo et al. 2022, 2023).

A leishmaniose visceral, a forma menos prevalente da leishmaniose, é endêmica em 80 países (figura 5) e teve registro de 12.842 casos em 2022, distribuídos principalmente no Leste da África, no subcontinente Indiano e no Brasil (WHO 2020, Ruiz-Postigo et al. 2023). Apesar de apresentar menos casos, essa forma causa maior morbidade, calculada em 510 mil DALYs em 2017, assim como maior mortalidade (WHO 2020, Ruiz-Postigo et al. 2022). No Brasil, 9,8% dos casos relatados em 2022 evoluíram para óbito, a pior taxa de letalidade entre os países que relataram mortes por leishmaniose visceral nesse ano (Ruiz-Postigo et al. 2023).

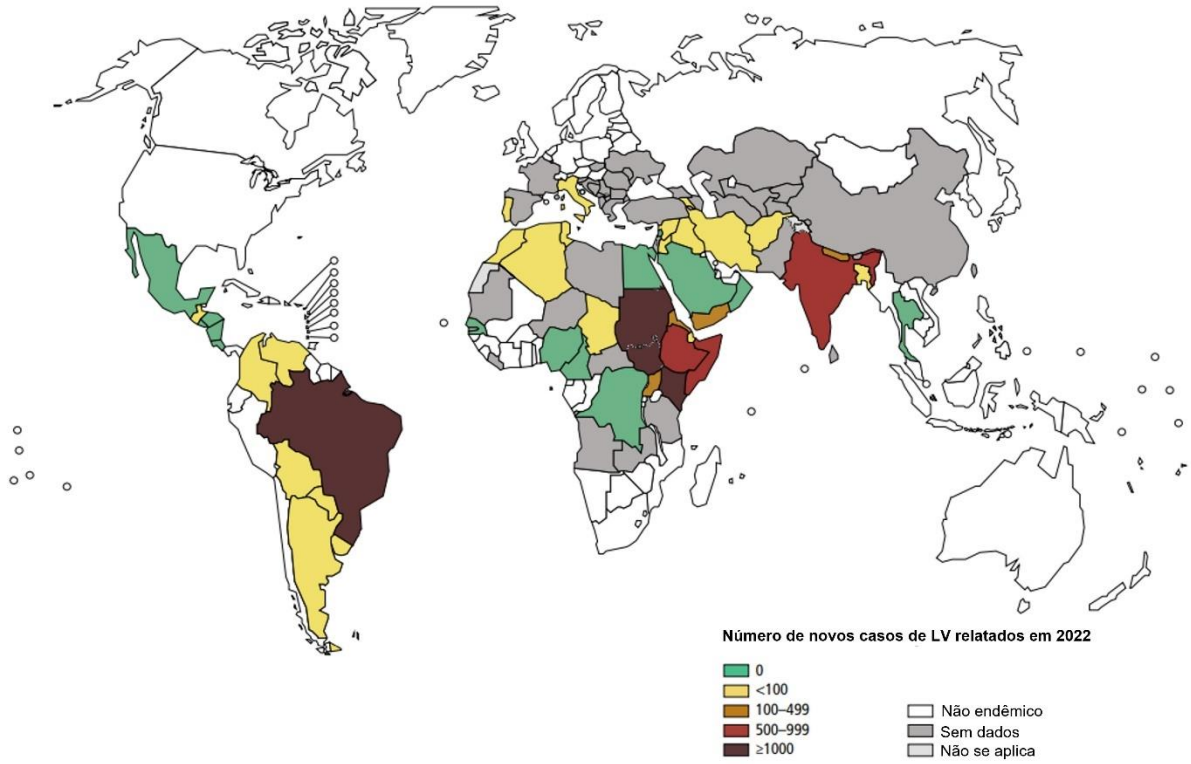


Figura 5. Distribuição de novos casos de leishmaniose visceral em 2022. LV: leishmaniose visceral. Fonte: Adaptado de Ruiz-Postigo et al. 2023.

Já a leishmaniose tegumentar (figura 6), foco deste trabalho, é muito mais prevalente do que a leishmaniose visceral, sendo endêmica em 90 países, com 205.986 casos registrados em 2022, causando 260 mil DALYs em 2017 (WHO 2020, Ruiz-Postigo et al. 2023). Como é possível observar na figura 6, a maioria dos casos se concentra na América do Sul e Leste do Mediterrâneo, sendo que, em 2022, oito países concentram mais de 85% dos novos casos de leishmaniose tegumentar, grupo que inclui o Brasil (Ruiz-Postigo et al. 2023). Apesar de ser menos letal, a leishmaniose tegumentar pode levar a cicatrizes marcantes e duradouras, por

vezes desfigurantes, causando um número maior de anos vividos com incapacidade (YLDs – *years lived with disability*) em comparação à leishmaniose visceral (Bezerra et al. 2018a).

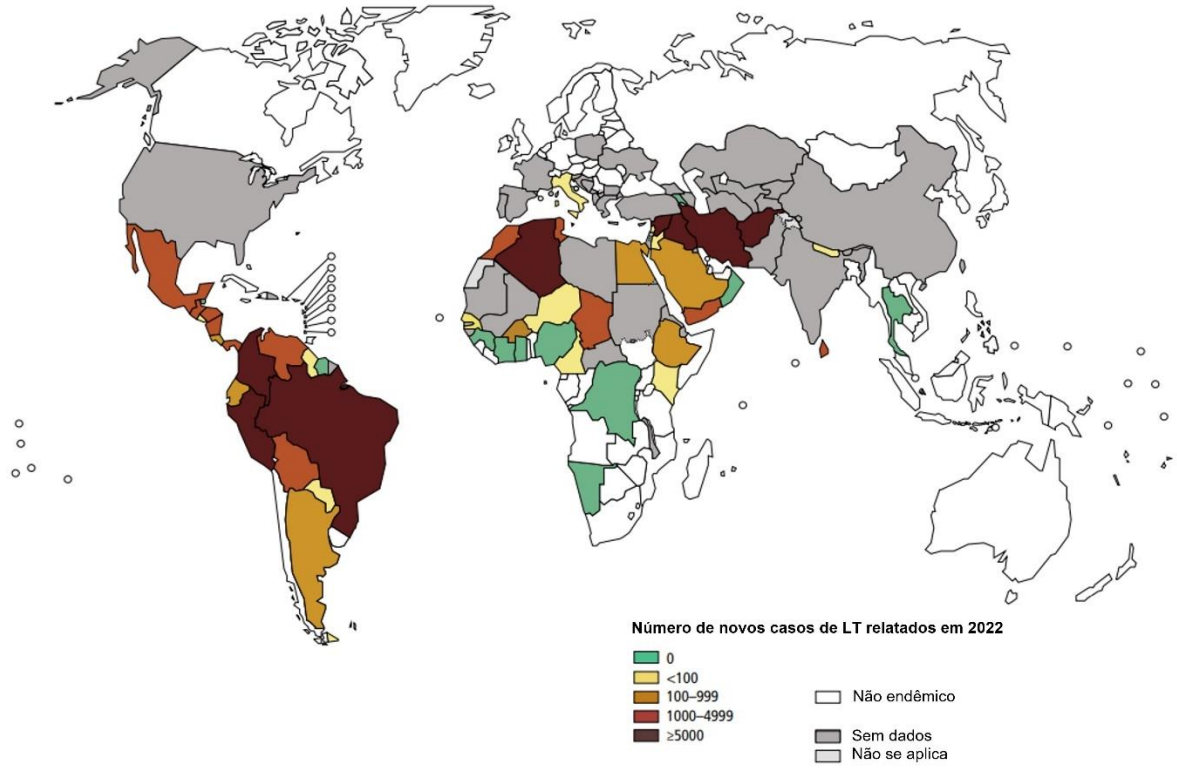


Figura 6. Distribuição de novos casos de leishmaniose tegumentar em 2022. LT: leishmaniose tegumentar. Fonte: Adaptado de Ruiz-Postigo et al. 2023.

2.2.1 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo heteroxênico (figura 7). A infecção dos hospedeiros invertebrados, fêmeas de flebotomíneo, ocorre quando estes realizam repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, ingerindo células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) infectadas com amastigotas (Dostálová & Volf 2012, Bates 2018). Estas, por sua vez, se diferenciam sequencialmente enquanto escapam da matriz peritrófica e colonizam o intestino do hospedeiro intermediário até que se tornem promastigotas metacíclicas, a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Lainson et al. 1977, Rogers et al. 2002, Bates 2018, Serafim et al. 2018, 2021).

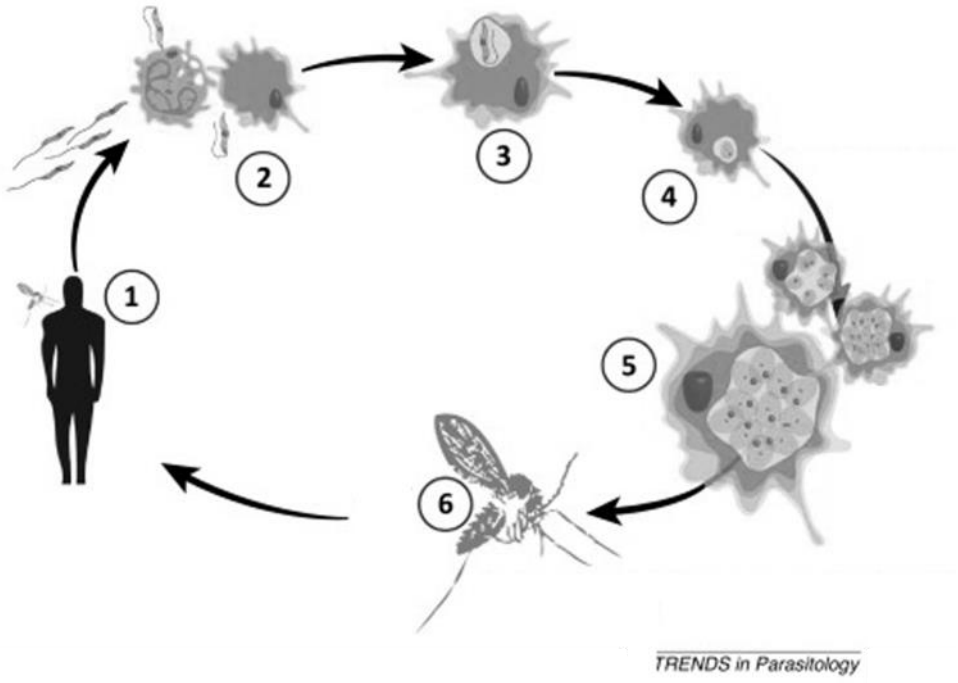


Figura 7. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. Fêmea de flebotomíneo infectada realiza repasto sanguíneo infectante no hospedeiro vertebrado (1). Promastigotas infectam granulócitos e macrófagos (2 e 3) e se diferenciam em amastigotas (4). Amastigotas se multiplicam dentro de células do sistema fagocítico mononuclear (5). Uma nova fêmea de flebotomíneo se infecta ingerindo células parasitadas (6). Fonte: Adaptado de Cantacessi et al. 2015.

Durante a infecção do hospedeiro vertebrado, além de saliva, parte do conteúdo intestinal do flebotomíneo é regurgitado e, com ele, as promastigotas metacíclicas (Samuelson et al. 1991, van Zandbergen et al. 2006, Lestinova et al. 2017). As células-alvo para o parasitismo de *Leishmania* spp. são células do SFM, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, onde se desenvolvem dentro de fagolisossomos (Berman et al. 1981, Courret et al. 2002, Romano et al. 2017). A infecção desses tipos celulares ocorre, majoritariamente, por fagocitose, mas existem evidências de outras formas de entrada (Zenian et al. 1979, Forestier et al. 2011, Roy et al. 2014, Cavalcante-Costa et al. 2019). Além disso, estudos com *L. major* indicam que esta pode infectar transitoriamente neutrófilos, utilizando-os como "cavalo-de-Tróia", retardando sua apoptose e entrando silenciosamente em monócitos inflamatórios (Aga et al. 2002, van Zandbergen et al. 2004, Peters et al. 2008, Romano et al. 2017). A interação com neutrófilos apoptóticos também favorece a proliferação de amastigotas em macrófagos já infectados por *L. amazonensis* (Afonso et al. 2008). Contudo, existem evidências de que outras espécies de *Leishmania*, como *L. braziliensis*, podem não ser capazes de retardar a apoptose de neutrófilos (Falcão et al. 2015). Além disso, algumas espécies, como *L. amazonensis* e *L. major*,

são capazes de infectar também células não fagocíticas, como fibroblastos, por vias independentes de fagocitose (Bogdan et al. 2000, Cavalcante-Costa et al. 2019).

Uma vez dentro do vacúolo parasitóforo, as promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas, as quais se multiplicam e são a forma de persistência no hospedeiro vertebrado (Heyde et al. 2018). No entanto, a forma exata de amplificação da infecção ainda não é completamente esclarecida. Foi mostrado que a transferência de parasitos para outras células pode ocorrer, para *L. amazonensis* e *L. major*, por fagocitose de corpos apoptóticos de macrófagos contendo amastigotas (Real et al. 2014, DaMata et al. 2015, Heyde et al. 2018). O fato de *Leishmania* sp. parasitar células fagocíticas exige uma interação complexa com o sistema imune do hospedeiro. Não é sem razão que a patogênese da leishmaniose também esteja altamente ligada à resposta imune do hospedeiro, as quais serão detalhados no tópico seguinte.

2.2.2 Imunopatologia da leishmaniose tegumentar americana

Assim como a esquistossomose, a leishmaniose tegumentar é uma imunopatologia. As manifestações da infecção estão estritamente ligadas não somente à espécie e cepa de *Leishmania* sp. causadora da infecção, mas também da própria resposta imune do hospedeiro (Pereira et al. 2009b, Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017). Na determinação do desfecho da leishmaniose tegumentar, existe um balanço entre respostas do tipo 1, com produção de citocinas como IFN-γ e IL-12, que levam ao controle do parasito, mas também a dano tecidual, e respostas do tipo 2 e regulatórias, com o envolvimento de citocinas como IL-4 e IL-10, que controlam o dano aos tecidos do hospedeiro, mas permitem proliferação do parasito (Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017).

O controle das amastigotas em células do SFM se dá (figura 8), principalmente, com estimulação por IFN-γ e TNF-α, aumentando os níveis de IL-12 e a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enzima que converte L-arginina em óxido nítrico, tóxico para *Leishmania* spp. (Green et al. 1990, Liew et al. 1990, 1991, Filardy et al. 2010, Chen et al. 2021). Além disso, o consumo de L-arginina para produção de óxido nítrico também diminui a disponibilidade desse nutriente no vacúolo parasitóforo (Rath et al. 2014, Muxel et al. 2018). Para o controle de algumas espécies, como *L. amazonensis*, a produção de espécies reativas de oxigênio, como superóxido, também é essencial (Petersen et al. 2007). Por outro lado, em um ambiente com predominância de uma resposta de tipo 2 ou regulatória, na presença de citocinas

como IL-4, IL-10, e TGF-β, ocorre aumento da atividade de arginase, enzima que também utiliza como substrato L-arginina, produzindo L-ornitina e outras poliaminas, que, ao contrário do oxido nítrico, favorecem o crescimento de *Leishmania* sp. no interior dos macrófagos infectados (Iniesta et al. 2001, 2002, Muxel et al. 2018).

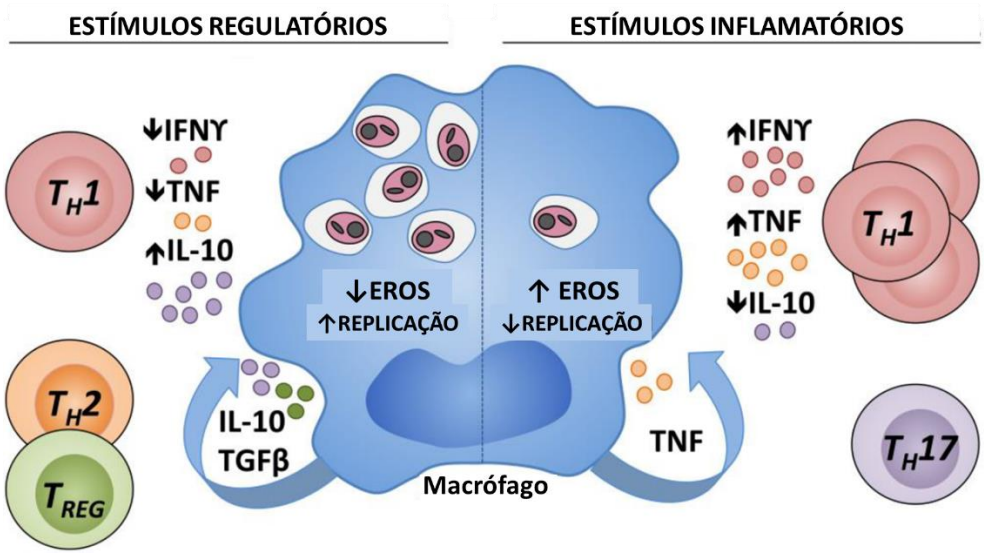


Figura 8. Mecanismos de controle de amastigotas de *Leishmania* sp. em macrófagos. O microambiente imune é determinante para a permitir ou controlar a proliferação de amastigotas. À esquerda, em um ambiente com predomínio de respostas Th2 e regulatórias, ocorre aumento de citocinas como IL-10 e TGF-β, que sinalizam para que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) seja diminuída, assim como reduz a atividade de respostas Th1 e permite a maior proliferação intracelular do parasito. À direita, se evidencia um estado com maior atividade de reposta Th1 e Th17 e baixa em respostas Th2 e regulatórias, ambiente no qual o aumento de TNF- e IFN-γ resultam numa maior produção de EROs e consequente diminuição da carga parasitária. Fonte: adaptado de Scorza et al. 2017.

Mecanismos da resposta adaptativa mediados por células T são essenciais na imunopatologia da leishmaniose tegumentar. A participação de linfócitos T $CD8^+$ na leishmaniose tegumentar tem sido associada, principalmente, à destruição tecidual (Brodskyn et al. 1997, Faria et al. 2009, Koh et al. 2020, Novais et al. 2021). Já linfócitos T $CD4^+$ possuem papeis relativamente dicotômicos. Em camundongos C57BL/6 infectados por *L. major*, há maior diferenciação de células Th1, produtoras de IFN-γ, levando ao controle da infecção e cura; já a mesma infecção em camundongos BALB/c, com a diferenciação relativamente maior de células Th2 e níveis maiores de citocinas como IL-4, há o surgimento de lesões crônicas (Heinzel et al. 1989). No caso de camundongos C57BL/6 deficientes em IFN-γ, ocorre aumento da população de células Th2, ocasionando lesões maiores em decorrência da infecção por *L. major* (Wang et al. 1994). No início da infecção, em vez de linfócitos Th1, células NK são as

principais produtoras de IFN-γ (Prajeeth et al. 2011). Contudo, a ativação de uma resposta adaptativa eficiente também varia entre espécies de *Leishmania*, já que componentes dos antígenos de *L. amazonensis* inibem resposta proliferativa de células T, o que não ocorre com antígenos de *L. braziliensis* (Pinheiro et al. 2004).

Quanto à resposta humoral, anticorpos parecem ter efeito deletério no controle da infecção. Aumento de IgG, associado à maior produção de IL-10 e IL-17, são acompanhados por aumento da susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* (Sousa et al. 2014). Em camundongos BALB/c deficientes em IgG ou receptores de célula B, há aumento da resistência contra *L. major*, perfil esse revertido com a administração de anticorpos anti-*Leishmania* ou transferência de células B funcionais (Miles et al. 2005, Ronet et al. 2008). Os títulos de IgG anti-*Leishmania* também se encontram elevados em pacientes com leishmaniose difusa por *L. mexicana* (Salaiza-Suazo et al. 2024). A ativação de FcγR em macrófagos induz produção de IL-10 *in vitro*, enquanto o comprometimento dessa via de sinalização torna camundongos mais resistentes a *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. pifanoi* (Kima et al. 2000, Buxbaum & Scott 2005). Além da produção de anticorpos, a importância de linfócitos B na susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* tem sido também associada ao fato dessas células serem importante fonte de IL-4 durante a infecção (Hurdayal et al. 2017).

É frequente, também, a interação entre macrófagos e outras células no infiltrado celular na infecção por *Leishmania* sp., como neutrófilos e eosinófilos (Grimaldi Jr et al. 1984, Pompeu et al. 1991, Filardy et al. 2011). Neutrófilos, os primeiros leucócitos a infiltrar para o sítio de infecção de *Leishmania* sp., além de poderem matar promastigotas com armadilhas extracelulares (NETs – *neutrophil extracellular traps*), também podem interagir com macrófagos infectados e secretar mediadores que levam à sua ativação para perfil microbicida (Guimarães-Costa et al. 2009, Sousa et al. 2014, Tavares et al. 2016, Romano et al. 2017). Contudo, neutrófilos apoptóticos infectados, ao exibirem fosfatidilserina na face externa de sua membrana plasmática, favorecem o crescimento do parasito durante a interação com macrófagos (van Zandbergen et al. 2004, Afonso et al. 2008). Além disso, aumento de IL-17 na ausência de neutrófilos, tanto em camundongos BALB/c sem neutrófilos quanto por adição dessa citocina em cultura de macrófagos *in vitro*, aumenta a atividade de arginase e favorece a proliferação de *L. amazonensis* (Sousa et al. 2014). Ademais, nos momentos iniciais da infecção, quando neutrófilos interagem com promastigotas apoptóticas de *L. major*, eles também aumentam produção de TGF-β e diminuem a de TNF-α, o que pode contribuir para o estabelecimento do parasito (van Zandbergen et al. 2006).

Já eosinófilos, recrutados por CCL24 secretada por macrófagos infectados, são a principal fonte de IL-4 no início da infecção por *L. major*, auxiliando a proliferação de amastigotas (Lee et al. 2020, Sasse et al. 2022). Porém, *in vitro*, essas células também podem ter um papel protetor no controle do parasito. Por meio de secreção de PGD2, eosinófilos interagem com macrófagos infectados por *L. amazonensis*, favorecendo que estes eliminem amastigotas (Marques et al. 2021). *In vivo*, camundongos C3H/HeN transgênicos para IL-5 (C3H/HeN-TgN(IL-5)-Imeg), os quais têm eosinofilia de forma fisiológica, apresentam lesões reduzidas e menor carga parasitária de *L. amazonensis* (Watanabe et al. 2004). Contudo, a eosinofilia sanguínea e aumento da infiltração de eosinófilos em lesões de pacientes com leishmaniose difusa não foram associados à proteção, sendo essas células produtoras de IL-6, IL-8 e IL-13, associadas à progressão da doença (Salaiza-Suazo et al. 2024).

A resposta orquestrada por todos esses tipos celulares é determinante na manifestação da leishmaniose tegumentar. As formas clínicas da doença em humanos estão distribuídas num espectro imunológico (figura 9), variando de uma resposta exacerbada, causando extrema destruição tecidual e maior controle da carga parasitária, até o estabelecimento de um estado de anergia e falta de controle do parasito (Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017).

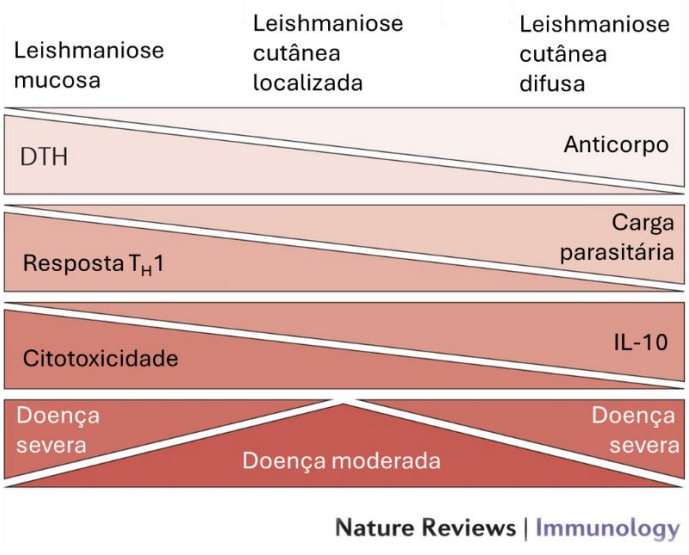


Figura 9. Espectro das manifestações de leishmaniose tegumentar em humanos de acordo com a resposta imune do hospedeiro. Quando há um perfil de resposta imune mais equilibrado, a tendência é que ocorram formas mais simples de leishmaniose tegumentar, como a leishmaniose cutânea localizada. Com o desbalanço, outras manifestações mais severas se tornam mais frequentes, como a leishmaniose mucosa no caso de aumento exacerbado de respostas do tipo 1, com aumento de atividade citotóxica e destruição tecidual. Já num polo com aumento de respostas regulatórias e do tipo 2, ocorre descontrole na reprodução dos parasitos, aumentando a carga parasitária. DTH: reação de hipersensibilidade tardia. Fonte: Adaptado de Scott & Novais 2016.

A leishmaniose cutânea localizada (LCL), forma mais prevalente da leishmaniose tegumentar, é, em relação às outras, a menos patogênica (Marzochi & Marzochi 1994, Scorza et al. 2017). Ela é caracterizada por um perfil de resposta mais balanceado do que nas outras manifestações, com aparecimento de úlceras, de fundo granuloso ou necrótico, e bordas elevadas, principalmente em regiões expostas do corpo (Marzochi & Marzochi 1994, Unger et al. 2009, Scorza et al. 2017). Pode, também, ocorrer linfadenopatia antes ou depois do aparecimento das lesões (Barral et al. 1995b, Sousa et al. 1995). As lesões são de caráter autolimitado e possuem boa resposta ao tratamento medicamentoso, mas resultam em cicatrizes deprimidas e hipopigmentadas, as quais podem albergar parasitos ainda por vários anos após tratamento e cura clínica (Schubach et al. 1998, Unger et al. 2009, Scorza et al. 2017). Quando há quebra do balanço entre respostas do tipo 1 e respostas do tipo 2 e regulatórias, por diversos motivos, ocorrem outras manifestações de leishmaniose tegumentar (Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017).

Por migração sistêmica dos parasitos, pode ocorrer leishmaniose disseminada (LD), sendo causada por *L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis, L. peruviana* e *L. amazonensis* (Costa et al. 1986, Carvalho et al. 1994, Couppié et al. 2004, Hashiguchi et al. 2016, Espinoza-Morales et al. 2017). Em contrates à LCL, essa manifestação se dá com forte reação de hipersensibilidade tardia do tipo 1 e surgimento de lesões múltiplas com poucos parasitos, variando entre acneiformes, nodulares, papulares e ulceradas em pelo menos duas regiões não contíguas do corpo, além de ser comum envolvimento de mucosas (Marzochi & Marzochi 1994, Turetz et al. 2002). Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos com LD produzem níveis sérios mais altos de CXCL9, mas concentrações similares de IFN-γ, TNF-α, IL-10, TGF-β, CCL2, CCL3, CCL11 e CXCL10 nas lesões (Machado et al. 2011). Apesar de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LD produzirem menos IFN-γ e TNF-α frente à estimulação com antígenos de *L. braziliensis*, isolados desse parasito adquiridos de pacientes com LD induzem maior produção de IFN-γ e TNF-α em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LCL (Turetz et al. 2002, Leopoldo et al. 2006). Níveis mais elevados de IFN-γ e CXCL10 também são associados a maiores títulos de IgG em pacientes com LD, e aumento IgG2 é relacionado a um maior número de lesões (Magalhães et al. 2021). Apesar de indivíduos com LD costumarem ter resposta satisfatória ao tratamento, pode haver casos refratários e necessidade de mais de um ciclo (Carvalho et al. 1994, Turetz et al. 2002, Couppié et al. 2004, Hashiguchi et al. 2016).

No polo extremo de hiperresponsividade, a leishmaniose mucosa (LM) é causada principalmente por espécies do subgênero *Viannia*, principalmente *L. braziliensis*, mas também já foram registrados casos por *L. panamensis, L. guyanensis* e, do subgênero *Leishmania*, *L. amazonensis* (Villela et al. 1939, Naiff et al. 1988, Barral et al. 1991, Osorio et al. 1998). Muitas vezes, acontece de forma secundária à LCL, podendo ocorrer também por disseminação do parasito ou por contiguidade de lesão cutânea prévia (Marzochi & Marzochi 1994). A LM pode começar como inflamação e congestão nasal e é caracterizada pelo comprometimento da mucosa nasal, palato mole, faringe, laringe, lábios e bochecha, mas pode afetar também traqueia e genitália (Marzochi & Marzochi 1994, Pearson & Sousa 1996, Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017).

Indivíduos acometidos por LM normalmente apresentam intradermorreação de Montenegro muito forte e uma reação de hipersensibilidade do tipo 1 mais intensa, com aumento de citocinas de perfil Th1 e Th17, como IFN-γ, TNF-α e IL-17 (Bacellar et al. 2002, Gaze et al. 2006, Boaventura et al. 2010). Além disso, a atividade de células T $CD8^+$ e células NK é aumentada em comparação aos indivíduos com LCL, levando a uma maior destruição tecidual (Brodskyn et al. 1997, Koh et al. 2020). Paralelamente, pacientes com LM apresentam não só níveis menores de IL-10, comprometendo o controle da inflamação, mas suas células também expressam menos IL-10R e são menos responsivas a TGF-β (Bacellar et al. 2002, Faria et al. 2005). Por causa desses mecanismos inflamatórios agindo de forma agravada, a presença de amastigotas é baixíssima nas lesões de LM (Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017). Quanto à resposta humoral, IgE total e específico se encontra reduzido nessa forma da doença (Afchain et al. 1983), mais um indicativo de predominância de resposta polarizada para tipo 1. Os títulos de IgG total, IgG1 e IgG2 estão relacionados com a progressão da doença, estando aumentados em casos mais graves e diminuindo com o sucesso no tratamento e melhora clínica (de Lima et al. 2021).

Essa forma possui tratamento muito difícil, normalmente necessitando de mais de um ciclo terapêutico (Franke et al. 1990, Amato et al. 2007, 2008, Carvalho et al. 2022). O uso simultâneo de medicamentos para auxiliar no controle da inflamação, como pentoxifilina, tem apresentado resultados mistos no sucesso do tratamento, aparentando melhora no desfecho de LM por *L. braziliensis*, mas não *L. panamensis* (Lessa et al. 2001, de Carvalho et al. 2017, Brustolin et al. 2021, Castro et al. 2022, Carvalho et al. 2022).

Finalmente, no extremo de hiporreatividade, está a leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA), causada na América principalmente por *L. amazonensis*, mas também por *L.*

mexicana, *L. pifanoi* e *L. panamensis* (Convit et al. 1972, Velasco et al. 1989, Barral et al. 1991, Freites et al. 2018). As lesões de LCDA são múltiplas, nodulares e não ulcerativas, apresentando quantidades altas de amastigotas, mas baixo infiltrado linfocitário e pouca ou nenhuma resposta de hipersensibilidade tardia do tipo 1 (Barrientos 1948, Convit et al. 1972). A resposta ao tratamento é fraca, sendo muito comuns casos de recidiva (Convit et al. 1972, Franke et al. 1990, Zerpa et al. 2007). Apesar dos indivíduos com essa forma da doença estabelecerem resposta humoral, a resposta celular, indispensável para controle do parasito, é praticamente ausente (Petersen et al. 1982, Barral et al. 1995a). Sendo assim, a alta carga parasitária e ausência de úlceras, somadas à falta de resposta à intradermorreação de Montenegro, indicam anergia dos pacientes ao protozoário (Barrientos 1948, Petersen et al. 1982, Barral et al. 1995a). Células de indivíduos com LCDA apresentam uma frequência menor de marcadores de inflamação como iNOS, IL-12, IFN-γ, TNF-α, CCL2, CCL4, CCL17 e CCL19 (Ritter et al. 1996, Diaz et al. 2006, Campanelli et al. 2010, Díaz et al. 2013). No sangue periférico, há aumento da frequência de ILC2 em pacientes com LCDA em comparação a indivíduos não infectados por *Leishmania* sp. (Rodríguez et al. 2021). No infiltrado intralesional, há diminuição da presença de células $CCR5^+$, incluindo células T $CD4^+$ e células NK, as quais também produzem menos IFN-γ e TNF-α quando estimuladas (Coêlho et al. 2010, Cañeda-Guzmán et al. 2014). Essa manifestação, assim como a LM, não responde bem ao tratamento com medicamentos leishmanicidas convencionais, sendo as recidivas frequentes (Bomfim et al. 1996, Rêgo et al. 2022). O uso de imunoterapia em associação ao tratamento clássico pode apresentar melhores resultados, com o aumento da frequência de células NK e monócitos pró-inflamatórios (Convit et al. 1989, Pereira et al. 2009a).

Além das manifestações mais bem descritas, ainda há formas atípicas de leishmaniose tegumentar em humanos. Nesse caso, as lesões podem ser verrucosas, lupoides, zosteriformes, vegetantes ou tumoriformes, causadas principalmente por *L. braziliensis* (Guimarães et al. 2009, Quaresma et al. 2018). Essas formas da doença parecem também ter etiologia multifatorial, dependendo de fatores ambientais, cepa do parasito e resposta imune do hospedeiro, com maiores níveis de IFN-γ e TNF e menor produção de IL-10 e IL-17 quando comparado a LCL (Guimarães et al. 2016, Quaresma et al. 2018, Esteves et al. 2022). Quanto ao tratamento, manifestações atípicas também apresentam pior resposta à terapia com antimônio (Guimarães et al. 2009, 2016, Rugani et al. 2018, Esteves et al. 2022).

Sendo a leishmaniose tegumentar e a esquistossomose tão intrinsecamente atreladas à resposta imune do hospedeiro (Dunne & Cooke 2005, Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017),

alterações nos balanços entre diferentes perfis de resposta imune induzidos nessas infecções podem alterar grandemente a evolução dos quadros clínicos. Dentre diversos fatores que podem ocasionar tal desbalanço, encontram-se as coinfecções.

2.3 As coinfecções *Schistosoma-Leishmania*

DTNs raramente ocorrem de forma isolada, e coinfecção helmínticas já são classificadas entre os fatores que têm mais capacidade de influenciar as leishmanioses (Akuffo et al. 2018). Apesar da sua importância, estudos que avaliam a existência de casos de coinfecção entre *S. mansoni* e *Leishmania* spp. são raros. Fora do Brasil, existe apenas um relato de coinfecção entre *S. mansoni* e uma espécie do complexo *L. donovani* em refugiado em Israel (Paran 2018). No Brasil, como é possível observar na figura 10, existem muitas regiões em que acontece sobreposição da ocorrência de esquistossomose e leishmanioses. Não surpreendentemente, o País é onde há o maior número de relatos de coinfecção *Schistosoma-Leishmania*.

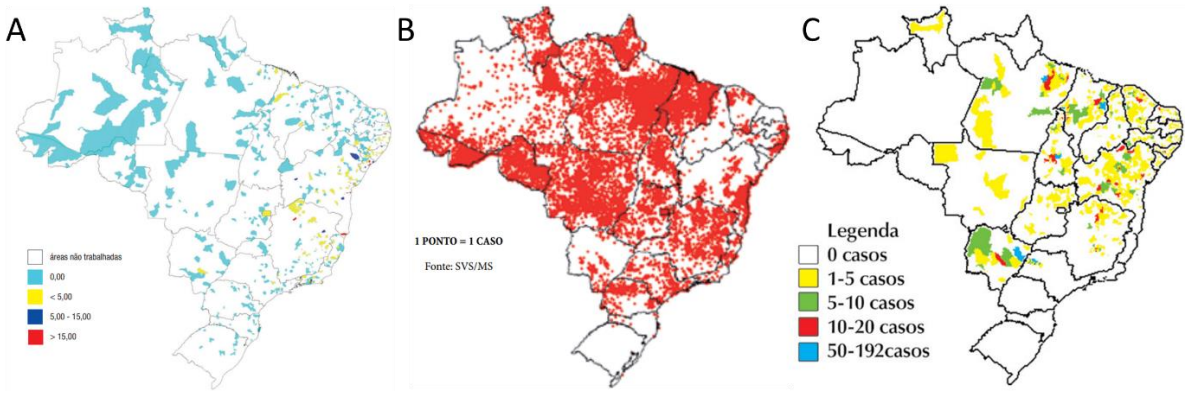


Figura 10. Distribuição geográfica de esquistossomose, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral no Brasil. A: distribuição da esquistossomose segundo o INPEG entre 2010 e 2015. B: casos de leishmaniose tegumentar por município em 2015. C: distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral por município em 2002. Fonte: Brasil 2014, 2017, Katz 2018.

Tais relatos já ocorreram em quatro estados da Federação: Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Em Corte de Pedra, região endêmica na Bahia, 88,3% dos indivíduos com leishmaniose tegumentar americana (LTA) ativa se mostraram coinfectados com helmintos, sendo que 16,7% dessas pessoas estavam infectadas com *S. mansoni* (O'Neal et al.

2007). No estado do Rio de Janeiro, Azeredo-Coutinho e colaboradores (2016) constataram que, de 109 pacientes com leishmaniose tegumentar no estudo, 16 tinham também infecções helmínticas, sendo 3 coinfectados por *S. mansoni*. Já em São Paulo, um único relato de caso foi feito (Gregorio et al. 2019). Por fim, em Januária, região endêmica do norte de Minas Gerais, estudo do nosso grupo evidenciou que 51% dos indivíduos com esquistossomose ativa apresentavam histórico de leishmaniose tegumentar (Miranda et al. 2021). Além disso, também houve, em Minas Gerais, um relato de indivíduo com leishmaniose visceral e esquistossomose concomitantes (Cota et al. 2012).

Contudo, apesar dos casos relatados de coinfecções *Schistosoma-Leishmania* no País, o impacto dessa realidade na ocorrência e prognóstico dessas parasitoses ainda não é conhecido, muito pela falta de atenção a esse problema. Neste sentido, além da carência de conhecimento sobre a epidemiologia dessa coinfecção, existem várias lacunas na literatura sobre a influência que um parasito tem no outro e na evolução das doenças por eles causadas.

2.3.1 Consequências da coinfecção *Schistosoma-Leishmania*

A esquistossomose é uma doença crônica com grande potencial, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, para interferir na evolução de outros processos inflamatórios, como alergias (Resende et al. 2019) e doenças inflamatórias intestinais (Capron et al. 2019), e outras doenças infecciosas (Perera et al. 2024), como hanseníase (Dennison et al. 2021), estrongiloidíase (Yoshida et al. 1999, de Rezende et al. 2015, 2020), malária (Sokhna et al. 2004, Lyke et al. 2005), toxoplasmose (Pêgo et al. 2019) e amebíase (Dolabella et al. 2007). No entanto, ainda existem diversas lacunas na literatura quanto ao real impacto que a infecção por *S. mansoni* pode ter nessas doenças, incluindo as leishmanioses. Um resumo dos achados até agora é apresentado na figura 11.

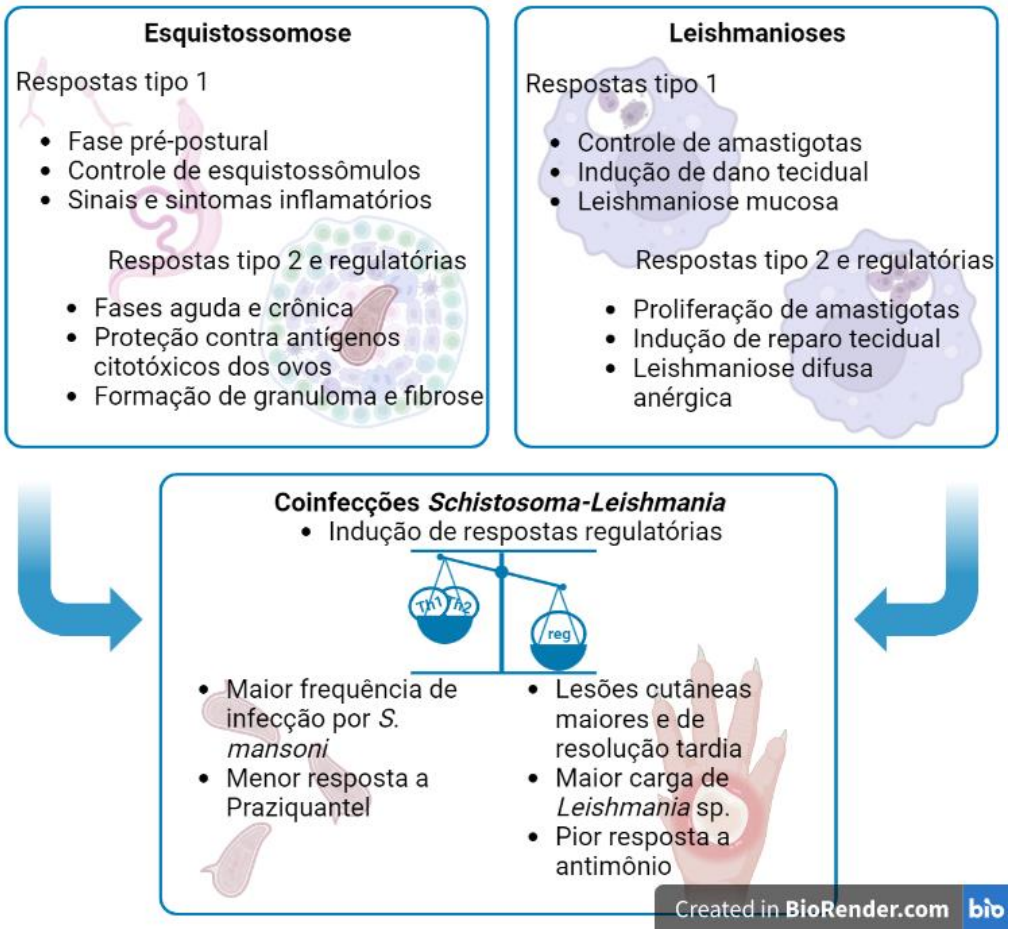


Figura 11. Resumo das consequências da coinfecção *Schistosoma-Leishmania*. Durante coinfecção entre *Schistosoma* sp. e *Leishmania* sp., é possível que a interação entre as respostas elicitadas por ambos os parasitos, leve à predominância de um ambiente regulatório, afetando a evolução de ambas as doenças. Foi mostrado que a influência das leishmanioses na esquistossomose causa aumento da frequência da infecção por *S. mansoni* e menor resposta ao tratamento com Praziquantel em humanos. Quanto aos efeitos nas leishmanioses, há piora das lesões de leishmaniose tegumentar, assim como maior susceptibilidade de células humanas à infecção *in vitro* por *L. braziliensis* e maiores cargas parasitárias de *L. major* e *L. donovani* em modelos experimentais, além de piora de resposta destes ao tratamento com antimoniais. Fonte: elaborado pelo autor.

2.3.1.1 A coinfecção *Schistosoma-Leishmania* em humanos

A esquistossomose aparenta ser deletéria para o tratamento de LTA. Os pacientes coinfectados com helmintos apresentaram resposta insatisfatória ao tratamento com antimoniato de meglumina quando comparados aos que não tinham coinfecções helmínticas, tendo lesões cutâneas por *L. braziliensis* que levaram mais tempo até a cura e menor taxa de remissão com 90 dias após o início do tratamento (O'Neal et al. 2007). Um estudo randomizado, duplo-cego e controlado com placebo, realizado na mesma área, evidenciou que, mesmo realizando o tratamento anti-helmíntico juntamente com o uso de antimoniato de meglumina,

não houve melhora do desempenho do tratamento de LTA (Newlove et al. 2011). Infecções helmínticas também foram positivamente associadas à falha terapêutica em indivíduos com LTA avaliados no estado do Rio de Janeiro (Azeredo-Coutinho et al. 2016).

Em ambas as infecções parasitárias, a evolução do quadro clínico está altamente relacionada com o tipo e a intensidade da resposta imune do hospedeiro ao parasito (Gryseels 2012, Scorza et al. 2017); assim, é de esperar-se que, ao ocorrerem em conjunto, a resposta montada contra um parasito acabe afetando a resposta contra o outro. O primeiro registro de alterações na resposta imune em indivíduos coinfectados foi demonstrado pelo aumento nos níveis séricos de IgE em comparação a pacientes infectados somente com *L. braziliensis* (O'Neal et al. 2007), sugerindo que indivíduos coinfectados apresentam uma resposta do tipo 2 mais intensa, com maiores níveis de IL-4 em relação aos monoinfectados pelo protozoário.

Estudos *in vitro* também têm contribuído para o melhor entendimento das possíveis alterações que ocorrem durante a coinfecção *Schistosoma-Leishmania*. Células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LTA, quando cultivadas simultaneamente na presença de antígenos de *Leishmania* sp. e de antígenos de adultos de *S. mansoni*, produziram maiores concentrações de IL-10 e redução de secreção de IFN-γ (Bafica et al. 2011). Além disso, a estimulação com antígenos de verme adulto diminuiu a expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em monócitos, ao mesmo tempo que aumentaram a expressão de CTLA-4 em linfócitos T $CD4^+$, assim como a frequência de células T $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ (Bafica et al. 2012). De forma semelhante, em cocultura de células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) com linfócitos autólogos de indivíduos com esquistossomose, a infecção *in vitro* com *L. braziliensis* causou diminuição de ativação e maturação de ambas essas células, além de indução de perfis regulatórios, levando, inclusive, a uma maior porcentagem de MoDCs parasitadas por amastigotas quando comparadas a células de indivíduos saudáveis (Lopes et al. 2018).

Apesar do que já se conhece sobre a resposta imune durante a coinfecção *Schistosoma-Leishmania*, pouco se sabe quanto a alterações na leishmaniose tegumentar nesse caso. O número e tamanho de lesões cutâneas típicas de LTA, aparentemente, não é afetado pela presença de coinfecções helmínticas (O'Neal et al. 2007, Unger et al. 2009). Porém, existe um relato de caso em que um indivíduo coinfectado manifestou LTA na forma de placas eritematosas com crostas, assim como foi registrada a presença de ovos de *S. mansoni* em biópsias de pele e resposta relativamente baixa ao tratamento intramuscular com antimoniato de meglumina (Gregorio et al. 2019). Quanto a manifestações mais graves de LTA, coinfecções com *S. mansoni* e parasitos intestinais foram positivamente associadas a aumento da frequência

de LM, sendo mais fortemente relacionadas a helmintos, principalmente nematódeos. (Azeredo-Coutinho et al. 2016). Tendo isso em mente, a investigação da incidência de manifestações atípicas de leishmaniose tegumentar pode gerar resultados promissores. Contudo, além das lacunas existentes no conhecimento sobre as alterações patológicas na coinfecção *Schistosoma-Leishmania*, ainda não existem trabalhos que avaliem possíveis áreas de ocorrência dessa coinfecção, o que torna difícil a determinação de áreas de estudo para investigar esse tema.

Por outro lado, existe menos informação sobre os efeitos que a leishmaniose pode ter sobre a esquistossomose. Um estudo realizado no Norte de Minas Gerais mostrou que a prevalência de esquistossomose foi maior em pacientes com histórico de LTA, sendo essa condição associada positivamente à detecção de níveis séricos de IL-27, e negativamente a IL-17 e CXCL10 (Miranda et al. 2021), sugerindo que modulação imune por *Leishmania* sp. pode aumentar a susceptibilidade à infecção por *S. mansoni*. Além disso, a coestimualação de MoDCs de pacientes com LTA utilizando antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) e Sm29, um antígeno de adultos de *S. mansoni*, aumentou a frequência de marcas de regulação, como produção de IL-10 e expressão IL-10R, enquanto as populações de MoDCs $CD40^+$, $IL\text{-}12^+$ e TNF^+ permaneceram similares (Lopes et al. 2014). Paralelamente, estimulação com Sm29 recombinante, apesar de também induzir perfis regulatórios afins, não foi capaz de aumentar a susceptibilidade de MoDCs de indivíduos com LTA à infecção *in vitro* por *L. braziliensis* (Lopes et al. 2019). Logo, mesmo que haja indícios de que a esquistossomose humana por si só pode aumentar a permissividade do hospedeiro à proliferação de *L. braziliensis* (Lopes et al. 2018), antígenos de isolados de *S. mansoni* possivelmente podem ter potencial biotecnológico para uso no controle de inflamação em lesões de LTA (Lopes et al. 2019).

Em comparação à leishmaniose tegumentar, descrições de como a esquistossomose influencia na leishmaniose visceral são trabalhos muito escassos na literatura, estando geralmente restritos a relatos de caso. Neste contexto, vale ressaltar os dados de Cota et al. (2012), em Minas Gerais, que relatam um caso de leishmaniose visceral enteropática concomitante à infecção por *S. mansoni*, com diarreia persistente, presença de amastigotas no duodeno e recidiva após falha terapêutica, e de Paran (2018), que relata caso de coinfecção entre *S. mansoni* e espécie do complexo *L. donovani* em um refugiado da Eritreia, em Israel, com uma exacerbada doença esplênica. Estes dados podem indicar modificações e agravamento de formas clínicas nos indivíduos coinfectados; entretanto, ainda são poucos os dados, exigindo maiores estudos para elucidar as consequências da interação entre esses parasitos.

Apesar da valiosa contribuição dos estudos em população humana, algumas limitações precisam ser apontadas. Até agora, os estudos sobre coinfecções *Schistosoma-Leishmania* são de caráter transversal ou começaram após o estabelecimento das duas infecções, impossibilitando determinar a sequência de infecção e fase das doenças, além de não excluir a presença de outras infecções. Com isso em mente, essas restrições podem ser contornadas com o uso de modelos experimentais, permitindo um novo entendimento do impacto e dos mecanismos envolvidos nas alterações vistas durante a coinfecção *Schistosoma-Leishmania*.

2.3.1.2 A coinfecção *Schistosoma-Leishmania* em modelos experimentais

De fato, o uso de animais experimentais tem fornecido respostas sobre alguns mecanismos envolvidos na interação entre *S. mansoni* e *Leishmania* spp., tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No entanto, esses estudos ainda são relativamente escassos e limitados a somente algumas espécies de *Leishmania* spp.

Existem evidências experimentais de que a patogênese da leishmaniose tegumentar murina seja alterada pela presença de *S. mansoni*. O primeiro estudo da coinfecção experimental com esses dois parasitos envolveu a infecção de camundongos não-isogênicos com amastigotas de *L. mexicana* 8 semanas após a infecção com *S. mansoni*, o que resultou em aparecimento mais precoce das lesões cutâneas em comparação a animais infectados somente com *L. mexicana* (Coelho et al. 1980). Já a infecção com *L. major* 2 semanas após a infecção por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 gerou lesões maiores, mas de crescimento lento e resolução tardia (la Flamme et al. 2002). De forma similar, a coinfecção concomitante com *L. major* e *S. mansoni* em camundongos BALB/c promoveu lesões cutâneas maiores, mas ocasionou menor mortalidade do que no grupo somente com *S. mansoni* (Yole et al. 2007).

Por outro lado, também há estudos nos quais não se observou mudança no desenvolvimento da leishmaniose tegumentar murina quando em associação com a esquistossomose. A coinfecção simultânea (Khayeka–Wandabwa et al. 2013) ou a infecção com *L. major* após 8 semanas da infecção com *S. mansoni* (Yoshida et al. 1999) não impactou o desenvolvimento de lesões tanto em camundongos BALB/c, com lesões crônicas, quanto tem C57BL/6, com lesões autolimitadas. É possível que os resultados conflitantes sobre a influência na patogênese da leishmaniose tegumentar nos trabalhos aqui citados possam ser atribuídos a

diferenças em cargas parasitárias, tempo em que ocorreu a coinfecção e linhagem de camundongo utilizada, além de espécie e cepa dos parasitos, resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Resumo do delineamento de artigos de coinfecção experimental entre *S. mansoni* e *Leishmania* spp. causadoras de leishmaniose tegumentar.

Trabalho	Linhagem de camundongo	Cepa de *S. mansoni*	Carga de *S. mansoni*	*Leishmania* sp. e cepa	Carga de *Leishmania* sp.	Período da coinfecção	Alterações em lesões de leishmaniose tegumentar
Coelho et al. 1980	Não isogênicos	Cepa LE	70 cercárias	*L. mexicana* (L v 22)	$1x10^8$ amastigotas	8 semanas após *S. mansoni*	Menor período de incubação
Yoshida et al. 1999	BALB/c & C57BL/6	Cepa de Porto Rico	20 cercárias	*L. major* (5ASKH)	$4x10^7$ promastigotas	8 semanas após *S. mansoni*	Sem alterações
la Flamme et al. 2002	C57BL/6	Cepa de Porto Rico	70 cercárias	*L. major* (FN)	$5x10^6$ promastigotas	2 semanas após *S. mansoni*	Lesões maiores e maior tempo para resolução
Yole et al. 2007	C57BL/6	Isolado do Quênia	150 cercárias	*L. major* (NLB-144)	$3x10^6$ promastigotas	Concomitante	Lesões maiores
Khayeka-Wandabwa et al. 2013	BALB/c	Cepa KEN-lab	70 cercárias	*L. major* (NLB-144)	$1x10^6$ promastigotas	Concomitante	Sem alterações

Fonte: elaborado pelo autor.

Todavia, mesmo os trabalhos que não mostraram mudança na patogênese evidenciaram alterações em outros aspectos, principalmente resposta imune e tratamento. A expressão de mRNA de IL-4 em cultura de linfonodo poplíteo, presente em camundongos BALB/c monoinfectados com *L. major*, é diminuída na coinfecção, ao mesmo passo que há o aumento de mRNA de IL-10 (Yoshida et al. 1999). Em camundongos C57BL/6 e BALB/c coinfectados, também houve aumento *in vivo* da carga parasitária de *L. major* (la Flamme et al. 2002, Khayeka–Wandabwa et al. 2013). Além disso, também foi observado que macrófagos peritoneais recuperados de camundongos na fase aguda da esquistossomose apresentaram menor capacidade de responder à estimulação com IFN-γ, levando à baixa produção de óxido nítrico e inaptidão em matar amastigotas de *L. major in vitro* (la Flamme et al. 2002). Além de alterações na resposta imune, também foi evidenciada, em camundongos BALB/c coinfectados com *L. major* e *S. mansoni*, uma piora na resposta ao tratamento monoterápico com estibogluconato de sódio ou com Praziquantel (Khayeka–Wandabwa et al. 2013).

De forma similar do que em humanos, os efeitos da leishmaniose tegumentar na esquistossomose experimental também são menos conhecidos. Parece não haver alteração na carga parasitária de *S. mansoni*, tanto na recuperação de vermes adultos quanto de ovos retidos no fígado durante coinfecção com *L. major* (la Flamme et al. 2002, Khayeka–Wandabwa et al. 2013). Contudo, a lesão hepática parece ser menos exacerbada em camundongos coinfectados, assim como não há tanto aumento dos linfonodos mesentéricos, resultando numa menor mortalidade de animais coinfectados em comparação aos monoinfectados por *S. mansoni* (Yole et al. 2007).

Em relação à associação de esquistossomose e leishmaniose visceral, a literatura ainda é mais escassa. Em camundongos C57BL/6 infectados simultaneamente, os granulomas periovulares provocados por *S. mansoni* fornecem um ambiente favorável à proliferação de amastigotas de *L. donovani*, resultando em um aumento de carga parasitária (Hassan et al. 2006). Entretanto, o aspecto dos granulomas hepáticos permaneceu inalterado na coinfecção, assim como a carga parasitária de *S. mansoni* (Hassan et al. 2006). Trabalhos com o uso de hamster sírio mostraram que a coinfecção entre *S. mansoni* e *L. infantum* levou a aumento de IgE sérico e mudança na morfologia de granulomas (Mangoud et al. 1997, 1998).

Com isso, fica claro que existem lacunas significativas no conhecimento sobre as coinfecções *Schistosoma-Leishmania*. Estudos mais detalhados precisam ser realizados para entender melhor as consequências e possíveis mecanismos envolvidos, inclusive com espécies de *Leishmania* spp. ainda não utilizadas nessa coinfecção. Entre elas, está *L. amazonensis*, o

principal agente etiológico de leishmaniose difusa no Brasil (Barrientos 1948, Barral et al. 1991).

Estudos anteriores do nosso grupo (Camelo-Júnior 2019) mostraram que macrófagos derivados de medula óssea recuperados de camundongos na fase aguda postural da esquistossomose foram os mais permissivos à proliferação de *L. amazonensis* quando comparados a macrófagos de animais não infectados ou em outras fases da infecção por *S. mansoni*. Além disso, Thorstenberg et al. (2024) mostraram que mudanças na sinalização de receptores purínicos causadas em macrófagos durante a infecção aguda de *S. mansoni* diminuem a capacidade de resposta a *L. amazonensis*. Portanto, essa fase da infecção foi escolhida para dar seguimento nos experimentos aqui descritos a fim de explorar mais a fundo o parasitismo e imunopatogênese da leishmaniose tegumentar durante a coinfecção *S. mansoni*-*L. amazonensis*.

3 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose e as leishmanioses são doenças crônicas e debilitantes que, individualmente, tem grande impacto negativo para saúde pública, principalmente em populações que vivem em áreas subdesenvolvidas de regiões tropicais e subtropicais do mundo. A sobreposição das áreas de transmissão de esquistossomose e de leishmanioses expõe quem vive ou visita essas regiões ao risco da coinfecção. O fato de existirem relatos de coinfecção *Schistosoma-Leishmania* não só no Brasil alicerça ainda mais isso como realidade.

Contudo, não temos estudos que revelem as áreas de maior risco de coinfecção na população humana ou mesmo que avaliem a prevalência de casos em que esses parasitos estão presentes concomitantemente na população. Em algumas áreas, como em comunidades rurais do município de Januária, estudos revelam que 51% de pacientes com esquistossomose apresentavam histórico de LTA (Miranda et al., 2021), o que ilustra a gravidade da situação para algumas regiões. É necessário considerar também, que ambas as infecções têm caráter crônico e são transmitidas em vastas áreas no Brasil, além de que alterações na resposta imune por elas causadas podem perdurar mesmo depois da cura (Roberts et al. 1993, Newlove et al. 2011, Miranda et al. 2021).

Além da situação epidemiológica, ainda há diversas lacunas na literatura quanto às consequências da coinfecção *Schistosoma-Leishmania*. Existem evidências de que a esquistossomose afeta negativamente o tratamento, sintomas, desfecho clínico e resposta imune da leishmaniose tegumentar e visceral em humanos, assim como é mais frequente a infecção por *S. mansoni* em quem já teve LTA (O'Neal et al. 2007, Unger et al. 2009, Bafica et al. 2011, 2012, Newlove et al. 2011, Cota et al. 2012, Lopes et al. 2014, 2018, 2019, Azeredo-Coutinho et al. 2016, Paran 2018, Gregorio et al. 2019, Miranda et al. 2021). Em modelos experimentais, apesar de alguns resultados conflitantes, há indicação de que ocorra maior susceptibilidade à infecção por *L. major*, *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum*, assim como piora clínica dos animais quando existe coinfecção (Coelho et al. 1980, Mangoud et al. 1997, 1998, la Flamme et al. 2002, Hassan et al. 2006, Yole et al. 2007, Thorstenberg et al. 2024).

Adicionalmente à problemática exposta, muito pouco foi abordado sobre o impacto da infecção por *S. mansoni* sobre *L. amazonensis*, o principal agente etiológico de leishmaniose difusa no Brasil (Barrientos 1948, Barral et al. 1991). Logo, é de extrema importância que comece a ser esclarecido o perfil epidemiológico das coinfecções *Schistosoma-Leishmania*,

assim como os impactos da esquistossomose na LTA causada por *L. amazonensis*, assim como os efeitos da leishmaniose tegumentar experimental na esquistossomose.

Assim, o presente estudo, primeiramente, utilizou de ferramentas de análise espacial para determinar regiões coendêmicas para esquistossomose e leishmaniose tegumentar. Apesar do perfil focal dessas doenças (Chadeka et al. 2017, Gomes et al. 2018, Zeb et al. 2021, Coelho et al. 2021), é provável que existam áreas em países endêmicos onde há transmissão concomitante dos dois parasitos. Em um segundo momento, foi avaliado como a coinfecção experimental por *S. mansoni* e *L. amazonensis* afeta ambas as doenças. Levando em consideração a literatura aqui discutida, é possível que, por alteração do ambiente imune provocada pela infecção por *S. mansoni*, os mecanismos envolvidos na patogênese por *L. amazonensis* sejam modulados, levando a alterações nas lesões cutâneas e na carga parasitária.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar a ocorrência e distribuição de áreas potencialmente coendêmicas para esquistossomose e leishmaniose tegumentar e o impacto da coinfecção por *S. mansoni* na patologia, parasitismo e imunologia da infecção experimental por *L. amazonensis*.

4.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta tese foram divididos em duas seções para melhor exploração de cada tema individualmente.

4.2.1 Objetivos específicos – capítulo 1

- Determinar quais países podem ser classificados como coendêmicos para leishmaniose tegumentar e esquistossomose;
- Verificar a dependência espacial entre casos de leishmaniose tegumentar e esquistossomose em Minas Gerais;
- Identificar áreas onde pode ser mais provável que haja transmissão concomitante de leishmaniose tegumentar e esquistossomose em Minas Gerais.

4.2.2 Objetivos específicos – capítulo 2

- Identificar alterações nas manifestações clínico-patológicas da leishmaniose tegumentar e da esquistossomose em camundongos BALB/c previamente infectados por *S. mansoni* e coinfectados por *L. amazonensis*;

- Evidenciar possíveis alterações na carga parasitária de *L. amazonensis* e *S. mansoni* em camundongos BALB/c previamente infectados por *S. mansoni* e coinfectados por *L. amazonensis*;
- Avaliar comparativamente alterações da resposta imune nos sítios de infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c previamente infectados por *S. mansoni* em relação aos animais monoinfectados por *L. amazonensis*;
- Explorar a participação *in vivo* de macrófagos de camundongos na fase aguda da esquistossomose à infecção por *L. amazonensis*.

5 CAPÍTULO 1

Análise espacial da distribuição de áreas com potencial coendêmico para esquistossomose e leishmaniose tegumentar

RESUMO

A esquistossomose e a leishmaniose tegumentar, apesar de causadas por agentes etiológicos muito distintos, são ambas transmitidas em regiões tropicais e subtropicais e podem, simultaneamente, impactar as mesmas áreas. Indivíduos coinfectados mostram resposta ao tratamento insatisfatória, além de aumento em respostas regulatórias e susceptibilidade à infecção. Contudo, nenhum estudo determinou onde coinfecções *Schistosoma-Leishmania* provavelmente acontecem. Para isso, dados do *The Global Health Observatory* foram coletados para determinar a endemicidade de esquistossomose, leishmaniose tegumentar ou ambas mundialmente. Quarenta países são coendêmicos para esquistossomose e leishmaniose tegumentar, com 23 deles apresentando transmissão ativa de ambas, sendo estes localizados na África, América do Sul e Sudoeste Asiático. Para determinar áreas coendêmicas em uma região conhecidamente endêmica para leishmaniose tegumentar americana (LTA) e esquistossomose, o estado de Minas Gerais, Brasil, foi selecionado como modelo. Um estudo ecológico foi conduzido utilizando casos confirmados de LTA e esquistossomose informados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e no Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose (SISPCE) entre 2013 e 2017, utilizando análises globais e locais de indicadores de associação espacial (LISA). No período analisado, uma média de 1.248,2 casos de LTA e 11.692,2 casos de esquistossomose foram relatados anualmente em Minas Gerais. Foram identificados 61 municípios como núcleos de agrupamentos de alta incidência tanto para esquistossomose quanto para LTA simultaneamente, principalmente na microrregião de Caratinga. Sobrepondo ambas as análises de LISA bivariadas, sete *hotspots* coendêmicos foram identificados em Minas Gerais, distribuídos nas mesorregiões do Norte de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Zona da Mata e Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte. Logo, coinfecções entre *Schistosoma* spp. e *Leishmania* spp. devem ser um tópico de interesse para elaboração de estratégias de tratamento e controle de ambos os parasitos em uma parte significativa das áreas endêmica. Análise de LISA bivariada se apresenta como uma ferramenta útil para indicar onde casos de esquistossomose-LTA podem ocorrer mais frequentemente. Análises similares podem ser úteis para elaboração de políticas públicas e melhor atendimento de pacientes com LTA ou esquistossomose, assim como indicar áreas onde grupos de estudos podem atuar para investigar os impactos dessa coinfecção.

Palavras-chave: *Schistosoma*; *Leishmania*; doenças tropicais negligenciadas; coinfecção; coendemicidade.

5.1 Material e métodos – capítulo 1

5.1.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado a partir de dados secundários presentes em bancos de dados de domínio público. As variáveis utilizadas não permitem a identificação ou localização dos indivíduos cujos casos foram aqui contabilizados. Sendo assim, não houve necessidade de submissão deste trabalho ao Comitê de Ética em Pesquisa conforme a resolução nº 510 de 07 de abril de 2016 do Conselho Nacional de Saúde.

5.1.2 Avaliação de países coendêmicos

Dados da endemicidade de esquistossomose e leishmaniose tegumentar por país no ano de 2022 foram coletados no *The Global Health Observatory* da OMS. Para a esquistossomose, foram considerados como tendo transmissão ativa os países que apresentaram a classificação de "requer quimioterapia preventiva", enquanto os classificados como "não requer quimioterapia preventiva", "estado da transmissão a ser determinado" ou "interrupção da transmissão a ser confirmada" foram considerados endêmicos, mas sem definição de transmissão ativa. Para a leishmaniose tegumentar, foram considerados com transmissão ativa os países que apresentaram a classificação de "endêmico". Para ser considerado coendêmico, um território deveria estar listado como endêmico tanto para esquistossomose quanto para leishmaniose tegumentar no ano de 2022 segundo o *The Global Health Observatory*. Um mapa caracterizando a endemicidade para cada país foi criado utilizando o programa QGIS versão 3.22.3.

5.1.3 Determinação de áreas coendêmicas em Minas Gerais

5.1.3.1 Área de estudo

Brasil é o 5º maior país em área, ocupando a maior parte da América do Sul, entre as latitudes 05º16'19" N e 33º45'07" S, e longitudes 34º47'34" e 73º59'26" W. Em 2020, a população estimada do País foi 211.755.692 habitantes. O País é dividido em 26 estados e o Distrito Federal. O Estado de Minas Gerais é localizado na Região Sudeste, entre as latitudes 14°13′58" e 22°54’00" S, e as longitudes 39°51′32"e 51°02′35" W. O estado possui 853 municípios (unidade analítica deste estudo), divididos em 12 mesorregiões e 66 microrregiões (figura 12).

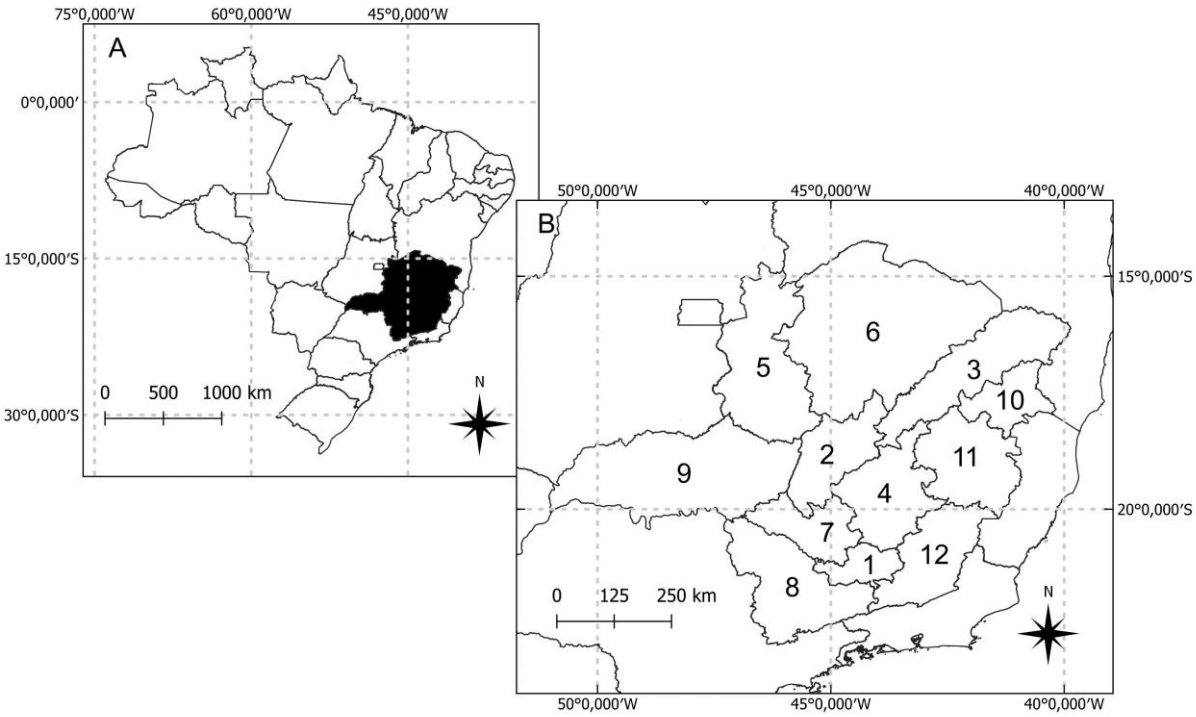


Figura 12. O Estado de Minas Gerais, Brasil. (A) Mapa do Brasil e suas unidades da federação, com o Estado de Minas Gerais salientado em preto. (B) Mapa de Minas Gerais e suas mesorregiões. 1: Campos das Vertentes. 2: Central Mineira. 3: Jequitinhonha. 4: Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte. 5: Noroeste de Minas. 6: Norte de Minas. 7: Oeste de Minas. 8: Sul de Minas. 9: Triângulo Mineiro. 10: Vale do Mucuri. 11: Vale do Rio Doce. 12: Zona da Mata. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.3.2 Delineamento epidemiológico e bases de dados

Um estudo ecológico foi conduzido considerando todos os casos confirmados de LTA e esquistossomose entre os anos de 2013 e 2017. Casos autóctones confirmados de LTA foram recuperados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), enquanto os casos de esquistossomose foram recuperados tanto do SINAN, no qual são informados casos graves e casos de áreas não endêmicas, e do Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (SISPCE), no qual são reportados casos não graves de áreas endêmicas (Brasil 2023), conforme ilustra a figura 13. Como unidade analítica, foram definidos os municípios de Minas Gerais. Casos importados de outros países ou unidades da federação ou sem registro de município de residência não foram considerados para o presente estudo. Os polígonos dos mapas utilizados foram obtidos de base pública do Portal de Mapas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Dados populacionais para cada município foram obtidos segundo o Censo 2010, disponível no Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA).

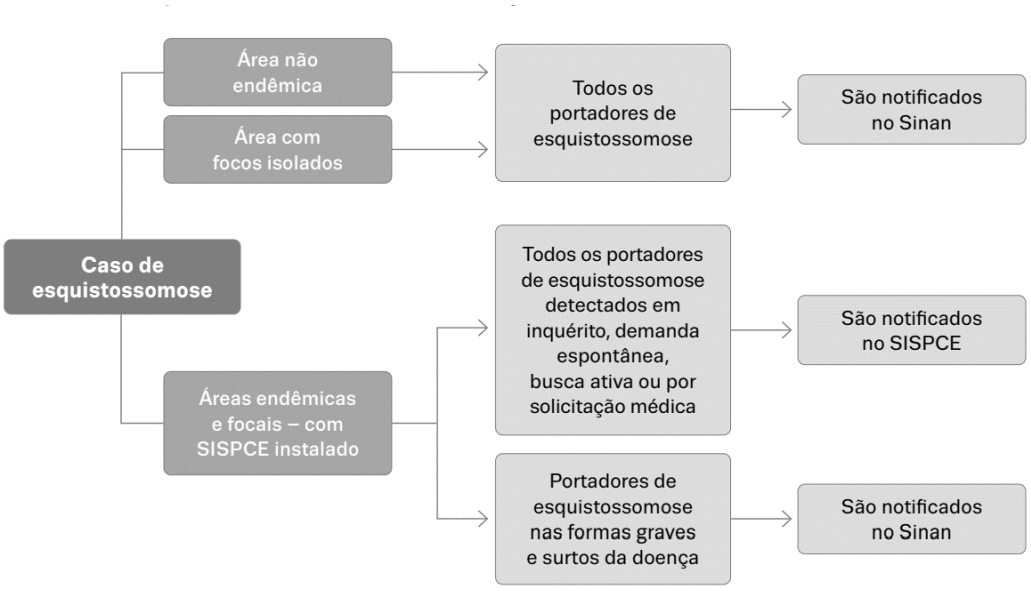


Figura 13. Fluxograma para a notificação de caso confirmado de esquistossomose. Sinan: Sistema de Informação de Agravos de Notificação. SISPCE: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. Fonte: Brasil, 2023.

5.1.3.3 Análise espacial

A incidência (LTA) e prevalência (esquistossomose) médias por 100 mil habitantes, de acordo com o Censo 2010, foram calculadas para cada município e reestimada utilizando suavização Bayesiana empírica espacial. A partir de uma matriz de contiguidade do tipo rainha, a vizinhança de cada município foi determinada, utilizando critério de vizinhança de primeira ordem (Oyana & Margai 2016). As análises foram feitas no programa GeoDa versão 1.20 (ASU, GeoDa Center for Geospatial Analysis and Computation, Arizona, EUA).

Para verificar a distribuição e agrupamento de casos de LTA e esquistossomose, os Índices Globais de Moran univariados foram calculados (Moran 1948), indicando se a distribuição de casos na área de estudo é dispersa, agrupada ou aleatória. Para examinar a dependência espacial entre LTA e esquistossomose, os Índices Globais de Moran bivariados foram calculados. Posteriormente, análise de Indicadores Locais de Associação Espacial (LISA) univariada (Anselin 1995) foi realizada para determinar a localização de aglomerados de esquistossomose e LTA separadamente, método que possibilita a associação entre o valor de uma variável em uma unidade analítica (prevalência/incidência média suavizada de esquistossomose ou LTA) e a sua defasagem espacial (média da variável na vizinhança). Áreas coendêmicas para esquistossomose e LTA foram identificadas por LISA bivariada, que permite a identificação de unidades analíticas nas quais o valor de uma variável é positiva ou negativamente associado à defasagem espacial de outra variável (Anselin 1995), indicando aglomerados de alta taxa de incidência/prevalência (*high-high cluster*), baixa incidência/prevalência (*low-low cluster*) e *outliers* espaciais (*high-low* e *low-high*), ou seja, aglomerados onde a unidade analítica possui alto valor, enquanto a vizinhança possui baixos valores e vice-versa. Como os ciclos de transmissão de esquistossomose e LTA são relativamente independentes, as análises bivariadas foram executadas duas vezes, associando a taxa de incidência de LTA em relação à taxa de prevalência da esquistossomose na vizinhança e vice-versa. Aglomerados significativos foram estabelecidos dado o valor de $p \leq 0,05$. Os mapas foram criados utilizando o programa QGIS versão 3.22.3.

5.2 Resultados – Capítulo 1

5.2.1 Identificação de países endêmicos para esquistossomose e para leishmanioses no mundo

Com base nos dados obtidos no *The Global Health Observatory*, um total de 40 países puderam ser classificados como coendêmicos para esquistossomose e leishmaniose tegumentar. Como se pode observar na figura 14, os países com relatos de transmissão de esquistossomose e de LTA foram amplamente distribuídos no mundo, mas com predomínio nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente considerando os países coendêmicos que requerem quimioterapia preventiva para esquistossomose.

Contudo, muitos dos países considerados coendêmicos nesta avaliação, incluindo gigantes populacionais, como Índia e China, não apresentam transmissão de esquistossomose em níveis que justifiquem o uso de tratamento em massa (WHO 2020, 2022) e, consequentemente, o risco de coinfecção nesses países pode ser relativamente mais baixo. Entretanto, o ilustrado na figura 14 também revela que 23 países que apresentavam transmissão ativa de leishmaniose tegumentar também requereram quimioterapia preventiva para esquistossomose em 2022. Esses países coendêmicos foram situados na América do Sul, África e Sudoeste Asiático, sendo regiões que, potencialmente, possuem maior chance de apresentar casos de coinfecção *Schistosoma-Leishmania*.

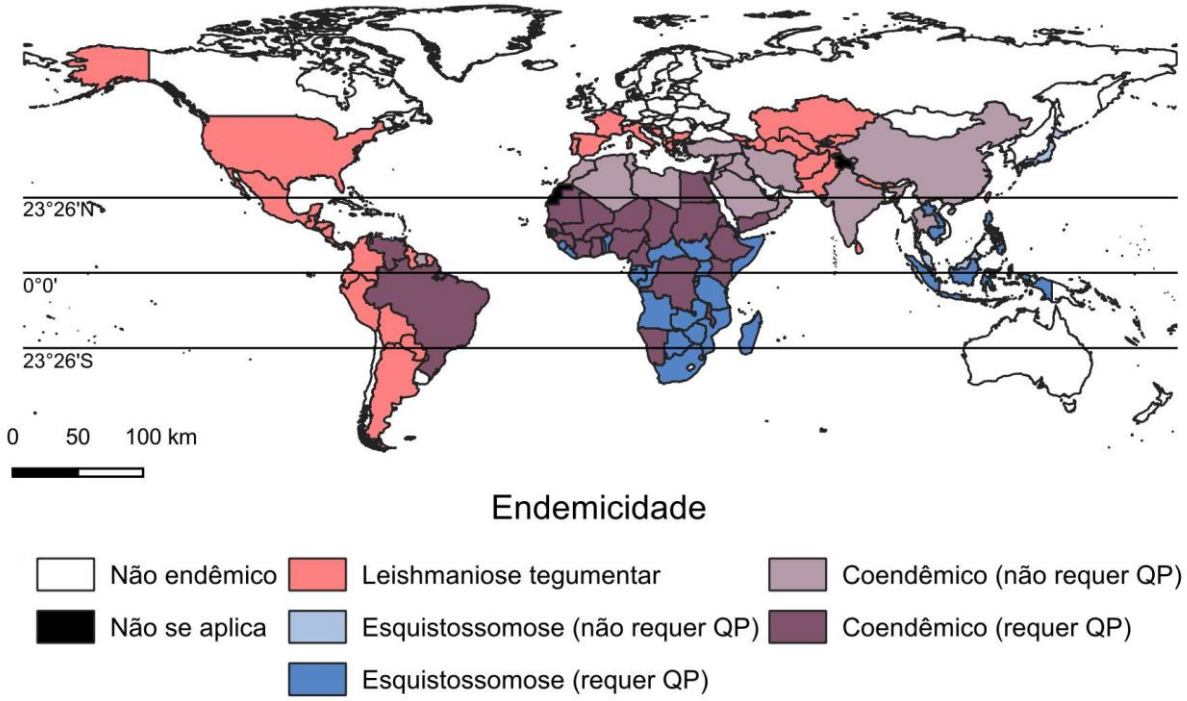


Figura 14. Países coendêmicos para esquistossomose e leishmaniose tegumentar de acordo com dados do ano de 2022. QP: quimioterapia preventiva. Mapa criado por meio de sobreposição de países endêmicos para esquistossomose e leishmaniose tegumentar a partir de dados disponíveis no *The Global Health Observatory*. Fonte: elaborado pelo autor.

Na figura 14, pode-se verificar que a África foi o continente onde houve o maior número de países com transmissão ativa das duas parasitoses. No Norte da África, os países coendêmicos para esquistossomose e leishmaniose tegumentar foram Egito e Sudão, assim como Côte d'Ivoire, Níger e Senegal, na África Ocidental, Camarões, Chade e República Democrática do Congo, na África Central, Eritreia, Etiópia e Quênia, na África Oriental. Burquina Fasso, Gana, Guiné, Guiné-Bissau, Mali e Nigéria, na África Ocidental, e Namíbia, no Sul da África também apareceram como áreas de coendemicidade para essas parasitoses. Além da África, Iêmen, no Sudoeste Asiático, e Brasil e Venezuela, na América do Sul, apresentaram transmissão das duas parasitoses simultaneamente. É necessário, contudo, considerar que a transmissão de caráter focal desses parasitos pode dificultar a ocorrência de coinfecções dentro das regiões endêmicas. Dessa forma, foram detalhados, a nível municipal, os dados de transmissão de esquistossomose e de leishmaniose tegumentar no estado de Minas

Gerais, Brasil, para poder melhor investigar localidades com maior probabilidade de ocorrência casos de coinfecção entre *S. mansoni* e espécies dermotrópicas de *Leishmania* spp.

5.2.2 Determinação de áreas coendêmicas para esquistossomose e LTA no estado de Minas Gerais

Entre 2013 e 2017, Minas Gerais apresentou 6.241 casos de LTA e 54.496 casos de esquistossomose (tabela 2), sendo 71,1% destes reportados no SISPCE, indicando que a maioria dos casos de esquistossomose no período consistiu em manifestações são severas provenientes de áreas endêmicas.

Tabela 2. Casos de LTA e esquistossomose no estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017.

	LTA	Esquistossomose			
Base de dados	SINAN	SINAN	SISPCE		Total*
Tipo de busca			Busca ativa	Busca passiva	
Número de casos	6.241	15.771	20.606	18.119	54.496

*Total de casos de esquistossomose determinados pela soma de casos notificados pelo SINAN e pelo SISPCE no período analisado. LTA: leishmaniose tegumentar americana. SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação. SISPCE: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. Fonte: elaborado pelo autor.

A distribuição espacial das taxas de incidência e prevalência suavizadas é apresentada na figura 15. Os municípios com as maiores taxas de incidências médias suavizadas de LTA (figura 15A) foram identificados nas mesorregiões do Norte de Minas (São João das Missões e São João do Pacuí), Zona da Mata (Simonésia) e Vale do Rio Doce (Ubaporanga e Piedade de Caratinga), enquanto os com maiores taxas para esquistossomose (figura 15B) se encontram nas mesorregiões do Vale do Rio Doce (Carmésia, Taparuba e Ipanema), Vale do Mucuri (Franciscópolis) e Zona da Mata (Porto Firme).

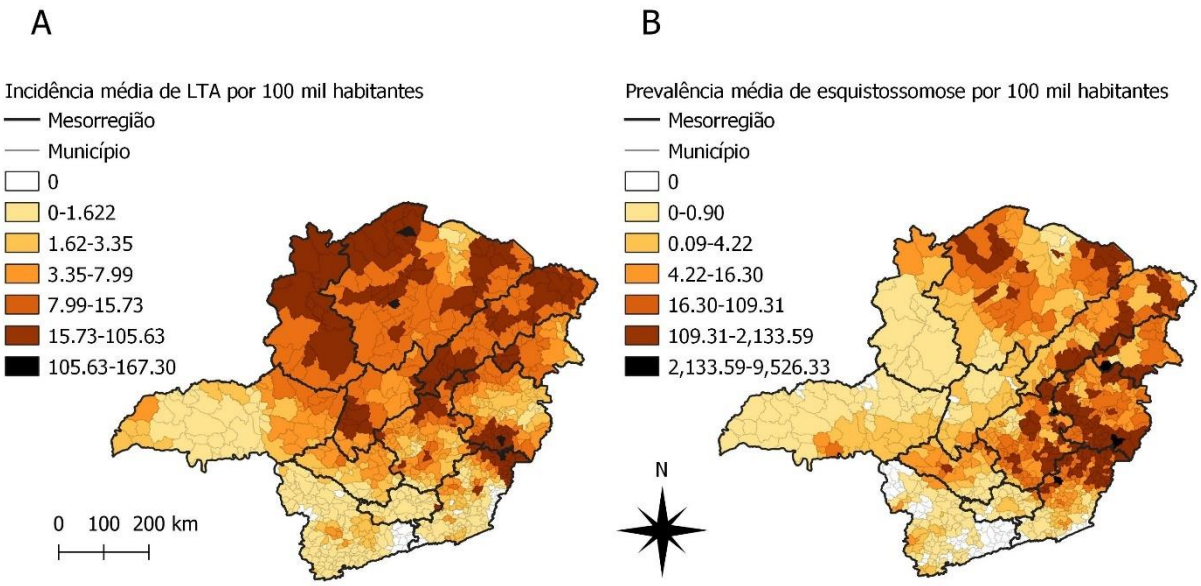


Figura 15. Taxa de incidência média de leishmaniose tegumentar e prevalência média esquistossomose por 100 mil habitantes em Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017. (A) Leishmaniose tegumentar americana. (B) Esquistossomose. LTA: leishmaniose tegumentar americana. Elaborado com dados reportados nas bases do SINAN e SISPCE Fonte: elaborado pelo autor.

Enquanto algumas áreas apresentaram altas incidências apenas para LTA, como Noroeste de Minas e Central Mineira, outras regiões mostraram um perfil similar de baixas ou altas incidências e prevalências de ambas as doenças. As mesorregiões do Triângulo Mineiro, Sul de Minas, Oeste de Minas e Campos das Vertentes foram majoritariamente compostas de municípios com baixa incidência de LTA e baixa prevalência de esquistossomose. Por outro lado, Norte de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte, Vale do Rio Doce e Zona da Mata foram as mesorregiões onde a maior parte dos municípios com altas incidências e prevalências das duas doenças foram localizados.

Para verificar dependência espacial, foram feitas análises dos Índices Globais de Moran (*I*) univariados, cujos resultados são mostrados na tabela 3. A distribuição de casos de LTA apresentou uma autocorrelação relativamente forte (I = 0,567) em Minas Gerais, enquanto a autocorrelação de casos de esquistossomose foi mais fraca (I = 0,132). Já os Índices Globais de Moran bivariados, relacionando casos de LTA com casos de esquistossomose e vice-versa, apesar de fracos (I = 0,127 e 0,124, respectivamente), sugerem que a ocorrência das duas doenças apresenta certa codependência espacial em Minas Gerais.

Tabela 3. Estatísticas de Índices Globais de Moran para LTA e esquistossomose no estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017.

Análise/doença	*I*	Valor de p*	Valor de Z
Análise univariada			
LTA	0,567	0,001	27,103
Esquistossomose	0,132	0,001	7,235
Análise bivariada			
LTA/Esquistossomose	0,127	0,001	8,479
Esquistossomose/LTA	0,124	0,001	8,301

*Pseudo-valor de p obtido de 999 permutações. *I*: Índice Global de Moran. LTA: leishmaniose tegumentar americana. Fonte: elaborado pelo autor.

Para avaliar a ocorrência de agrupamentos localizados apresentando correlação espacial entre a incidência de LTA e a prevalência de esquistossomose separadamente, análise de LISA univariada foi realizada, e os mapas são mostrados na figura 16. A figura 16A ilustra agrupamentos de incidência de LTA, indicando as mesorregiões do Triângulo Mineiro, Sul de Minas, Campos das Vertentes e Zona da Mata como predominantemente compostas por agrupamentos *low-low*, ou seja, áreas de baixa incidência de LTA. Nessa análise, 66 municípios foram classificados como núcleos de agrupamentos *high-high*, de alta incidência, para LTA, distribuídos ao longo do Noroeste de Minas, Norte de Minas, Jequitinhonha, Central Mineira, Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte, Vale do Rio Doce e Zona da Mata. Na figura 16B, que apresenta os aglomerados de incidência de esquistossomose, os municípios das mesorregiões do Triângulo Mineiro, Campos das Vertentes e Sul de Minas também foram, em boa parte, agrupamentos de baixa prevalência; além disso, as mesorregiões do Noroeste de Minas e Central Mineira também são principalmente compostas por agrupamentos *low-low*. Análise de LISA evidenciou a existência de 41 agrupamentos de alta prevalência de esquistossomose, cujos municípios centrais estão localizados nas mesorregiões do Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte e Zona da Mata. Ademais, 13 agrupamentos *high-high*, localizados no Vale do Rio Doce e na Zona da Mata, foram comuns a ambas as análises, listados na tabela 4.

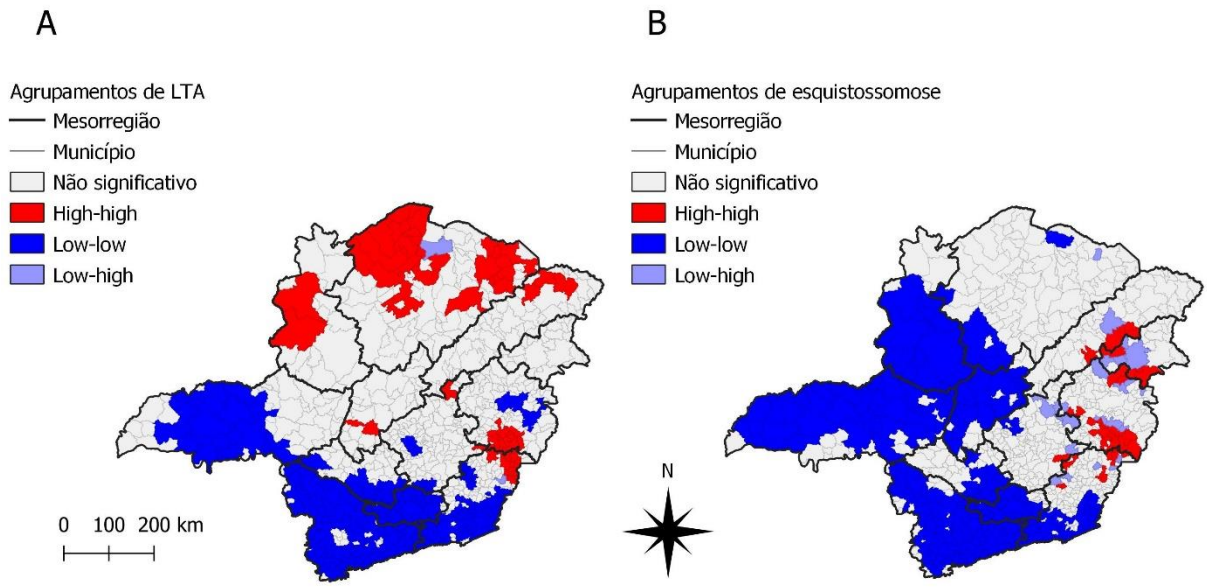


Figura 16. Mapas de agrupamentos de LISA univariados de leishmaniose tegumentar e esquistossomose em Minas Gerais, Brasil, de 2013 a 2017. (A) Agrupamentos de taxa de incidência suavizada de LTA. (B) Agrupamentos de taxa de prevalência suavizada de esquistossomose. Em vermelho e azul, estão representados núcleos de agrupamentos de alta incidência/prevalência (*high-high*) e baixa incidência/prevalência (*low-low*) respectivamente, enquanto em azul claro estão *outliers* espaciais, de baixa incidência/prevalência com vizinhança de alta incidência/prevalência (*low-high*). LTA: leishmaniose tegumentar americana. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4. Agrupamentos de alta incidência de LTA e prevalência de esquistossomose no estado de Minas Gerais, 2013-2017, obtidos na análise univariada de autocorrelação espacial.

Mesorregião	Microrregião	Município	Valor de p*
Vale do Rio Doce	Caratinga	Caratinga	0,001
		Dom Cavati	0,045
		Iapu	0,048
		Imbé de Minas	0,017
		Inhapim	0,020
		São Domingo das Dores	0,016
		São Sebastião do Anta	0,021
		Ubaporanga	0,019
	Aimorés	Ipanema	0,011
Zona da Mata	Manhuaçu	Reduto	0,047
		Santa Bárbara do Leste	0,036
		Santana do Manhuaçu	0,014
		Simonésia	0,011

*Pseudo-valor de p obtido de 999 permutações, sendo apresentado o valor mais alto entre as duas análises univariadas. LTA: leishmaniose tegumentar americana. Fonte: elaborado pelo autor.

Além dos agrupamentos *high-high* em comum, a proximidade de alguns dos agrupamentos entre as diferentes análises univariadas, especialmente nas mesorregiões do Vale do Rio Doce e Zona da Mata, sugerem a ocorrência de agrupamentos de altas incidências e prevalências de LTA e esquistossomose concomitantemente. Para checar a veracidade disso, foi realizada análise de LISA bivariada. Em Minas Gerais, apesar dos baixos Índices Globais de Moran Bivariados (tabela 3), existem agrupamentos (figura 17) de municípios com altas taxas de incidência de LTA cercados de vizinhos com altas taxas de prevalência de esquistossomose (figura 17A), assim como municípios de alta prevalência de esquistossomose com vizinhos de alta incidência de LTA (figura 17B). A maior parte dos municípios do Triângulo Mineiro, Sul de Minas e Campos das Vertentes, contudo, permaneceram como agrupamentos *low-low* devido à baixa incidência das duas doenças.

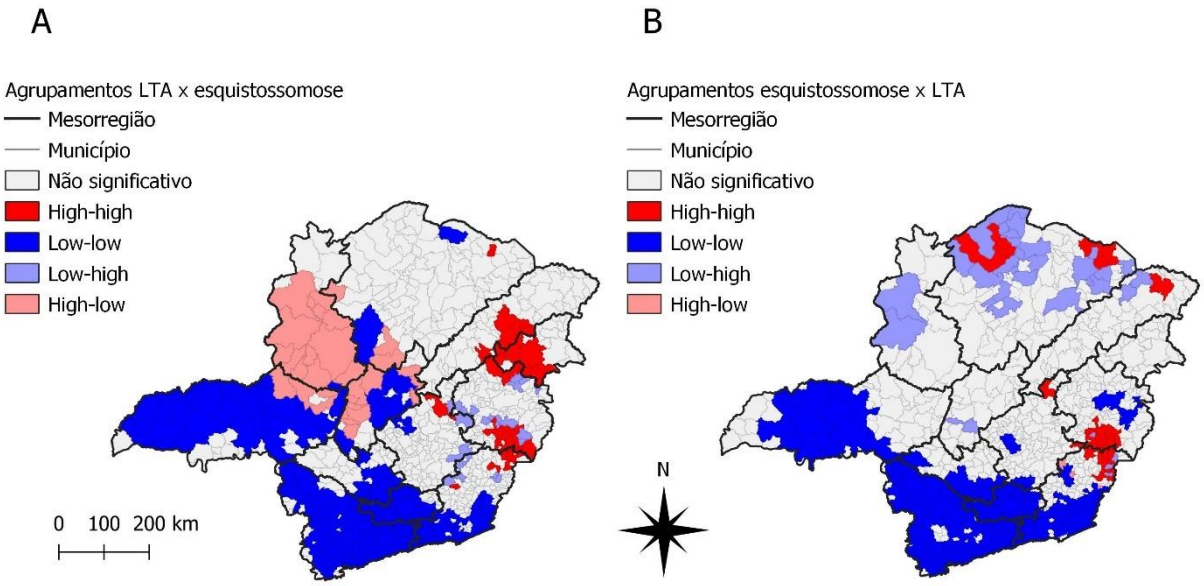


Figura 17. Mapas de aglomerados de LISA bivariados entre leishmaniose tegumentar e esquistossomose em Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017. (A) Taxa de incidência de LTA suavizada de um município em relação às taxas de prevalência de esquistossomose suavizadas da sua vizinhança. (B) Taxa de prevalência de esquistossomose suavizada de um município em relação às taxas de incidência de LTA suavizadas de sua vizinhança. Vermelho e azul representam núcleos de agrupamentos *high-high* e *low-low*, respectivamente, enquanto rosa e azul claro representam *outliers* espaciais *high-low* e *low-high*. Fonte: elaborado pelo autor.

Entre as duas análises, um número considerável de agrupamentos *low-high* pode ser observado nas mesorregiões do Noroeste de Minas, Norte de Minas, Central Mineira, Jequitinhonha, Vale do Rio Doce, Zona da Mata e Mesorregião Metropolitana de Belo

Horizonte, indicando que mesmo municípios com baixas incidências de LTA ou de baixas prevalências de esquistossomose são cercados de vizinhos com alta incidência ou prevalência da outra doença. O evidente conjunto de agrupamentos *high-low* no Noroeste de Minas na análise de LTA por esquistossomose são consistentes com o fato dessa área ser composta por um número grande municípios com alta incidência de LTA (figura 15A) e de agrupamentos *high-high* de LTA (figura 16A), mas de prevalência relativamente baixa de esquistossomose (figuras 15B, 16B).

Mais importante é notar que 61 municípios foram identificados como núcleos de agrupamentos *high-high*, correspondendo a 7,15% dos municípios do estado de Minas Gerais. Destes, 40 são agrupamentos *high-high* provenientes da análise LTA por esquistossomose, e 34 da análise esquistossomose por LTA, sendo 13 agrupamentos presentes em ambas as análises (tabela 5). Esses 13 municípios comuns às duas análises bivariadas são os mesmos que se sobrepuseram nas análises univariadas, listados anteriormente na tabela 4, o que, mais uma vez, aponta-os como áreas onde coinfecções são mais prováveis.

Tabela 5. Agrupamentos *high-high* obtidos em análises bivariadas de associação espacial entre LTA e esquistossomose.

(continua)

Mesorregião	Microrregião	Município	Análise	Valor de p*
Norte de Minas	Januária	Cônego Marinho	E/L	0,001
		Januária	E/L	0,009
	Salinas	Indaiabira	E/L	0,036
		Montezuma	E/L	0,027
		São João do Paraíso	E/L	0,050
		Vargem Grande do Rio Pardo	L/E	0,027
Jequitinhonha	Almenara	Almenara	E/L	0,043
	Araçuaí	Araçuaí	L/E	0,031
		Caraí	L/E	0,031
		Novo Cruzeiro	L/E	0,025
		Padre Paraíso	L/E	0,046
	Capelinha	Capelinha	L/E	0,045
Vale do Mucuri	Teófilo Otôni	Ataleia	L/E	0,022
		Frei Gaspar	L/E	0,006
		Itaipé	L/E	0,019
		Ladainha	L/E	0,039
		Malacacheta	L/E	0,007

Tabela 5. Agrupamentos *high-high* obtidos em análises bivariadas de associação espacial entre LTA e esquistossomose.

(continuação)

Mesorregião	Microrregião	Município	Análise	Valor de p*
Vale do Mucuri	Teófilo Otoni	Ouro Verde de Minas	L/E	0,028
		Poté	L/E	0,007
		Setubinha	L/E	0,043
		Teófilo Otôni	L/E	0,021
Vale do Rio Doce	Caratinga	Bom Jesus do Galho	E/L	0,008
		Caratinga	Ambas	0,019
		Córrego Novo	E/L	0,032
		Dom Cavati	Ambas	0,045
		Entre-Folhas	E/L	0,036
		Iapu	Ambas	0,048
		Imbé de Minas	Ambas	0,017
		Inhapim	Ambas	0,020
		Piedade de Caratinga	E/L	0,001
		Santa Rita de Minas	E/L	0,013
		São Domingo das Dores	Ambas	0,016
		São Sebastião do Anta	Ambas	0,021
		Ubaporanga	Ambas	0,019
	Aimorés	Alvarenga	L/E	0,025
		Conceição de Ipanema	L/E	0,008
		Ipanema	Ambas	0,011
		Mutum	L/E	0,013
	Governador Valadares	Itambacuri	L/E	0,014
	Peçanha	Água Boa	L/E	0,012
Metropolitana de Belo Horizonte	Conceição do Mato Dentro	Conceição do Mato Dentro	L/E	0,002
		Serro	E/L	0,047
	Itabira	Dionísio	E/L	0,030
Zona da Mata	Manhuaçu	Alto Caparaó	E/L	0,007
		Alto Jequitibá	E/L	0,003
		Chalé	L/E	0,032
		Durandé	L/E	0,026
		Luisburgo	E/L	0,015
		Manhuaçu	E/L	0,001

Tabela 5. Agrupamentos *high-high* obtidos em análises bivariadas de associação espacial entre LTA e esquistossomose.

(conclusão)

Mesorregião	Microrregião	Município	Análise	Valor de p*
Zona da Mata	Manhuaçu	Manhumirim	L/E	0,038
		Martins Soares	E/L	0,031
		Matipó	L/E	0,030
		Reduto	Ambas	0,047
		Santa Bárbara do Leste	Ambas	0,036
		Santana do Manhuaçu	Ambas	0,014
		São João do Munhuaçu	L/E	0,047
		Simonésia	Ambas	0,011
	Muriaé	Espera Feliz	E/L	0,048
		Divino	E/L	0,050
	Ponte Nova	Raul Soares	E/L	0,004
	Viçosa	Presidente Bernardes	L/E	0,048

*Pseudo-valor de p obtido de 999 permutações. Em caso de agrupamento presente em ambas as análises, o valor de p mais alto é dado. LTA: leishmaniose tegumentar americana. L/E: núcleo de agrupamento *high-high* obtido da análise de LISA bivariada de incidência de LTA versus incidência de esquistossomose. E/L: núcleo de agrupamento *high-high* obtido da análise de LISA bivarada de incidência de esquistossomose versus incidência de LTA. Ambas: núcleo de agrupamento *high-high* presente nas duas análises bivariadas. Fonte: elaborado pelo autor.

Agrupamentos de alta incidência de LTA com vizinhança contendo municípios com alta prevalência de esquistossomose foram observados no Norte de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte e Zona da Mata, enquanto a análise inversa, a qual determina municípios de altas taxas de prevalência de esquistossomose com vizinhos de alta incidência de LTA, evidencia agrupamentos *high-high* nas mesmas mesorregiões, exceto Vale do Mucuri. A mesorregião com o maior número de agrupamentos *high-high* é Vale do Rio Doce, com 19 agrupamentos, 13 dos quais estão na microrregião de Caratinga. Em segundo lugar, encontra-se a Zona da Mata, com 18 agrupamentos. Apesar de algumas diferenças, os resultados de ambas as análises bivariadas são complementares. Logo, para ilustrar isso, a figura 18 combina os agrupamentos *high-high* das duas análises.

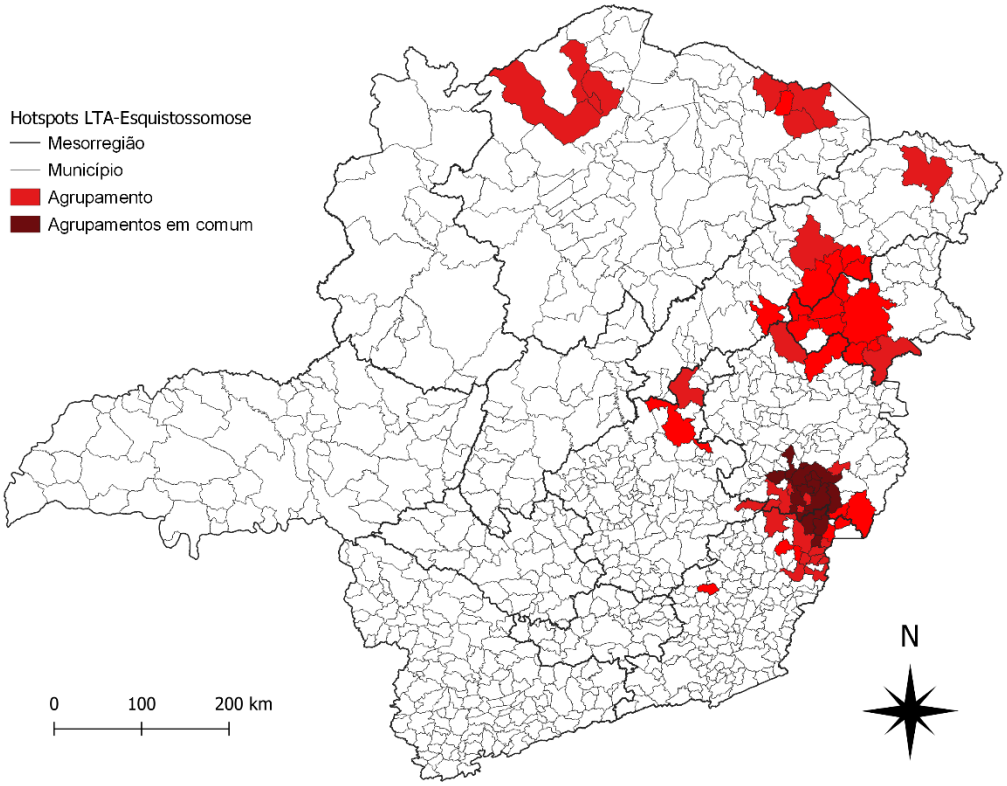


Figura 18. *Hotspots* de coendemicidade de LTA e esquistossomose em Minas Gerais, Brasil, entre 2013 e 2017. Agrupamentos obtidos em uma das análise de LISA bivariada são apresentados em vermelho vivo, enquanto núcleos de agrupamentos presentes em ambas as análises bivariadas estão em vermelho escuro. Mapa criado pela combinação dos agrupamentos *high-high* da análise de LISA bivariada utilizando taxa incidência local de LTA ou taxa de prevalência local de esquistossomose suavizada em relação à taxa de prevalência de esquistossomose ou de incidência de LTA suavizada na vizinhança. Fonte: elaborado pelo autor.

A sobreposição dos dois mapas de LISA bivariados aponta a existência de sete aglomerados, *hotspots*, de municípios com elevadas incidências de esquistossomose e LTA. Os menores aglomerados têm somente um município cada: Presidente Bernardes, na Zona da Mata, e Almenara, no Jequitinhonha. Com dois municípios, existem um aglomerado ao norte da Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte e um a oeste do Norte de Minas, enquanto o aglomerado a oeste do Norte de Minas possui quatro municípios. O mais extenso aglomerado em área possui 16 municípios distribuídos em três mesorregiões (Jequitinhonha, Vale do Mucuri e Vale do Rio Doce). Por fim, o aglomerado com o maior número de municípios é localizado entre o Vale do Rio Doce, Zona da Mata e a Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte, sendo composto de 35 municípios, incluindo os 13 agrupamentos *high-high* comuns às duas análises bivariadas.

5.3 Discussão – Capítulo 1

A esquistossomose e a leishmaniose tegumentar estão entre as DTNs mais importantes. Neste capítulo, foram demonstrados quais países são endêmicos para ambas as doenças e, consequentemente, podem ser classificados como coendêmicos, assim como foram realizadas análises de LISA para indicar áreas de maior coendemicidade em uma região bem estabelecida como coendêmica, o estado de Minas Gerais no Brasil.

Dos 78 países endêmicos para esquistossomose e 90 endêmicos para leishmaniose tegumentar (Ruiz-Postigo et al. 2023, WHO 2023), 40 são simultaneamente endêmicos para ambas as doenças, sendo que 23 deles requerem quimioterapia preventiva para esquistossomose. Apesar de alguns desses países terem apresentado uma queda na sua carga de doença devido à aplicação de programas de controle, como Brasil, Burquina Fasso e Iêmen (Martins-Melo et al. 2018, Johari et al. 2022, Ruiz-Postigo et al. 2023, Zida et al. 2024), o que, consequentemente, diminui os riscos de coinfecções *Schistosoma-Leishmania*, essa diminuição não pode ser tida como uma certeza, já que alguns países coendêmicos, como Guiné e Iêmen, apresentam programas não tão efetivos ou que provavelmente serão descontinuados nos próximos anos (Johari et al. 2022, Cherif et al. 2023). Isso é especialmente preocupante em territórios onde migrações em massa e guerras impactam negativamente a eficiência de programas de controle ou dificultam o acesso a serviços essenciais (Du et al. 2016).

Além do mais, muito pouco se sabe sobre como a infecção por *S. haematobium* afeta a leishmaniose tegumentar e vice-versa. Esse fato merece atenção especial, tanto por causa da falta de modelos experimentais adequados para infecções com essa espécie de *Schistosoma*, quanto pelo fato de que alguns países coendêmicos, como Burquina Fasso e Nigéria (este último sendo o país com maior carga de esquistossomose no mundo), têm a maior parte de sua carga de doença causada por *S. haematobium* (Aula et al. 2021, Saidu et al. 2023, Zida et al. 2024). Pouco se conhece, também, sobre como a esquistossomose afeta manifestações cutâneas típicas de regiões fora de América, como a leishmaniose dérmica pós-calazar.

Apesar do número considerável de países coendêmicos, até agora, coinfecções entre *S. mansoni* e espécies dermotrópicas de *Leishmania* spp. em indivíduos de áreas endêmicas só foram relatados no Brasil, nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (O'Neal et al. 2007, Azeredo-Coutinho et al. 2016, Gregorio et al. 2019, Miranda et al. 2021). Em algumas áreas do Brasil, os relatos reportam que taxas de coinfecção ativa por *S. mansoni*

podem ser tão altas quanto 16,7% em indivíduos com LTA (O'Neal et al. 2007). É bem provável que a falta de relatos não represente baixa incidência de coinfecções, e sim falta de interesse ou de capacidade de investigar e relatar casos de coinfecção devidamente. Logo, é muito possível que mais casos de coinfecções *Schistosoma-Leishmania* sejam achados mundialmente uma vez que autoridades sanitárias e grupos de pesquisa procurem mais a fundo em seus respectivos países.

É importante apontar também que, devido a áreas extensas e o caráter focal da transmissão de ambas as doenças (Chadeka et al. 2017, Gomes et al. 2018, Zeb et al. 2021, Coelho et al. 2021), mesmo que classificar países inteiros como coendêmicos possa ser útil até certo ponto, isso dá uma visão, provavelmente, superestimada do problema. Portanto, análises em escalas menores podem fornecer uma representação mais fidedigna de onde a transmissão dessas doenças realmente se sobrepõe. Já que o Brasil foi considerado um país coendêmico, com incidência elevada tanto para esquistossomose quanto para LTA, foi realizada uma análise espacial utilizando as taxas de incidências para o estado de Minas Gerais.

Historicamente, o estado de Minas Gerais tem sido considerado endêmico tanto para esquistossomose quanto para LTA (Bezerra et al. 2018a, Martins-Melo et al. 2018, Gomes et al. 2023). Além dos relatos de pessoas que já tiveram ambas as doenças, apesar de não ao mesmo tempo (Miranda et al. 2021), Minas Gerais apresenta crescentes taxas de incidência de LTA a despeito da queda geral de casos observada nos últimos anos para o resto do Brasil (Belo et al. 2023), indicando que esse estado é uma área onde interações esquistossomose-LTA provavelmente acontecem. Desta forma, esse estado foi escolhido como modelo para demonstrar, a nível epidemiológico-espacial, como a transmissão de esquistossomose e LTA podem estar relacionadas e delimitar áreas específicas de maior coendemicidade dentro de uma região coendêmica.

Apesar de relatos que as coinfecções *Schistosoma-Leishmania* realmente acontecem em algumas regiões e têm um impacto no curso da doença e prognóstico dos pacientes coinfectados (O'Neal et al. 2007, Azeredo-Coutinho et al. 2016, Gregorio et al. 2019, Miranda et al. 2021), nenhum estudo realmente avaliou a epidemiologia da transmissão dessa coinfecção como seu objeto primário. Até onde se conhece, esse é o primeiro estudo cujo alvo principal é a determinação espacial de áreas coendêmicas para LTA e esquistossomose. Os resultados dos Índices Globais de Moran bivariados indicam que a transmissão dessas duas doenças é relativamente codependente por possuir associação espacial positiva e significativa em Minas Gerais, apesar de não muito forte. Ainda assim, existem municípios com altas taxas de prevalência de esquistossomose cercados por municípios com altas taxas de incidência de LTA

e vice-versa. Esses agrupamentos *high-high* são localizados majoritariamente nas mesorregiões do Norte de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte e Zona da Mata.

Outras análises espaciais similares a essa foram utilizadas para determinar áreas prioritárias para a vigilância e controle de malária (Atanaka-Santos et al. 2007), leishmaniose visceral (Araújo et al. 2013, Barbosa et al. 2014)e LTA (Cardoso et al. 2019) no Brasil, assim como para indicar regiões de maior risco para doença de Chagas, leishmaniose visceral e óbitos relacionados a esquistossomose (Martins-Melo et al. 2012, Martins-Melo et al. 2014a, Gomes et al. 2023). A análise de LISA univariada para determinar agrupamentos de incidência de LTA indicou que, no estado de Minas Gerais, as mesorregiões do Noroeste de Minas, Norte de Minas, Jequitinhonha, Vale do Rio Doce e Zona da Mata concentram a maior parte dos agrupamentos *high-high*. Esses achados vão de encontro ao relatado por Cardoso et al. (2019), que classificaram Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Rio Doce como mesorregiões de maior prioridade para o controle de LTA em Minas Gerais em um período similar. Já quanto à análise univariada para esquistossomose, as mesorregiões do Jequitinhonha, Vale do Mucuri e Vale do Rio Doce são as que concentram o maior número de agrupamentos *high-high*, coincidindo com o indicado por Gomes et al. (2023) como focos de óbitos por esquistossomose em Minas Gerais.

Os resultados das análises bivariadas indicam que as mesorregiões do Norte de Minas, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte e Zona da Mata, anteriormente sugeridas como áreas prioritárias para o controle de LTA (Cardoso et al. 2019) e para o manejo de mortes relacionadas a esquistossomose (Gomes et al. 2023), são também áreas onde casos de esquistossomose-LTA são mais prováveis de acontecer, reforçando a importância dessas áreas para a transmissão das duas doenças. Miranda et al. (2021) mostraram que indivíduos do município de Januária, no Norte de Minas, com histórico de LTA tinham maior taxa de positividade para *S. mansoni* do que indivíduos que nunca tiveram LTA. Além disso, a literatura indica que a microrregião de Januária como um todo é endêmica para esquistossomose e LTA (Oliveira et al. 2018, Cardoso et al. 2019, Pinto et al. 2020, Miranda et al. 2021). De acordo, os resultados desse estudo solidificam esse local como uma área preocupante no sentido de saúde pública, valendo a pena empregar esforço de grupos de pesquisa para o estudo das consequências das coinfecções *Schistosoma-Leishmania* em populações humanas. Fora isso, o presente trabalho propõe outras áreas como tendo uma maior chance de casos de coinfecção, aos quais autoridades sanitárias devem prestar maior atenção. Além dos núcleos de agrupamentos indicados pela análise realizada, é importante mencionar

que os agrupamentos são compostos da unidade analítica (no caso, município) e a sua vizinhança. Logo, atenção especial deve ser prestada aos municípios vizinhos aos que foram aqui indicados. Da mesma forma, mesmo que diversos outros municípios não tenham aparecidos como agrupamentos de alta incidência/prevalência para as duas doenças, isso não exclui a possibilidade de ocorrerem coinfecções nesses locais, seja por casos autóctones, seja por migração.

Além de considerar a população que reside em áreas endêmicas como indivíduos em risco de coinfecção, a migração dessas pessoas para áreas não endêmicas também deve ser levada em consideração, já que existe relato de um refugiado eritreu diagnosticado com *S. mansoni* e por *Leishmania* sp. do complexo *L. donovani* em Israel, um país não endêmico (Paran 2018). Paralelamente, é possível que coinfecção por um parasito aconteça anos depois do primeiro contato com o outro. *Leishmania* spp. podem ainda ser achadas por isolamento ou PCR em cicatrizes anos após cura clínica, sugerindo ausência de cura estéril para LTA (Mendonça et al. 2004), e adultos de *S. mansoni* são extremamente longevos, com alguns estudos indicando sobrevivência por mais de 20 anos (Wallerstein 1949). Além disso, existe evidência de que o tratamento anti-helmíntico concomitante ao começo da administração de antimônio parece inefetivo em mitigar os impactos negativos da coinfecção no tratamento leishmanicida (Unger et al. 2009, Newlove et al. 2011). Ademais, no município de Caratinga, um dos agrupamentos detectados como área de maior endemicidade para ambas as infecções, tem sido relatado um processo de urbanização da transmissão de LTA nos anos recentes (Neves et al. 2023), o que sugere mudanças na dinâmica de transmissão dessas doenças com maior possibilidade de exposição e de coinfecções. Logo, apesar da transmissão de perfil local de LTA e esquistossomose (Chadeka et al. 2017, Gomes et al. 2018, Zeb et al. 2021, Coelho et al. 2021), é bastante possível que indivíduos que adquiram infecções separadamente, em épocas distintas, ainda tenham seu prognóstico afetado (Miranda et al. 2021).

Também é interessante ressaltar que alguns agrupamentos de alta incidência/prevalência das duas doenças estão localizados na divisa de Minas Gerais com outros estados. Os municípios de Januária, Montezuma e São João do Paraíso fazem fronteira com a Bahia, onde casos de coinfecção *Schistosoma-Leishmania* também foram relatados (O'Neal et al. 2007, Unger et al. 2009, Newlove et al. 2011), enquanto Mutum, Durandé, Martins Soares, Manhumirim, Alto Jequitibá, Alto Caparaó e Espera Feliz estão na fronteira com o Espírito Santo, que também é coendêmico para esquistossomose e LTA (Falqueto et al. 1991, Martins-Melo et al. 2014b, 2018, Fiorott et al. 2023). Estudos prévios relataram prevalências de 0,03% a 16,7% de coinfecção por *S. mansoni* em pacientes com LTA no Rio de Janeiro e na Bahia,

respectivamente (O'Neal et al. 2007, Azeredo-Coutinho et al. 2016), enquanto existe um relato de caso de paciente coinfectado em São Paulo com manifestações atípicas de LTA e esquistossomose (Gregorio et al. 2019), todos estados vizinhos de Minas Gerais. Logo, considerando que existem casos de coinfecção *Schistosoma-Leishmania* nesses estados, seria importante realizar análises similares na Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. Paralelamente, análises semelhantes devem ser conduzidas em outros países, o que iria proporcionar um maior conhecimento sobre áreas onde essa e outras coinfecções podem ocorrer. Além disso, fatores socioambientais que potencialmente impactem a transmissão concomitante de esquistossomose e LTA devem ser alvos de estudos futuros.

Finalmente, é importante notar que o presente trabalho possui algumas limitações. Em primeiro lugar, é notória a existência de subnotificação de casos de ambas as doenças nestas bases. Apesar do SISPCE incluir resultados de busca ativa em áreas endêmicas (Brasil 2023), o número de exames executados pelo Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose tem caído consistentemente desde 2006 (Silva & Wanderley 2022, Cardoso et al. 2024). Além disso, os programas de controle da esquistossomose e das leishmanioses figuram como dois dos mais impactados pela pandemia de COVID-19 (Ruiz-Postigo et al. 2022, Dantas et al. 2023). Logo, ao escolher o período entre 2013 e 2017 para análise, teve-se como intuito evitar tanto o declínio nos exames realizados durante e após os anos pandêmicos.

Ademais, as ferramentas diagnósticas atualmente utilizadas são bem ineficientes. O padrão utilizado de duas lâminas de Kato-Katz de uma única amostra de fezes subestima consideravelmente a prevalência de infecção por *S. mansoni* em áreas endêmicas onde indivíduos apresentam baixas cargas parasitárias (Berhe et al. 2004, Enk et al. 2008, Oliveira et al. 2018), enquanto métodos parasitológicos mais sensíveis são relativamente mais laboriosos ou caros e, portanto, não são realizados nos levantamentos parasitológicos dessas regiões. Além disso, testes rápidos de urina, como POC-CCA e POC-ECO, ainda não apresentam uma performance desejável em áreas endêmicas no Brasil (Oliveira et al. 2018, Bezerra et al. 2018b, Favre et al. 2022, Pieri et al. 2023). Quanto à LTA, os métodos parasitológicos diretos, apesar de serem os mais rotineiramente usados e ainda tidos como padrão ouro, podem ser relativamente invasivos e tem sensibilidade limitada, enquanto testes imunológicos dependem de títulos altos de anticorpos e podem apresentar reação cruzada com outros parasitos, como *Trypanosoma cruzi*; já métodos moleculares, apesar de altamente sensíveis e específicos, requerem infraestrutura mais elaborada e técnicos bem treinados (Souza et al. 2013, de Vries & Schallig 2022). Já que somente casos confirmados são registrados nas bases de dados utilizadas, é muito provável que a incidência das duas doenças esteja subestimada.

A segunda limitação surge porque os casos de esquistossomose são registrados em dois sistemas separados: o SISPCE é utilizado para casos não complicados em áreas endêmicas, enquanto casos mais severos de áreas endêmicas e casos de áreas não endêmicas são registrados no SINAN (Brasil 2023). Essa forma confusa e contraintuitiva de notificar casos pode levar a erros, e um método mais direto e simplificado é necessário com urgência se as autoridades brasileiras têm pelo menos o mínimo de intenção de relatar casos de esquistossomose de forma apropriada no País. Ao usar as duas bases de dados, garante-se que as análises levaram em consideração todos os casos relatados no período. Contudo, ao mesmo tempo, não se pode garantir que não existam casos duplicados, apesar que, supostamente, nenhum caso deva ser notificado nas duas bases simultaneamente se as diretrizes de notificação forem devidamente seguidas.

5.4 Conclusões – Capítulo 1

Uma quantidade significativa de países endêmicos ou para esquistossomose ou para leishmaniose tegumentar pode ser classificada como coendêmica. Métodos mais precisos de análise espacial, como LISA, a um nível mais localizado podem ajudar a indicar onde coinfecções devem ocorrer com maior frequência nesses países. Além disso, os resultados aqui mostrados indicam que existem diversos municípios com alta transmissão concomitante de LTA e esquistossomose, aumentando as chances de coinfecções nesses locais. Isso é especialmente verdade para os agrupamentos formados nas mesorregiões do Vale do Rio Doce e Zona da Mata. Somadas às mesorregiões do Norte de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri e Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte, essas regiões são onde esforços para controle e estudos do impacto das coinfecções *Schistosoma-Leishmania* devem ser dirigidos.

Espera-se que o delimitar de áreas onde interações esquistossomose-LTA devem ocorrer com maior frequência ajude autoridades sanitárias a elaborar políticas públicas e diretrizes para assistir indivíduos coinfectados de forma apropriada. Paralelamente, profissionais de saúde devem ter em mente a possibilidade de coinfecções ao prestar cuidados a pacientes que buscaram atendimento, a princípio, por LTA ou esquistossomose nesses locais, já que a coinfecção deve ser considerada na decisão sobre o curso de ação para tratamento desses indivíduos. Por fim, estudos como o aqui apresentado podem contribuir para outros estudos sobre o impacto da coinfecção *Schistosoma-Leishmania*, pois determinar populações

amplamente expostas a ambos os patógenos pode facilitar o acesso de grupos de pesquisa a indivíduos coinfectados.

6 CAPÍTULO 2

Resposta imune, patogênese e parasitismo na infecção por *L. amazonensis* frente à infecção aguda prévia por *S. mansoni*

RESUMO

A esquistossomose e a leishmaniose tegumentar são duas doenças infecciosas cuja patogênese é fortemente associada à resposta imune do hospedeiro. Os estudos existentes sobre coinfecções *Schistosoma-Leishmania*, tanto experimentais quanto em humanos, indicam que essa coinfecção afeta o desenvolvimento de lesões cutâneas, aumenta susceptibilidade a ambas as infecções, piora a resposta ao tratamento e induz perfis imunes regulatórios. Contudo, muito ainda precisa ser explorado, especialmente em relação à coinfecção com *L. amazonensis*, um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana. Logo, o presente estudo buscou elucidar como o parasitismo, resposta imune e patogênese de *S. mansoni* e *L. amazonensis* em camundongos são afetados pela coinfecção. Para isso, camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos experimentais: não infectado, monoinfectado por *S. mansoni*, monoinfectado por *L. amazonensis*, e coinfectado com *L. amazonensis* após 8 semanas de infecção por *S. mansoni*. Os animais foram acompanhados por 18 semanas. Peso, espessura da pata e mortalidade foram avaliados por 10 semanas pós-coinfecção, e órgãos foram coletados para análise. Não houve mudança em mortalidade, alteração de peso ou carga parasitária de *S. mansoni*. Os fígados, contudo, foram mais pesados nos animais coinfectados que em todos os outros grupos. A piora da doença hepática foi reforçada por análise histopatológica, evidenciando diferenças nos granulomas e maior lesão no fígado. Quanto à infecção por *L. amazonensis*, a coinfecção induziu lesões com menor espessura e de crescimento lento. Porém, a carga parasitária de *L. amazonensis* na pata de camundongos coinfectados foi expressivamente maior. Em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de animais coinfectados, houve manutenção de citocinas de perfil Th1 e aumento de IL-5 e IL-10 em relação aos monoinfectados com *L. amazonensis*. Análise histopatológica de pata revelou que a coinfecção provocou áreas de necrose maiores e mais frequentes, com amastigotas mais abundantes. Para melhor descrever a função de macrófagos, células peritoneais de camundongos sadios ou com 8 semanas de infecção por *S. mansoni* foram transferidas para camundongos infectados por *L. amazonensis*, ambas reduzindo similarmente o espessura da lesão em comparação ao controle. Logo, a coinfecção *S. mansoni-L. amazonensis* altera o microambiente imune no local de infecção por *L. amazonensis*, causando maior perda tecidual, maior proliferação de amastigotas e piora da lesão hepática da esquistossomose mansoni.

Palavras-chave: Esquistossomose; Leishmaniose tegumentar; Coinfecção; Imunopatologia; Macrófagos.

6.1 Material e métodos – Capítulo 2

6.1.1 Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongo BALB/c, 10 por grupo, com 8 semanas de vida provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante o experimento, os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG) em estantes ventiladas com água e ração *ad libitum.* Todos os procedimentos aqui descritos foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob o número 398/2018, estando de acordo com o Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

6.1.2 Parasitos e infecção experimental

A cepa LE de *S. mansoni*, originalmente isolada de paciente humano de Belo Horizonte, foi utilizada para os experimentos. Sua manutenção é realizada no Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG) por meio de passagens consecutivas em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e hamster sírio *Mesocricetus auratus* (CEUA nº 368/2018; nº 041/2024). *B. glabrata* infectados foram expostas à luz artificial por 4 h, e as cercárias recuperadas foram lavadas diversas vezes em solução salina 0,85%, concentradas e contadas, conforme descrito por Pellegrino & Macedo (1955). Para a infecção, foram inoculadas 25 ou 50 cercárias por animal, a depender do experimento, por via subcutânea no dorso dos animais em volume máximo de 500 µl.

Quanto a *L. amazonensis*, foi utilizada a cepa PH8 (IFLA/BR/1967/PH8), gentilmente fornecida pela Profa. Dra. Maria Norma Melo. Promastigotas recém-isoladas de camundongos BALB/c foram cultivadas a 24 ºC em meio α-MEM (Gibco™, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) suplementado com 20% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 300 U/ml de estreptomicina e 300 µg/ml de penicilina (LGC Biotecnologia). Para a infecção, foram utilizadas promastigotas de fase estacionária de cultura até a quinta passagem de cultivo, lavadas em tampão fosfato (PBS) e contadas em PBS contendo 4% de formaldeído.

As infecções *in vivo* foram feitas com 10^5 promastigotas em 10 µl de PBS por via subcutânea no coxim plantar do membro pélvico direito.

6.1.3 Obtenção de antígenos

Para a obtenção de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de cultura foram retiradas do meio de cultura e passaram por três lavagens em PBS. Os sedimentos foram submetidos a cinco ciclos de congelamento a -80 ºC e descongelamento a 37 ºC e 20 ciclos de 10 segundos em sonicador (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil), acompanhando em microscópio para verificar a desintegração dos parasitos (Pinheiro et al. 2004). As amostras foram, então, centrifugadas a 4000 g por 1 h a 4 ºC, e o sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana esterilizante de 0,22 µm (Minisart® Syringe Filter, Sartorius, Gotinga, Alemanha). As proteínas solúveis obtidas foram quantificadas por meio de kit disponível comercialmente (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific Inc.). Alíquotas foram feitas e congeladas a -20 ºC até o uso.

6.1.4 Avaliação *in vivo* de animais coinfectados

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais: um grupo controle não infectado, um grupo infectado somente com *S. mansoni*, um grupo infectado somente com *L. amazonensis* e um grupo coinfectado. As análises foram feitas a partir de uma infecção com 10 animais por grupo ou duas infecções independentes com 5 animais por grupo em cada repetição. Para a infecção, foram utilizadas 25 cercárias por animal, inoculadas por via subcutânea no dorso do camundongo, e 10^5 promastigotas de fase estacionária na pata direita, preparadas conforme já descrito anteriormente.

Para que a eutanásia de todos os quatro grupos ocorresse no mesmo dia, as infecções com *S. mansoni* foram realizadas na semana 0 do protocolo experimental, enquanto as infecções com *L. amazonensis* foram realizadas na semana 8, conforme a figura 19. Todos os animais foram eutanasiados após 18 semanas do início do protocolo experimental (18 semanas de infecção por *S. mansoni* e 10 por *L. amazonensis*) por injeção intraperitoneal de sobredose anestésica de cetamina (240 mg/kg, Dopalen, Jacareí, SP, Brasil) e xilazina (30 mg/kg, Kensol, Avellaneda, Argentina). Como a maior parte dos procedimentos e análises aqui descritos

inviabilizam o uso de uma amostra para outros fins, foi necessário realizar três experimentos distintos com o mesmo delineamento experimental, nos quais os animais foram utilizados para análise de carga parasitária, patogênese e resposta imune separadamente.

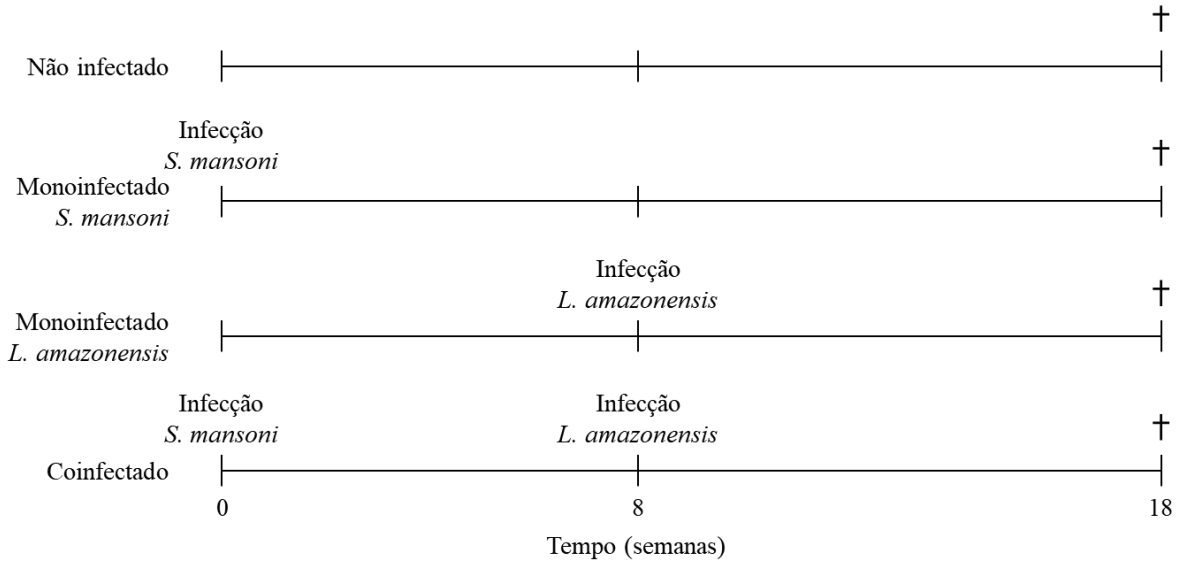


Figura 19. Delineamento experimental para avaliação *in vivo* da coinfecção *Schistosoma-Leishmania*. Somente os grupos monoinfectado com *S. mansoni* e coinfectado foram infectados com 25 cercárias na semana zero do protocolo experimental. Na oitava semana do protocolo experimental, os grupos monoinfectado com *L. amazonensis* e coinfectado foram infectados no coxim plantar do membro pélvico direito com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. O tempo total de acompanhamento dos animais foi 18 semanas, quando ocorreu a eutanásia (†). Fonte: elaborado pelo autor.

6.1.4.1 Análise patológica

A partir da semana 8 do protocolo experimental, que corresponde ao momento de infecção por *L. amazonensis*, os animais tiveram suas patas medidas com espessímetro (Prof/Arco 30mm, Mitutoyo Sul Americana, Jundiaí, SP, Brasil) semanalmente para acompanhamento do desenvolvimento da lesão cutânea induzida pelo protozoário. O incremento de lesão foi calculado com base a espessura da pata direita subtraindo a espessura da pata esquerda. Além disso, os animais tiveram avaliados olhos, mucosa oral, orelhas e pele em geral para verificar disseminação de lesões. O peso dos animais também foi medido semanalmente para avaliar mudanças de peso em relação à 8ª semana do protocolo experimental, e, para determinação da curva de mortalidade, foram considerados os animais

achados mortos e aqueles cuja eutanásia foi realizada antes do término do protocolo experimental por apresentarem sinais de sofrimento intenso, como caquexia e dispneia. Após a eutanásia, pata, fígado e baço dos animais foram coletados, tiveram seus pesos medidos e foram destinados para diferentes análises. Para determinação do peso relativo, o peso de cada órgão foi dividido pelo peso corporal total do animal do qual foi retirado.

6.1.4.1.1 Análise histopatológica

As análises histopatológicas foram feitas em parceria com o Laboratório de Patologia das Leishmanioses, coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Tafuri. As lesões de patas direitas e o lobo maior dos fígados de animais experimentais foram recolhidos e fixados em formol 10% tamponado por 24 horas. Após esse período, os órgãos foram lavados em água corrente por 3 horas para retirada do formol. As amostras foram mantidas em etanol 70% até o processamento.

Para preparo das lâminas histológicas, o material foi desidratado em bateria crescente de álcool etílico (70% a 100%), clarificado em xilol e incluído em parafina. Depois de rígidos, os blocos de parafina com os tecidos foram cortados em micrótomo na espessura de 5 µm. Os cortes foram estendidos em banho maria a 40 °C e montados em lâminas de vidro. Após desparafinização e reidratação, foi realizada coloração com hematoxilina-eosina (Junqueira & Junqueira 1983) para avaliação do infiltrado inflamatório e lesões provocadas pelas infecções de forma qualitativa.

6.1.4.2 Carga parasitária

Para a determinação da carga parasitária de *S. mansoni*, foram utilizadas as medidas de recuperação de vermes adultos e retenção de ovos no fígado. A recuperação de vermes adultos foi realizada por meio de perfusão do sistema porta hepático dos camundongos infectados por *S. mansoni* com solução salina 0,85% contendo 0,5 UI/ml de heparina sódica (Parinex, Hipolabor Farmacêutica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme descrito anteriormente (Pellegrino & Siqueira 1956). Os adultos recuperados foram lavados, contados e diferenciados morfologicamente em machos em fêmeas. Após a eutanásia, foram retirados os fígados, os

quais foram pesados e sujeitos à digestão alcalina em KOH 5% a 37 ºC, possibilitando a contagem de ovos retidos no parênquima desses órgãos (Cheever 1968).

Já a carga parasitária de *L. amazonensis* foi estimada por diluição limitante (Titus et al. 1985). As patas direitas dos animais infectados foram retiradas, pesadas em microtubos de 2 ml e lavadas em álcool iodado para desinfetação, seguido de uma lavagem em PBS. Em seguida, foi adicionado às patas volume de PBS o suficiente para que se completasse 1 ml nos tubos. O conteúdo dos microtubos foi transferido para um macerador de vidro, e as patas foram maceradas até que não houvesse mais pele íntegra. A diluição limitante foi feita em triplicata em placas de 96 poços contendo α-MEM suplementado com 20% de SBF e 2000 U/ml de penicilina e 2 mg/ml de estreptomicina (LGC Biotecnologia) até a diluição de $1{:}5x10^{32}$. A carga foi determinada pela média da diluição dos últimos poços em que foi observado crescimento de promastigotas após 7 dias de cultivo a 24 ºC.

6.1.4.3 Avaliação sérica de função hepática

Para a recuperação de soro, antes da eutanásia, os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de xilazina (Dopalen) e 100 mg/kg de cetamina (Kelson) e tiveram sangue extraído da veia axilar. Após a formação e retração de coágulo, as amostras de sangue foram centrifugadas a 25 ºC por 10 min a 1500 g e o soro foi recolhido e armazenado a -20 ºC até uso. A função hepática dos animais experimentais foi avaliada pela determinação das concentrações séricas de albumina e proteína C-reativa (PC-R), assim como a atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gamaglutamiltransferase (GGT), utilizando kits comercialmente disponíveis (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e seguindo as orientações do fabricante.

Para determinar níveis séricos de albumina, em uma placa de microtitulação de 96 poços, 2 µl das amostras foram adicionados a 200 µl do reagente de trabalho e deixados para incubação à temperatura ambiente por 10 min. As concentrações de albumina foram determinadas pela comparação das densidades ópticas das amostras com uma curva padrão de concentrações conhecidas de albumina (0,12 g/dl – 3,8 g/dl) no *software* SoftMax Pro 5.2 (VersaMax, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) após leitura em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices) a 630 nm. As concentrações de PC-R foram determinadas por meio da adição de 2,5 µl de soro e 250 µl do reagente de trabalho a uma placa de 96 poços, a

qual foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram lidas a 540 nm e as concentrações foram calculadas por interpolação da densidade óptica das amostras em uma curva padrão de concentrações conhecidas de PC-R (0,3 mg/l – 9,6 mg/l) no *software* SoftMax Pro 5.2 (VersaMax, Molecular Devices).

Para determinar as atividades de AST e ALT, 25 µl dos respectivos substratos foram adicionados a 5 µl das amostras de soro em uma placa de 96 poços, então incubadas por 30 min a 37 ºC. A quantidade de 25 µl de solução contendo 2,4-dinitrofenilhidrazina 1 mM e HCl 1 M foram adicionados, e as placas foram incubadas por mais 20 min à temperatura ambiente. Após esse período, as reações foram paradas com a adição de 250 µl de NaOH 1,25 M. A absorbância foi lida a 505 nm (VersaMax, Molecular Devices), e a atividade enzimática foi determinada pela comparação da densidade óptica do teste a uma curva com concentrações conhecidas de piruvato de sódio (0,25 mM – 2 mM, correspondendo a 24 U/l – 190 U/l de AST e 28 U/l – 150 U/l de ALT). Para a atividade de GGT, 100 µl do reagente de trabalho e 5 µl de amostra de soro foram adicionados a uma placa de 96 poços, incubada por 1 min a 37 ºC, e lida a 405 nm (VersaMax, Molecular Devices). A atividade de GGT foi determina por comparação à curva padrão de concentrações conhecidas de p-nitroanilina (4 µM – 500 µM, correspondendo a 2 U/l – 125 U/l de GGT) no SoftMax Pro 5.2 (VersaMax, Molecular Devices). A razão de AST/ALT foi calculada dividindo os valores da atividade de AST pelos valores de atividade de ALT individualmente para cada camundongo (Giannini et al. 2003).

6.1.4.4 Dosagem de citocinas e quimiocinas em lesões cutâneas

As patas de animais infectados com *L. amazonensis* e coinfectados foram picotadas até a formação de uma massa homogênea, da qual foram retirados 50 mg para processamento. Foi adicionado 1 ml de tampão fosfato contendo 0,05% de Tween 20, 0,5% albumina bovina sérica (BSA), 0,1 mM fluoreto de fenilmetilsufonila, 0,1mM de cloreto benzetônico; 10 mM EDTA e 20 U/L de aprotinina, e a amostra foi processada em homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA).

O homogenato foi centrifugado a 3000 g por 10 min a 4 ºC, e o sobrenadante foi recolhido e congelado a -20 ºC para utilização para dosagem de citocinas e o sedimento foi processado para avaliação de atividade enzimática de mioeloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO), como detalhado a seguir. Para dosagem de citocinas foram utilizados kits

de ELISA comercialmente disponíveis (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) para a dosagem de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-22, IL-33, CCL5, CCL17, CCL24, CXCL2, CXCL13, IFN-γ, TGF-β e TNF-α seguindo as instruções do fabricante. De forma breve, placas de 96 poços foram sensibilizadas, por poço, com 25 µl de anticorpo de captura anti-citocina de interesse. Após 12 horas, foram feitas três lavagens com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20). Em seguida, foram adicionados 25 µl por poço de tampão de bloqueio (PBS contendo 1% de albumina sérica bovina). Depois de 40 minutos, as placas foram lavadas novamente, e foram adicionadas as amostras para análise em diluição de 1:2, além de amostras com concentração conhecida da citocina recombinante para o estabelecimento da curva padrão, sendo incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Passado esse tempo, as placas foram novamente lavadas e, a cada poço, foram adicionados 25 µl de anticorpo de detecção conjugado à biotina por mais duas horas. Em seguida, após lavagem, adicionaram-se 25 µl de estreptoavidina conjugada à peroxidase por 20 minutos. Após três lavagens, a reação foi revelada com 25 µl de solução com substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina – TMB), sendo a reação parada depois de 20 minutos com 20 µl de solução H_2SO_4 a 2 N. As concentrações das citocinas nas amostras foram determinadas com leitura a 450 nm e por interpolação no gráfico resultante da curva padrão com concentrações conhecidas da citocina alvo utilizando o programa SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

6.1.4.5 Atividade de mioeloperoxidase (MPO)

No sedimento obtido do homogenato de pata de cada animal experimental foi adicionado 1 ml de salina 0,2%, seguida de 1 ml de salina 1,6% contendo 5% de glicose para a lise de eritrócitos. As amostras foram homogeneizadas, e o homogenato foi separado, metade foi processado para estimar a atividade de MPO, e outra parte utilizada para o ensaio de atividade de EPO.

As amostras destinadas ao ensaio de MPO foram centrifugadas a 3000 g por 10 min a 4 ºC, ressuspensas em 200 µl de tampão contendo NaCl 0,1 M, $NaPO_4$ 0,02 M, Na_2EDTA 0,015 M, pH 4,7, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 3000 g por 10 min a 4 ºC. O precipitado foi novamente homogeneizado em 800 µl de tampão contendo 0,05 M $NaPO_4$ com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetrilamônio (HTAB), pH 5,4. Os microtubos contendo as amostras passaram por três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em água

morna. Em seguida, foi realizada uma última centrifugação a 3000 g por 10 min a 4 ºC, e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio colorimétrico segundo descrito por Bailey (1988) e modificado por Barcelos et al. (2005).

Para o ensaio, 25 µl da amostra foram colocados em placa de 96 poços (Flat Bottom Plate – SARSTEDT Inc., USA) contendo 25 µl de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzina 1,6 mM diluída em dimetilsulfóxido (DMSO). A placa foi encubada a 37 ºC por 5 min em estufa seca. Em seguida, foram adicionados 100 µl de solução de 0,5 mM de H_2O_2 a cada poço, e a placa foi encubada a 37 ºC por mais 5 min. Para interromper a reação, foram adicionados 50 µl de H_2SO_4 1 M, e absorbância de cada poço foi lida em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices) em um comprimento de onda 450 nm.

6.1.4.6 Atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)

A outra metade do sedimento obtido do homogenato de pata foi utilizado para avaliação da atividade de EPO. De início, foi feita centrifugação a 3000 g por 10 min a 4 ºC e descarte do sobrenadante. O sedimento foi ressuspendido em 950 µl de PBS contendo HTAB 0,5%, pH 7,4. Assim como para o ensaio de MPO, essas amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e água morna, respectivamente, seguidos por centrifugação a 3000 g por 10 min a 4 ºC. O sobrenadante foi utilizado para ensaio enzimático, conforme descrito por Bailey (1988) e modificado por Silveira et al. (2002).

Para o ensaio, em placas de 96 poços, foram adicionados 75 µl das amostras e 75 µl de tampão Tris-HCl, pH 8,0, contendo 1,5 mM de o-fenilenodiamina (OPD) e 6,6 mM de H_2O_2. Após a cor ser revelada, a reação foi parada com 50 µl de H_2SO_4 a 4 N. As amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices) sob um comprimento de onda de 492 nm.

6.1.4.7 Atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)

Para a quantificação da atividade de NAG, arginase e NO, também foi utilizada uma amostra de 50 mg de tecido recolhido da área de lesão das patas de animais monoinfectados

com *L. amazonensis* e coinfectados, processada de forma semelhante ao realizado para quantificação de citocinas e atividade de EPO e MPO. Às amostras, foram adicionados 950 µl de tampão contendo NaCl 0,1 M, Na_3PO_4 0,02 M e Na_2EDTA 0,015M, pH 4,7, as quais foram processadas em homogeneizador de tecidos e centrifugadas a 3000 g por 10 min a 4 ºC.

O sobrenadante foi descartado, e eritrócitos presentes no sedimento foram lisados pela adição de 750 µl de solução salina 0,2%. Depois de 30 segundos, foram adicionados mais 750 µl de solução salina 1,6% com 5% de glicose, e as amostras foram novamente centrifugadas a 3000 g por 10 min a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado, enquanto o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de solução salina 0,85% contendo 0,1% de Triton X-100. Após centrifugação a 4 ºC e 4000 g por 10 min, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para os ensaios de atividade de NAG, arginase e produção de espécies reativas de nitrogênio.

O ensaio para avaliar a atividade de NAG foi realizado segundo descrito anteriormente (Barcelos et al. 2005). Brevemente, foram plaqueados 100 µl de amostra de homogenato de pata e 100 µl de tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na_2HPO_4 0,1 M, pH 4,5) contendo 0,767 g/ml de p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosamina (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). As placas foram encubadas a 37 ºC por 10 min. Após incubação, foram adicionados 100 µl de tampão glicina (glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M, pH 10,6) e a absorbância foi determinada por leitura em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices) em comprimento de onda de 400 nm.

6.1.4.8 Atividade de arginase

Com as mesmas amostras biológicas obtidas para avaliar atividade de NAG no homogenato de lesão de pata também foi realizado o ensaio para determinação da atividade de arginase, conforme descrito anteriormente (Corraliza et al. 1994). Para o ensaio enzimático, 50 µl da amostra biológica foram adicionados a uma placa de 96 poços (Sarstedt) junto a 50 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MnCl_2$ 10 mM, a qual foi encubada por 10 min a 55 ºC. Após incubação, 25 µl do conteúdo dos poços foram transferidos para outra placa, e a eles foram adicionados 25 µl de solução 0,5 M de L-arginina, sendo a mistura foi incubada a 37 ºC por 1 h. A reação foi interrompida com 200 µl de mistura ácida contendo H_2SO_4 96%, H_3PO_4 85% e água destilada (1:3:7, v/v/v). Em seguida, foram adicionados 13 µl de solução etanólica contendo α-isonitrosopropiofenona (Sigma-Aldrich) a 9%, e as amostras foram aquecidas a 95

ºC por 45 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices) a 540 nm. A atividade de arginase nas amostras foi estimada pela concentração final de ureia produzida a partir da metabolição de L-arginina, comparando as absorbâncias de cada poço às obtidas em curva padrão de diluição seriada de concentrações conhecidas de ureia (1 mM – 1000 mM) através do programa SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

6.1.4.9 Dosagem de óxido nítrico

Com o mesmo sobrenadante advindo do processamento para os dois ensaios anteriores, foi feita a determinação indireta de óxido nítrico pela concentração nitrito nas amostras. O ensaio colorimétrico foi realizado por meio da reação de Griess (Tsikas 2007). Em placas de 96 poços (Sarstedt), 50 µl da amostra foram plaqueados, e foram adicionados outros 50 µl de reagente de Griess (sulfanilamida 1%, N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1% e H_3PO_4 2,5%). Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices) em comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito foi obtida comparando a absorbância de cada amostra com uma curva padrão de diluições seriadas de concentrações conhecidas de $NaNO_3$ (1 µM – 1000 µM) utilizando o programa SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

6.1.4.10 Cultura de células de linfonodo poplíteo

O linfonodo poplíteo direito dos animais dos grupos monoinfectado com *L. amazonensis* e coinfectado foi coletado e macerado entre lâminas de vidro foscas. Foi feita a passagem do material macerado por peneira com abertura de 40 µm e lavagem com RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) contendo 15 mM de Hepes (Gibco™, ThermoFisher Scientific Inc.), 24 mM de $NaHCO_3$, 60 µg/ml de gentamicina (Gentatec®, Chemitec Agro-Veterinária Ltda., São Paulo, SP, Brasil), 100 U/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B (Gibco™, ThermoFisher Scientific Inc.). Após centrifugação a 300 g por 10 min a 4 ºC, o sedimento foi ressuspendido em RPMI 1640 completo (Sigma-Aldrich), contendo 15 mM de Hepes (Gibco™, ThermoFisher Scientific Inc.), 24 mM de $NaHCO_3$, 60 µg/ml de gentamicina (Gentatec®, Chemitec), 100 U/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de

anfotericina B (Gibco™, ThermoFisher Scientific Inc.) e 10% de SBF (LGC Biotecnologia). Uma amostra foi, então, retirada para contagem e análise de viabilidade em câmara de Neubauer.

A densidade das células foi ajustada para 10^5 células/ml, sendo plaqueada em placas de 96 poços a quantidade de 10^4 células num volume de 100 µl por poço. Parte dos poços recebeu mais 100 µl de RPMI completo, enquanto, para estimulação das células, alguns poços receberam 100 µl de RPMI completo também contendo SLA na concentração de 10 µg/ml, sendo a estimulação realizada na concentração final de 5 µg/ml de antígeno. As células foram mantidas em cultura por 48 horas, e o sobrenadante foi recolhido para dosagem de citocinas e quimiocinas. Foram utilizados kits de ELISA comercialmente disponíveis (DuoSet, R&D Systems) para a dosagem de IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-22, CCL17, IFN-γ, TGF-β e TNF-α, conforme descrito anteriormente.

6.1.5 Transferência de macrófagos

Para de averiguar mais a fundo a importância *in vivo* dos macrófagos na coinfecção *Schistosoma-Leishmania*, também serão realizados experimentos de transferência destas células, com base no descrito por Tomiotto-Pellissier et al. (2021) com algumas modificações. O delineamento experimental está ilustrado na figura 20.

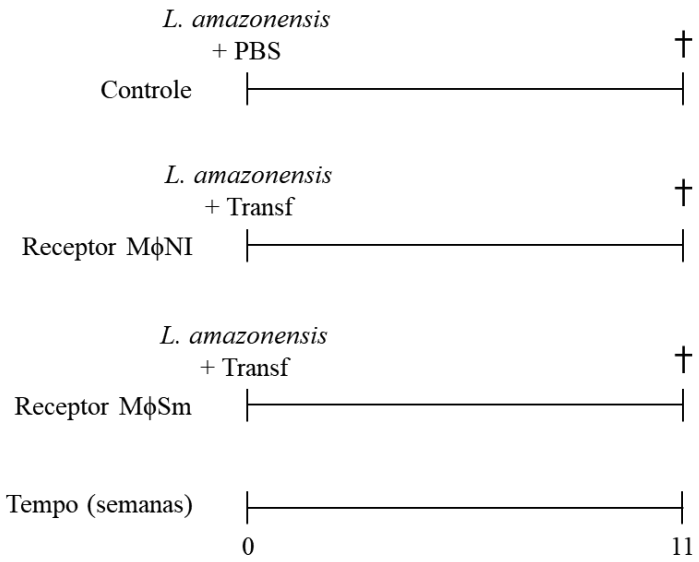


Figura 20. Delineamento experimental para transferência de macrófagos peritoneais de doadores infectados ou não com *S. mansoni* para animais infectados com *L. amazonensis*. PBS: salina com tampão fosfato. Transf: transferência. MϕNI: macrófagos de doadores não infectados. MϕSm: macrófagos de doadores com 8 semanas de infecção por *S. mansoni.* †: eutanásia. Fonte: elaborado pelo autor.

Para acompanhamento, os camundongos receptores de macrófagos (BALB/c fêmeas de 8 semanas de idade) foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária na pata direita conforme descrito anteriormente. Esses animais, 5 por grupo, foram divididos aleatoriamente em três grupos: um grupo controle, que não recebeu macrófagos; um grupo que recebeu macrófagos de animais não infectados (MϕNI), e um grupo que recebeu macrófagos de animais infectados com *S. mansoni* (MϕSm).

A recuperação de células do infiltrado peritoneal foi feita a partir de 5 fêmeas de camundongos BALB/c sadias ou após 8 semanas de infecção com 50 cercárias de *S. mansoni*, denominadas doadoras. Brevemente, PBS contendo 3% de SBF (LGC Biotecnologia) a 4 ºC foi injetado na cavidade peritoneal após eutanásia, e, após massagem, o líquido contendo células peritoneais foi recuperado (Layoun et al. 2015). Foi feito um pool de células, as quais foram mantidas em placa de Petri, $7x10^5$ células/ml, a 37 ºC, 5% de CO_2 por 2 horas. As células não aderidas foram descartadas, enquanto as aderidas foram destacadas da placa com tripsina 0,5% (Gibco™), lavadas e ressuspendidas em PBS estéril. Após recuperação e lavagem das células aderidas, um total de 5 x 10^5 células em 200 µl de PBS estéril foi transferido para os camundongos receptores por via intraperitoneal na semana 0 do protocolo experimental. No grupo controle que não recebeu doação de células, foi realizada uma injeção intraperitoneal de

200 µl de PBS estéril no mesmo período. Os animais foram acompanhados para medição de incremento de lesão, e a eutanásia ocorreu na 11ª semana do protocolo experimental.

6.1.6 Análise estatística

A análise estatística e gráficos foram montados utilizando o programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, Boston, MA, EUA). Para análise da curva de sobrevivência, foi utilizada a estimativa de Kaplan-Meier, seguida pelo pós-teste de Log-rank (Mantel-Cox). Todos os dados de variáveis contínuas foram submetidos a teste ROUT para identificação de *outliers*, e a normalidade da sua distribuição foi determinada pelo teste Shapiro-Wilk. Para comparação entre dois grupos, foram utilizados os testes t de Student não pareado quando os grupos apresentavam distribuição paramétrica (com correção de Welch quando os desvios padrões dos grupos foram diferentes), e Mann-Whitney quando pelo menos um grupo tinha distribuição não-paramétrica. Para comparação entre três ou mais grupos, o teste One-way ANOVA com pós-teste de Boferroni foi utilizado quando todos os grupos apresentavam distribuição paramétrica, enquanto o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn de múltiplas comparações quando pelo menos um dos grupos não apresentava distribuição paramétrica. Para analisar variáveis impactadas por dois fatores independentes, foi utilizado o teste Two-way ANOVA. Valores de p foram atribuídos, e foram consideradas diferenças com os valores de $p < 0,05$ como significativas.

6.2 Resultados – Capítulo 2

6.2.1 A coinfecção *S. mansoni*-*L. amazonensis* acentua doença hepática na esquistossomose

Nossos dados demonstraram que camundongos não infectados ou monoinfectados com *L. amazonensis* não apresentaram mortalidade durante o período analisado. Somente camundongos dos grupos monoinfectados com *S. mansoni* e coinfectados apresentaram mortes no decorrer das 18 semanas do protocolo experimental, sendo que a taxa de mortalidade dos monoinfectados por *S. mansoni* foi de 30%, enquanto a dos coinfectados com *L. amazonensis*

e *S. mansoni* foi de 20%, não sendo observado alterações significativas neste parâmetro entre estes grupos experimentais (p = 0,0985, figura 21A). Apesar de não ocorrerem alterações significativas na variação de peso dos animais nos diferentes grupos experimentais entre a 8ª e a 18ª semana de experimento (figura 21B), foi possível verificar que os animais do grupo monoinfectado com *L. amazonensis* sempre tiveram variação positiva e progressiva de peso no período avaliado, enquanto que, nos animais monoinfectados por *S. mansoni* e nos coinfectados, não houve diferença significativa do peso em relação à 8ª semana, sendo observada variação de peso negativa em alguns períodos.

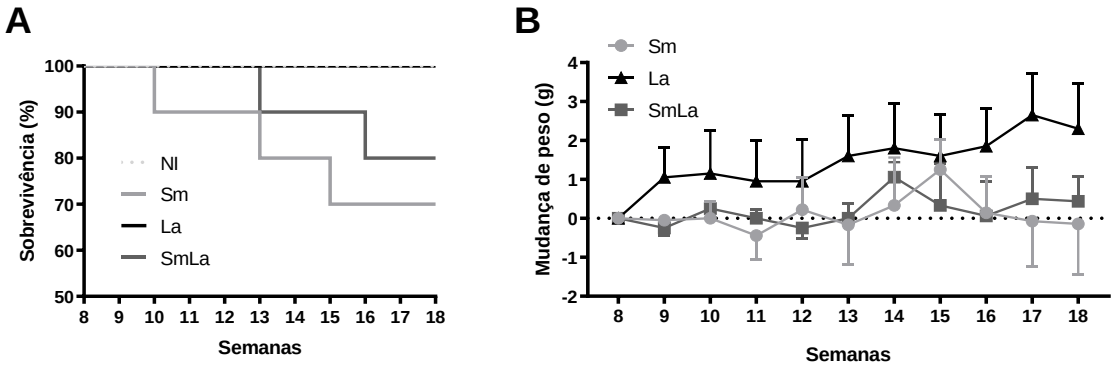


Figura 21. Curva de mortalidade e variação do peso de camundongos BALB/c no decorrer da infecção e coinfecção por *S. mansoni* e *L. amazonensis.* (A) Curva de sobrevivência. Inicialmente, n = 10 (B) Alteração de peso. A linha tracejada indica não alteração no peso. NI: não infectado. Sm: monoinfectado com *S. mansoni*. La: monoinfectado com *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Cada ponto experimental representa a média ± erro padrão da média com n = 7-10 animais/grupo (B). Inferências estatísticas baseadas em resultados de Kaplan-Meier (A) e Two-way ANOVA (B). Fonte: elaborado pelo autor.

Quanto à carga parasitária de *S. mansoni*, apesar de o número de vermes recuperados da circulação de camundongos coinfectados ser menor do que em camundongos monoinfectados por *S. mansoni* (figura 22A), não houve diferença significativa na recuperação de helmintos adultos. O mesmo se repetiu para a contagem somente de machos (figura 22B) ou de fêmeas (figura 22C). Também não houve diferença significativa na estimativa de ovos retidos no fígado entre os animais monoinfectados por *S. mansoni* e os coinfectados por *L. amazonensis* (figura 22D).

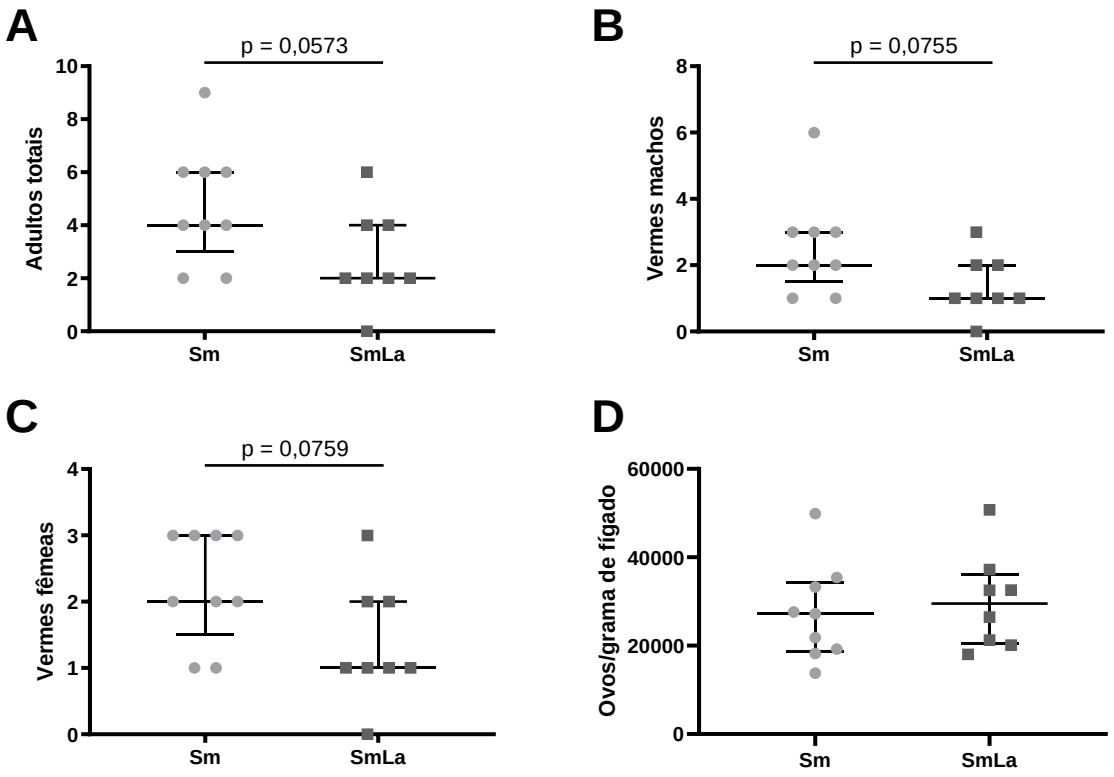


Figura 22. Carga parasitária de *S. mansoni* em camundongos BALB/c monoinfectados por *S. mansoni* ou coinfectados por *S. mansoni* e *L. amazonensis*. (A) Número total de vermes adultos. (B) Número de machos adultos. (C) Número de fêmeas adultas. (D) Número de ovos retidos no fígado. Sm: monoinfectado por *S. mansoni*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Dados compilados de dois experimentos independentes e representados como valores individuais, mediana e intervalo interquartil. Inferências estatísticas baseadas em resultados de teste t de Welch (A, D) ou Mann-Whitney (B, C). Fonte: elaborado pelo autor.

Partindo para análise de órgãos internos, foi possível observar que, os baços (figura 23A) e os fígados (figura 23B) dos animais monoinfectados com *L. amazonensis* tiveram peso proporcional similar aos dos animais não infectados. Em contraste, camundongos do grupo monoinfectado com *S. mansoni* mostraram aumento significativo desses órgãos em relação aos não infectados, sendo que, no caso do baço, a coinfecção por *L. amazonensis* não alterou significativamente o aumento provocado pela esquistossomose experimental. Porém, apesar do aspecto macroscópico similar entre os grupos infectados com *S. mansoni*, com cor acinzentada, firme ao toque e focos brancos milimétricos multifocais pelo parênquima hepático, os fígados dos animais coinfectados tiveram peso significativamente maior do que nos outros três grupos (figura 23 B), inclusive em comparação aos monoinfectados com *S. mansoni* ($p < 0,0001$ para não infectado e monoinfectado com *L. amazonensis*, $p = 0,0008$ para monoinfectado com *S. mansoni*).

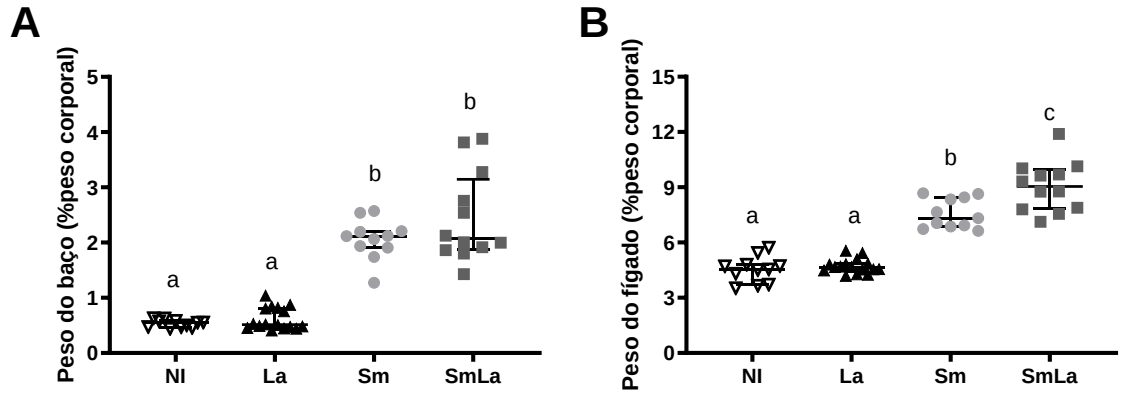


Figura 23. Peso relativo de baço (A) e fígado (B) em camundongos BALB/c não infectados, monoinfectados com *S. mansoni* ou *L. amazonensis*, ou coinfectados. NI: não infectado. Sm: monoinfectado com *S. mansoni*. La: monoinfectado com *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Dados de três experimentos independentes, mediana e intervalo interquartil. Inferências estatísticas baseadas em resultados de Kruskal-Wallis (A) e One-way ANOVA (B). Letras diferentes entre grupos indicam diferenças estatísticas. Fonte: elaborado pelo autor.

A partir do soro dos animais experimentais, foram realizados testes bioquímicos para análise de função hepática (figura 24). Não houve diferença significativa nos níveis séricos de albumina (figura 24A), de proteína C-reativa (figura 24B) e de atividade de ALT (figura 24D). Por outro lado, houve aumento significativo na atividade de AST no soro de animais coinfectados em comparação a todos os outros grupos (figura 24C), o que se refletiu também na razão AST/ALT (figura 24E). Já atividade de GGT (figura 24F) se apresentou elevada no soro de animais coinfectados em relação aos monoinfectados por *S. mansoni* ($p = 0,0113$), mas ambos os grupos apresentaram atividades similares às do controle não infectado e do monoinfectado com *L. amazonensis*.

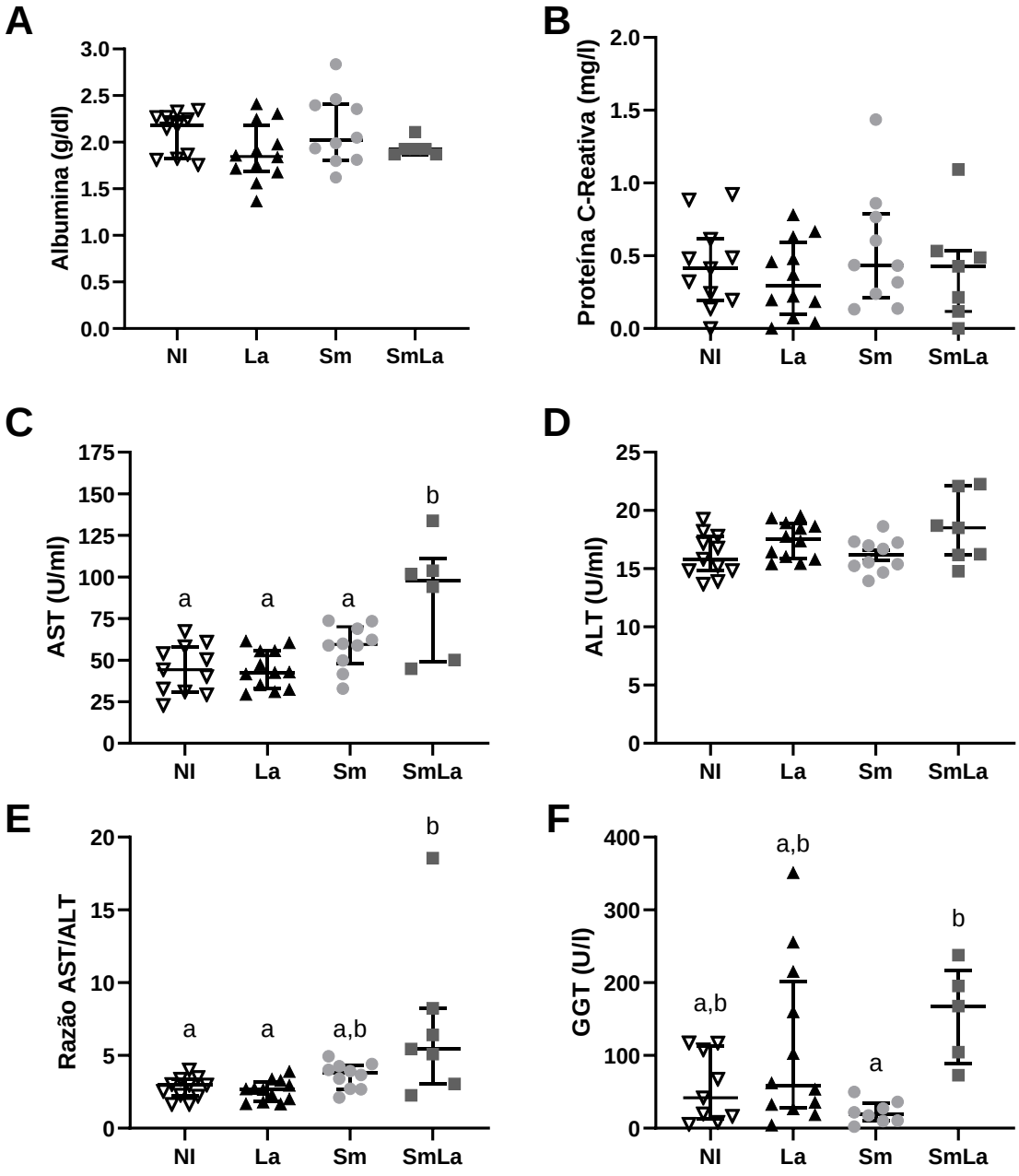


Figura 24. Análise sérica de função hepática em camundongos BALB/c não infectados, monoinfectados com *S. mansoni*, monoinfectados com *L. amazonensis* ou coinfectados. (A) Albumina sérica. (B) Proteína c-reativa sérica. (C) Atividade sérica de aspartato aminotransferase – AST. (D) Atividade sérica de alanina aminotransferase - ALT. (E) Razão entre AST/ALT. (F) Atividade sérica de gama-glutamiltransferase – GGT. NI: não infectado. La: monoinfectado por *L. amazonensis*. Sm: monoinfectado por *S. mansoni*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Dados compilados de dois experimentos independentes e representados como valores individuais e média ± erro padrão da média. Inferências estatísticas baseadas em resultados de One-way ANOVA (B, C, D) ou Kruskal-Wallis (A, E, F). Letras diferentes entre grupos indicam diferenças estatísticas. Fonte: elaborado pelo autor.

A análise histopatológica (figura 25) revelou alterações hepáticas decorrentes da infecção ou coinfecção por *S. mansoni*. Em ambos os grupos experimentais, foi possível verificar a presença de ovos de *S. mansoni*, íntegros ou em processo de degeneração, cercado por reação celular com deposição de matriz extracelular característica de granuloma esquistossomótico. De forma expressiva, houve importante perda de parênquima nos dois grupos infectados por *S. mansoni* devido à presença de ovos e à reação inflamatória associada. Um grande número de granulomas multifocais e coalescentes associados aos ovos foi observado em diferentes fases de desenvolvimento. Também foi possível observar depósitos de hemossiderina, regiões de dilatação de sinusoides, congestão de vasos sanguíneos com perivasculite e áreas de inflamação ao longo do parênquima hepático, geralmente associada com hiperplasia de ductos biliares em ambos os grupos experimentais; entretanto, a distribuição das lesões foi maior nos animais coinfectados (figura 25B). Apesar das lesões histológicas, ainda foi possível verificar regiões com parênquima hepático integro e cordões de hepatócitos relativamente bem preservados, especialmente nos animais monoinfectados por *S. mansoni* (figura 25A).

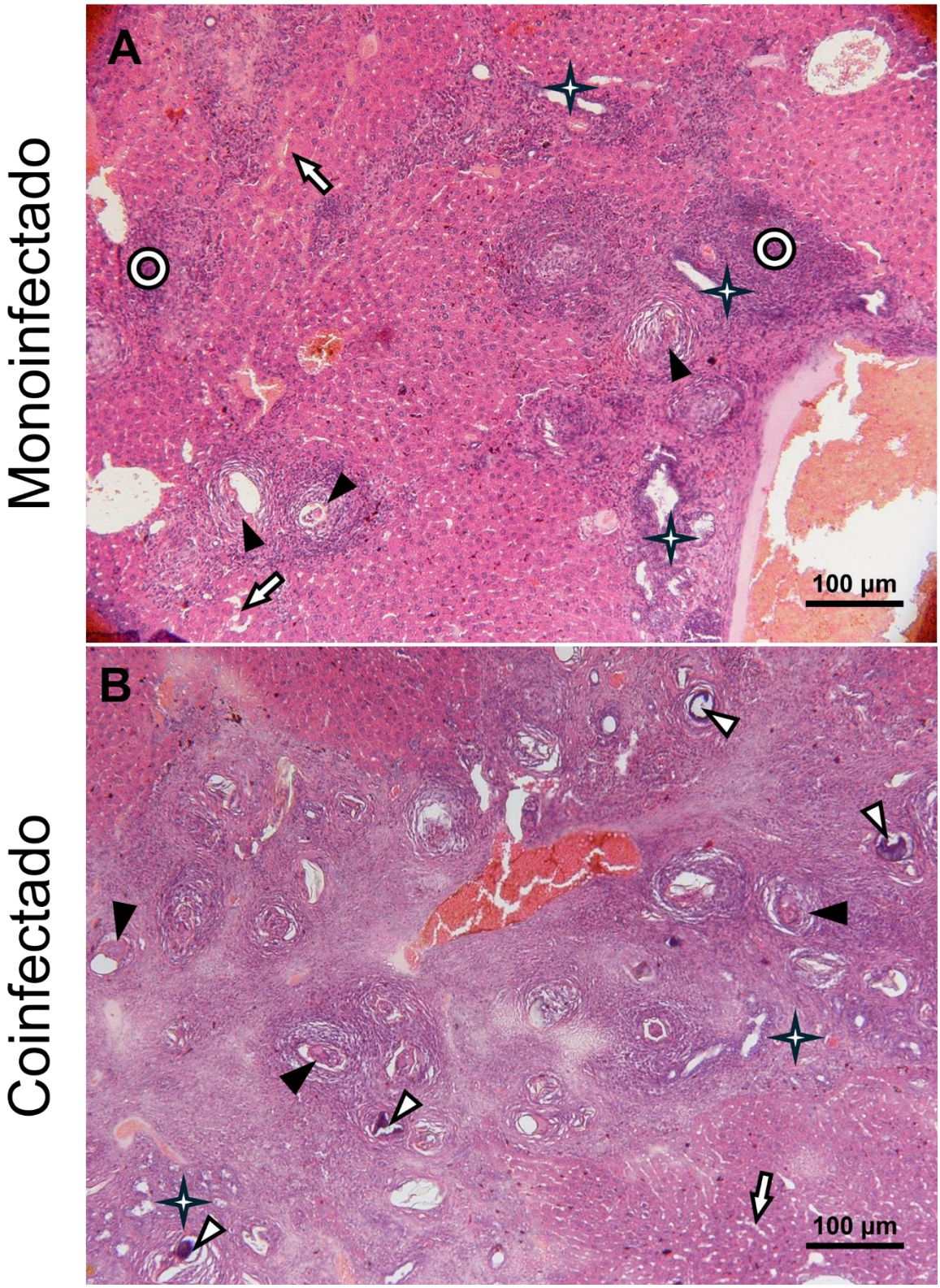


Figura 25. Aspecto histopatológico geral do fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* coinfectados ou não com *L. amazonensis*. Cortes histológicos de fígados de camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni* (A, C) ou coinfectados com *S. mansoni* e *L. amazonensis* (B, D) corados com hematoxilina e eosina. Cabeça de seta preta: ovos viáveis com miracídios íntegros e reação granulomatosa circundante. Cabeça de seta branca: ovos calcificados com reação granulomatosa periovular. Seta: dilatação sinusoidal. Círculo: infiltrado inflamatório não associado a granuloma. Estrela de quatro pontas: hiperplasia de ductos biliares. Fonte: elaborado pelo autor.

Conforme ilustrado na figura 26, é possível ver diferenças nos granulomas na fase produtiva/exsudativa com presença de ovos viáveis circundados por um infiltrado inflamatório com deposição de matriz extracelular tanto no fígado de animais do grupo monoinfectado com *S. mansoni* como no de coinfectados com *S. mansoni* e *L. amazonensis* (figura 26A e 26B, respectivamente). Também é observado um número considerável de ovos calcificados, os quais se encontravam circunscritos por granulomas produtivos ou envoltos por cicatriz fibrótica, pouco celularizados e com fibras colágenas de disposição concêntrica, presentes especialmente nos animais coinfectados (figura 26B). Os granulomas hepáticos no grupo coinfectado também apresentaram uma celularidade relativamente maior do que no grupo monoinfectado por *S. mansoni*, com menor deposição de matriz extracelular e sem uma organização concêntrica (figura 26B), geralmente observada nos granulomas de animais monoinfectados pelo trematódeo (figura 26A)

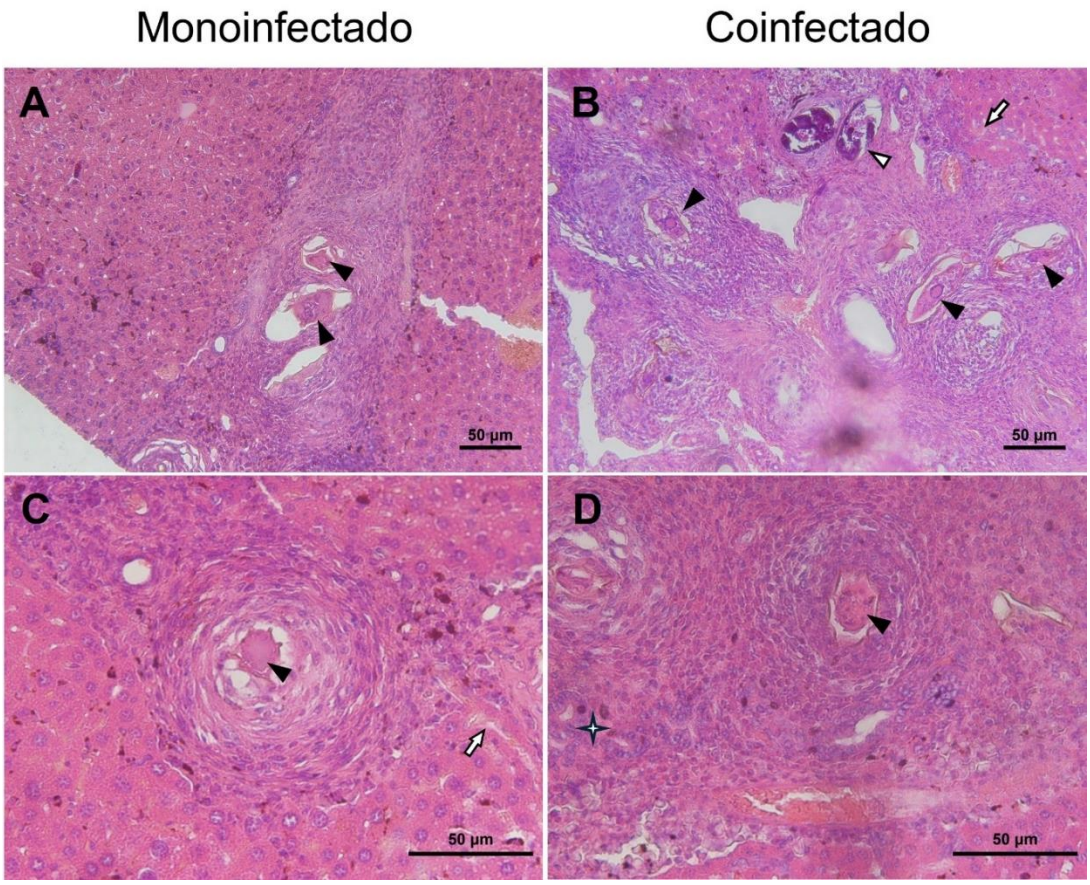


Figura 26. Análise histopatológica de granulomas esquistossomóticos em fígado de camundongos BALB/c coinfectados ou não com *L. amazonensis*. Cortes histológicos de camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni* (A, C) ou coinfectados com *S. mansoni* e *L. amazonensis* (B, D) corados com hematoxilina e eosina. Cabeça de seta preta: ovos viáveis com miracídios íntegro e reação granulomatosa circundante. Cabeça de seta branca: ovos calcificados com reação granulomatosa periovular. Seta: dilatação sinusoidal. Estrela de quatro pontas: hiperplasia de ductos biliares. Fonte: elaborado pelo autor.

Outras alterações encontradas no fígado dos animais coinfectados estão ilustradas na figura 27. Nestes animais foram observadas algumas regiões de hepatócitos vacuolizados (figura 27A, B), com citoplasma de aspecto rendilhado e núcleo central, indicativos de degeneração hidrópica. Em um dos animais coinfectados, também foi possível observar um granuloma exsudativo perivascular comprimindo a parede de um vaso (figura 27D), além de um ovo no lúmen de um vaso formando um trombo, com deposição de fibrina e leucócitos associados (figura 27C). Portanto, a coinfecção com *L. amazonensis* durante a oitava semana de infecção por *S. mansoni* foi capaz de intensificar a doença hepática da esquistossomose crônica, intensificando a inflamação e os processos degenerativos, com consequente aumento mais pronunciado do órgão.

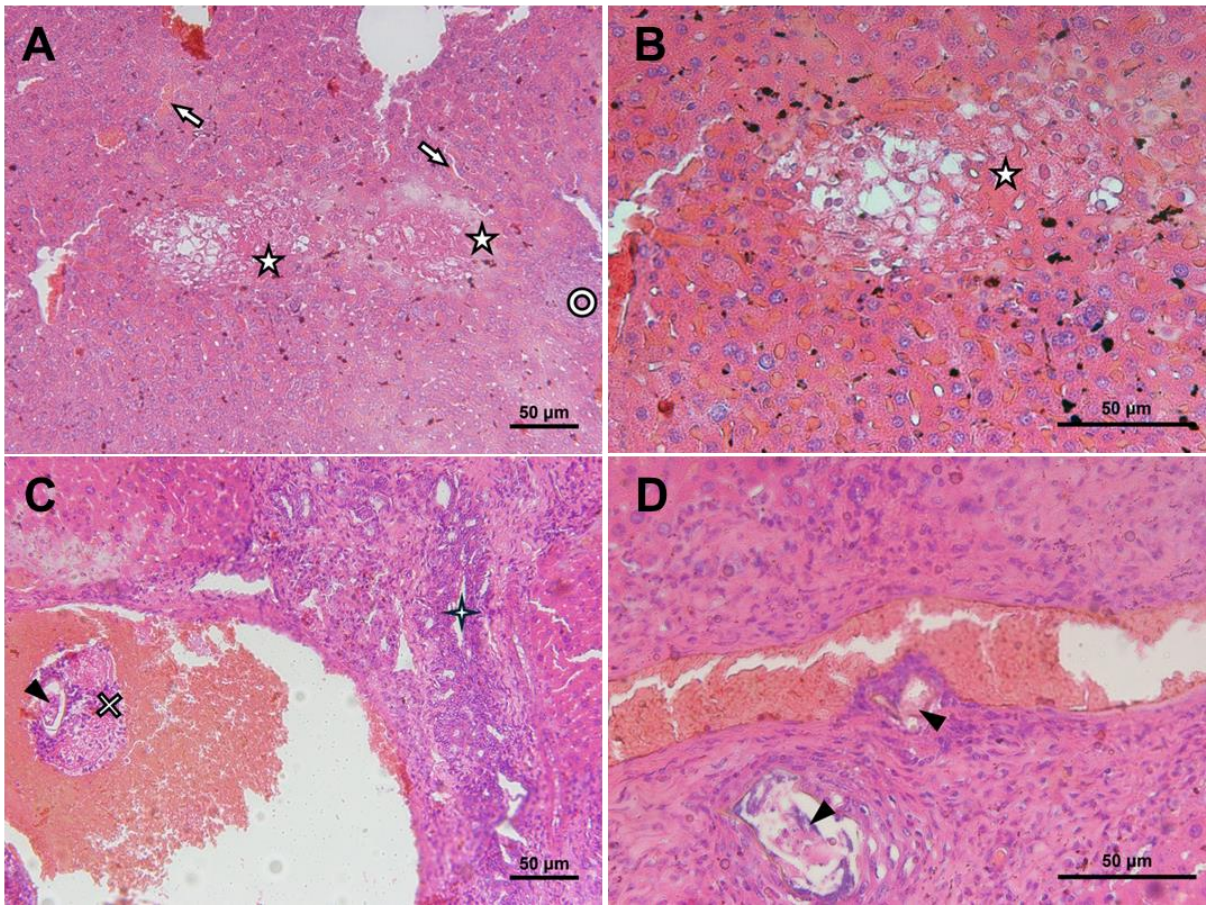


Figura 27. Achados histopatológicos no fígado de camundongos BALB/c coinfectados com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Cortes histológicos do fígado de camundongos BALB/c coinfectados com *S. mansoni* e *L. amazonensis* corados com hematoxilina e eosina. Hepatócitos vacuolizados (A, B). Ovo em trombo no interior de vaso congesto (C). Granuloma exsudativo reduzindo a luz de um vaso (D). Seta: dilatação sinusoidal. Círculo: infiltrado inflamatório não associado a granuloma. Estrela de quatro pontas: ductos biliares. Cabeça de seta preta: ovos. X: trombo. Estrela de cinco pontas: região de hepatócitos vacuolizados. Fonte: elaborado pelo autor.

6.2.2 A infecção prévia por *S. mansoni* altera o microambiente imunopatológico no sítio de infecção por *L. amazonensis*

Todos os animais infectados com *L. amazonensis*, seja no grupo monoinfectado ou coinfectado, apresentaram lesões tegumentares de aparência típica na forma de pododermatite ulcerativa com aumento da espessura da pata infectada, descamação de pele e ulceração. Contudo, nos camundongos coinfectados, alterações marcantes foram vistas em relação à patogênese induzida por *L. amazonensis*.

Durante o acompanhamento semanal (figura 28), as lesões cutâneas no grupo monoinfectado com *L. amazonensis* começaram a aparecer a partir da 5ª semana de infecção por *L. amazonensis* (semana 13 do protocolo experimental), enquanto o incremento de lesão nos animais do grupo coinfectado foi significativamente maior que no início do experimento somente a partir da 9ª semana de infecção por *L. amazonensis*, que corresponde à 17ª semana do início do protocolo experimental. Além disso, entre a 16ª e 18ª semana do protocolo experimental, o incremento de lesão dos animais monoinfectados com *L. amazonensis* foi maior do que no dos animais coinfectados. Não houve, contudo, alteração na frequência de ulceração das patas e não foram detectadas lesões fora do sítio de inoculação. Logo, a infecção prévia por *S. mansoni* foi capaz de alterar a cinética do crescimento de lesão de pata causado por *L. amazonensis*, provocando aparecimento tardio e menor crescimento.

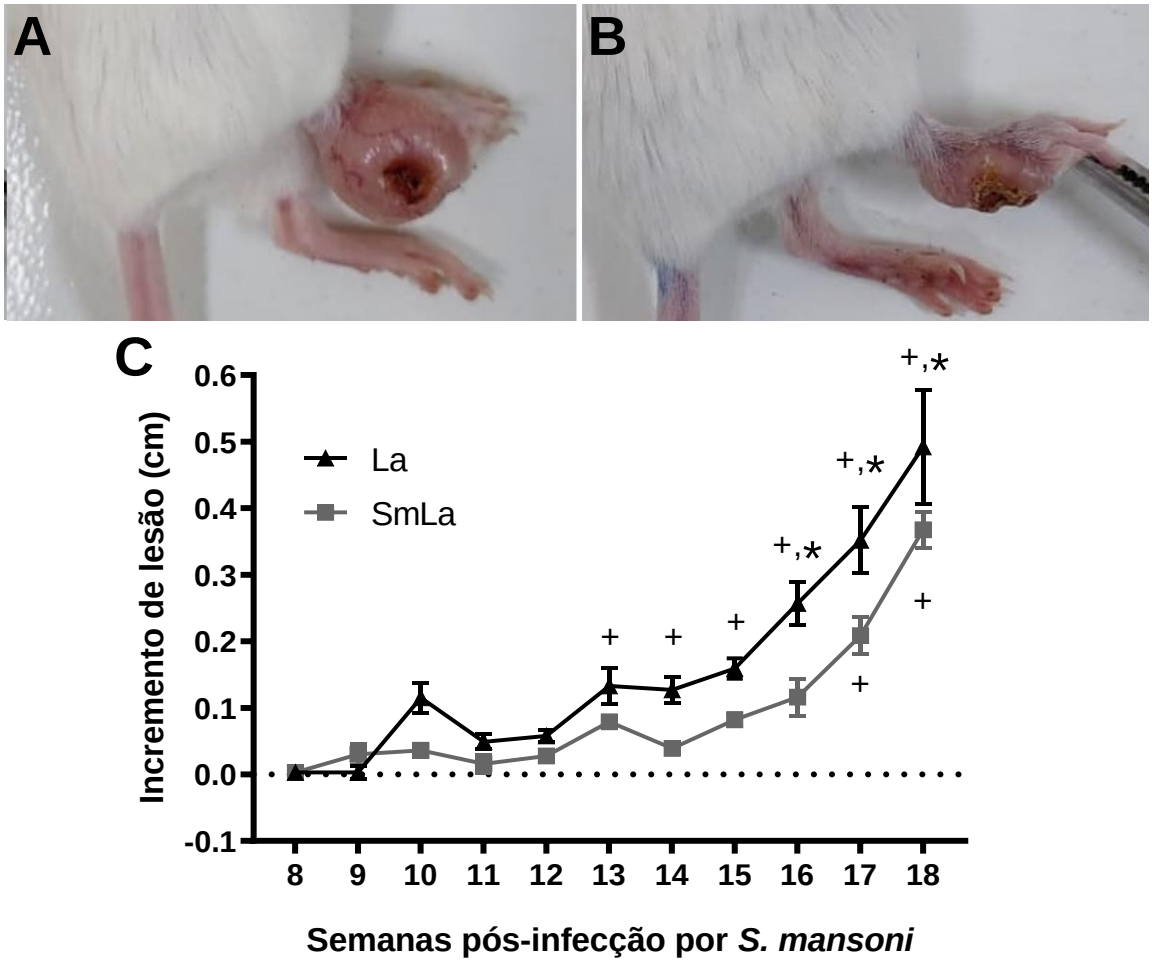


Figura 28. Características macroscópicas da pododermatite ulcerativa induzida pela infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c previamente infectados por *S. mansoni* ou não. (A) Lesão provocada em animais monoinfectados após 10 semanas de infecção por *L. amazonensis*. (B) Lesão provocada em animais coinfectados após 18 semanas de infecção por *S. mansoni* e 10 semanas de coinfecção por *L. amazonensis*. (C) Cinética de crescimento de lesão. A linha pontilhada representa diferença entre as espessuras da pata direita e esquerda na 8ª semana do protocolo experimental, antes da infecção por *L. amazonensis*. La: monoinfectado com *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Dados de um experimento (n = 10) representados como média ± erro padrão da média. Inferências estatísticas baseadas em resultados de Two-way ANOVA. $^{+}$ representa diferenças em relação à semana 8 pós-infecção por *S. mansoni* ($^{+}p < 0,05$). * representa diferenças entre grupos em um mesmo ponto no tempo ($^{*}p < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

Já a carga parasitária de *L. amazonensis*, estimada por diluição limitante, apresentou diferença bastante expressiva entre os grupos (figura 29). Em média, a quantidade de parasitos por grama de pata em animais coinfectados, depois de 10 semanas de coinfecção, foi 19,23 vezes maior do que em animais monoinfectados por *L. amazonensis*.

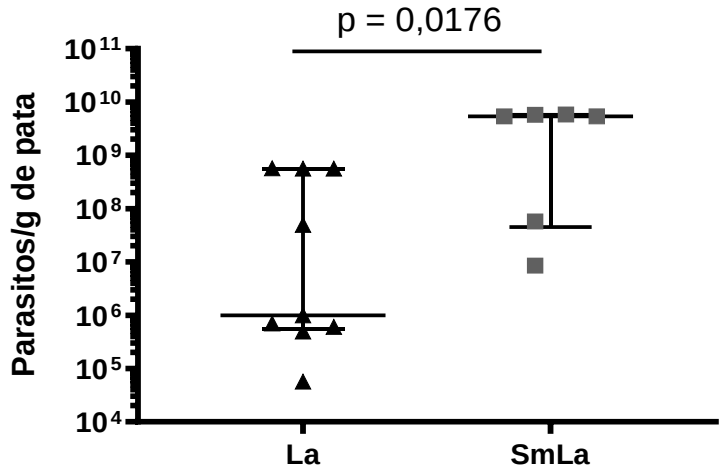


Figura 29. Carga parasitária na pata de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* coinfectados ou não com *S. mansoni*. La: monoinfectado com *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *L. amazonensis* e *S. mansoni*. Dado de um experimento e representados como valores individuais com média ± erro padrão da média. Inferência estatística baseada em resultado de teste Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor.

Como a formação de lesão e proliferação de *L. amazonensis* são ambas intrinsecamente ligadas à resposta imune do hospedeiro (Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017), foram analisados parâmetros imunológicos que pudessem justificar os fenótipos observados. As concentrações de nitrito em pata, indicativo indireto de produção de óxido nítrico, ficaram abaixo do nível de detecção nos grupos analisados (dados não mostrados). Ademais, não houve diferença na atividade de arginase (figura 30A), nem na atividade de NAG (figura 30B), EPO (figura 30C) ou MPO (figura 30D) nas patas de animais monoinfectados com *L. amazonensis* e coinfectados no período examinado, ou seja, ao final do protocolo experimental, com 18 semanas de infecção por *S. mansoni*, sendo as 10 últimas com coinfecção por *L. amazonensis*.

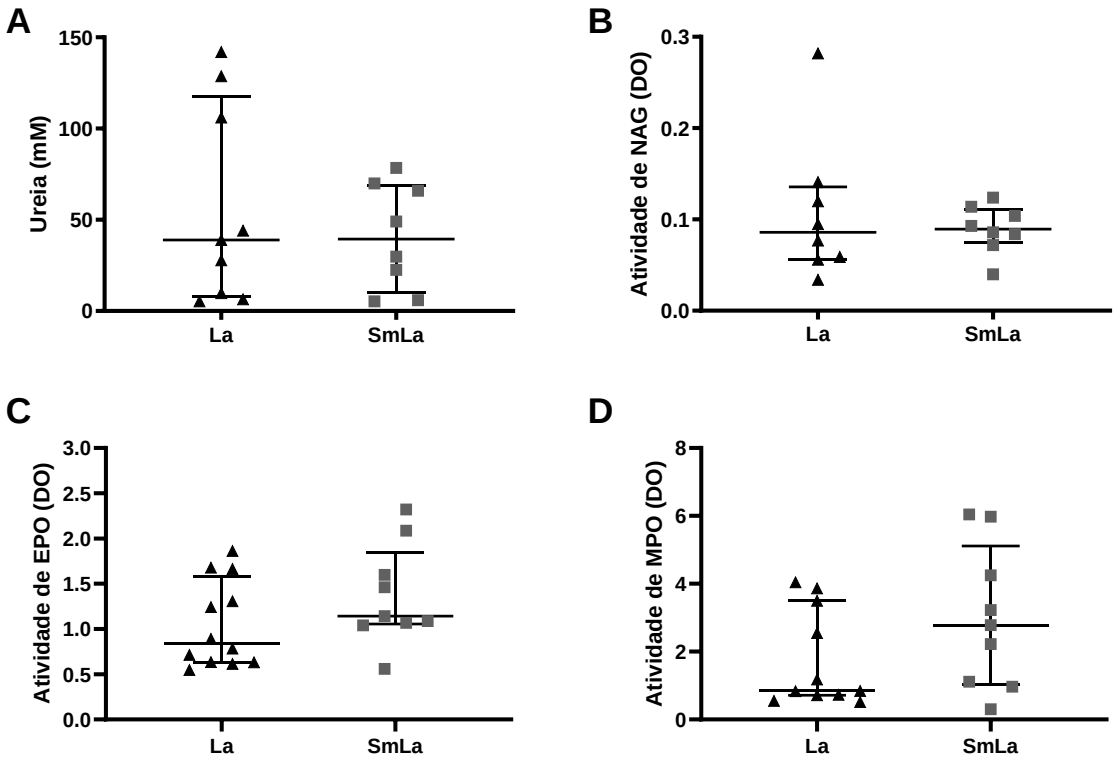


Figura 30. Atividade enzimática em homogenato de pata de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni*. (A) Atividade de arginase. (B) Atividade de N-acetilglicosaminidase. (C) Atividade de peroxidase eosinofílica. (D) Atividade de mieloperoxidase. NAG: N-acetilglicosaminidase. EPO: peroxidase eosinofílica. MPO: mieloperoxidase. DO: densidade óptica. La: monoinfectado por *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Dados de dois experimentos isolados apresentados como valores individuais, mediana e intervalo interquartil. Inferências estatísticas baseadas em resultados de teste t de Welch (A, B) ou Mann-Whitney (C, D). Fonte: elaborado pelo autor.

Também foi realizada a dosagem de citocinas no homogenato de pata e no sobrenadante de cultura de células isoladas de linfonodo poplíteo dos animais monoinfectados com *L. amazonensis* e dos coinfectados. A concentração das citocinas características de ambientes inflamatórios do tipo 1 (figura 31), incluindo IFN-γ, TNF-α e IL-6 no homogenato de pata ou no sobrenadante de cultura não apresentaram diferenças significativas entre os animais monoinfectados ou coinfectados. Apesar das concentrações de IL-12p70 também não terem apresentado diferença nas patas (figura 31E), a estimulação com antígeno de *L. amazonensis* foi capaz de aumentar significativamente a sua produção somente em células de linfonodo poplíteo de animais coinfectados (figura 31F).

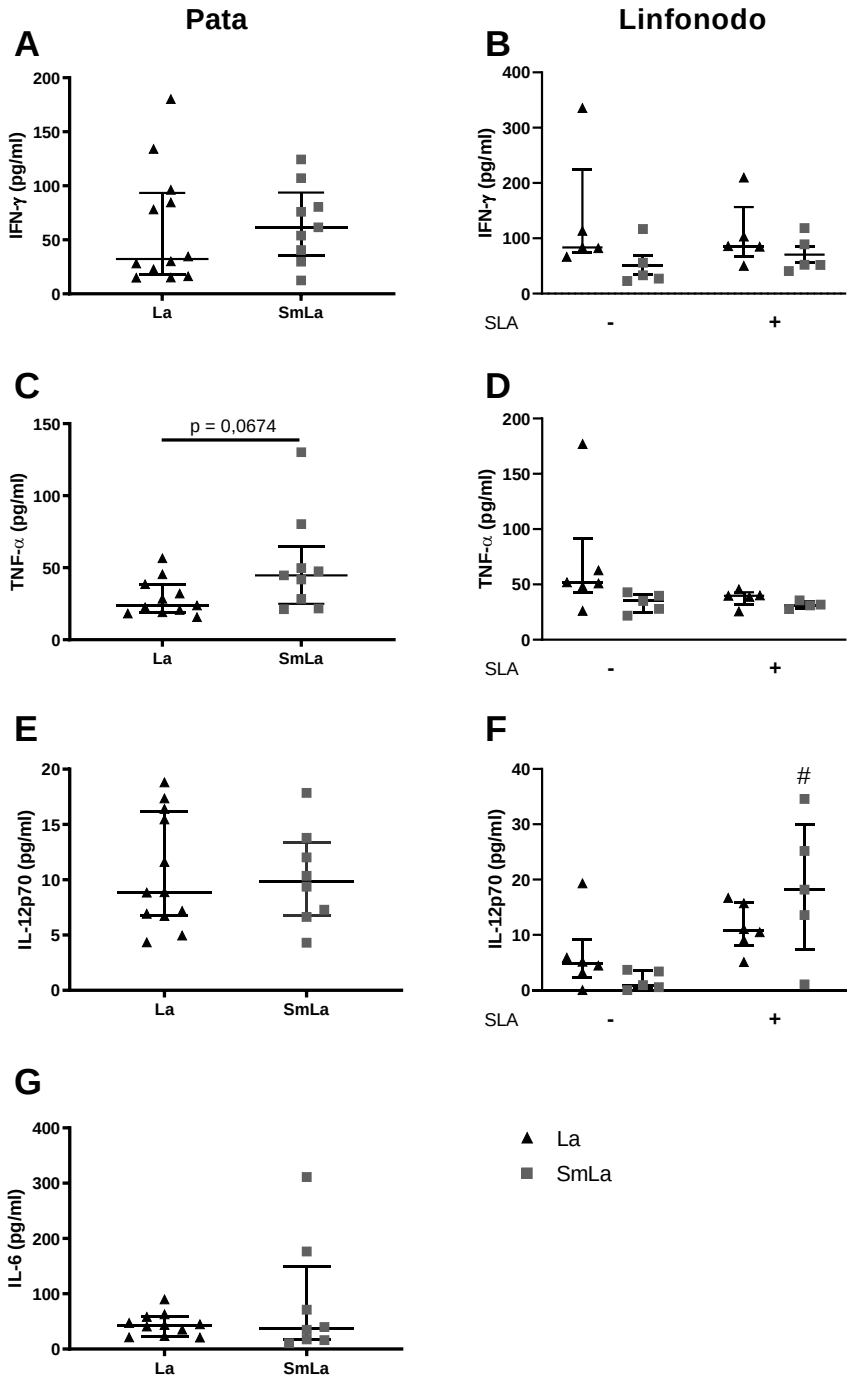


Figura 31. Concentrações de citocinas de perfil tipo 1 em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não *S. mansoni*. IFN-γ em pata (A) e linfonodo poplíteo (B). TNF-α em pata (C) e linfonodo poplíteo (D). IL-12p70 em pata (E) e linfonodo poplíteo (F). IL-6 em pata (G). La: monoinfectado por *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. SLA: antígeno solúvel de *L. amazonensis*. Dados de um (B, D, F) ou dois (A, C, E, G) experimentos isolados e apresentados como valores individuais, mediana e intervalo interquartil. Inferências estatísticas baseadas em resultados de teste t de Welch (E), Mann-Whitney (A, C, G) e Kruskal-Wallis (B, D, F). $^{\#}$ simboliza diferença significativa entre produção basal e estimulada por SLA em um mesmo grupo ($^{\#}p = 0,0225$). Fonte: elaborado pelo autor.

Quando foram analisadas as citocinas de perfil tipo 2 no homogenato de pata e sobrenadante de cultura de linfonodos (figura 32), não foram observadas diferenças nas concentrações de IL-4, IL-13 e IL-33 nos diferentes grupos experimentais, tanto no homogenato de patas quanto na cultura de linfonodos poplíteos. Porém, houve aumento significativo nas concentrações de IL-5 nos animais coinfectados em relação aos monoinfectados. Os níveis dessa citocina foram quase 30% maiores nas patas (figura 32C) e duas vezes maiores em sobrenadante de cultura de linfonodo poplíteo (figura 32D) de animais coinfectados quando comparados aos monoinfectados por *L. amazonensis*; entretanto, essa diferença desaparece quando as células foram estimuladas com SLA.

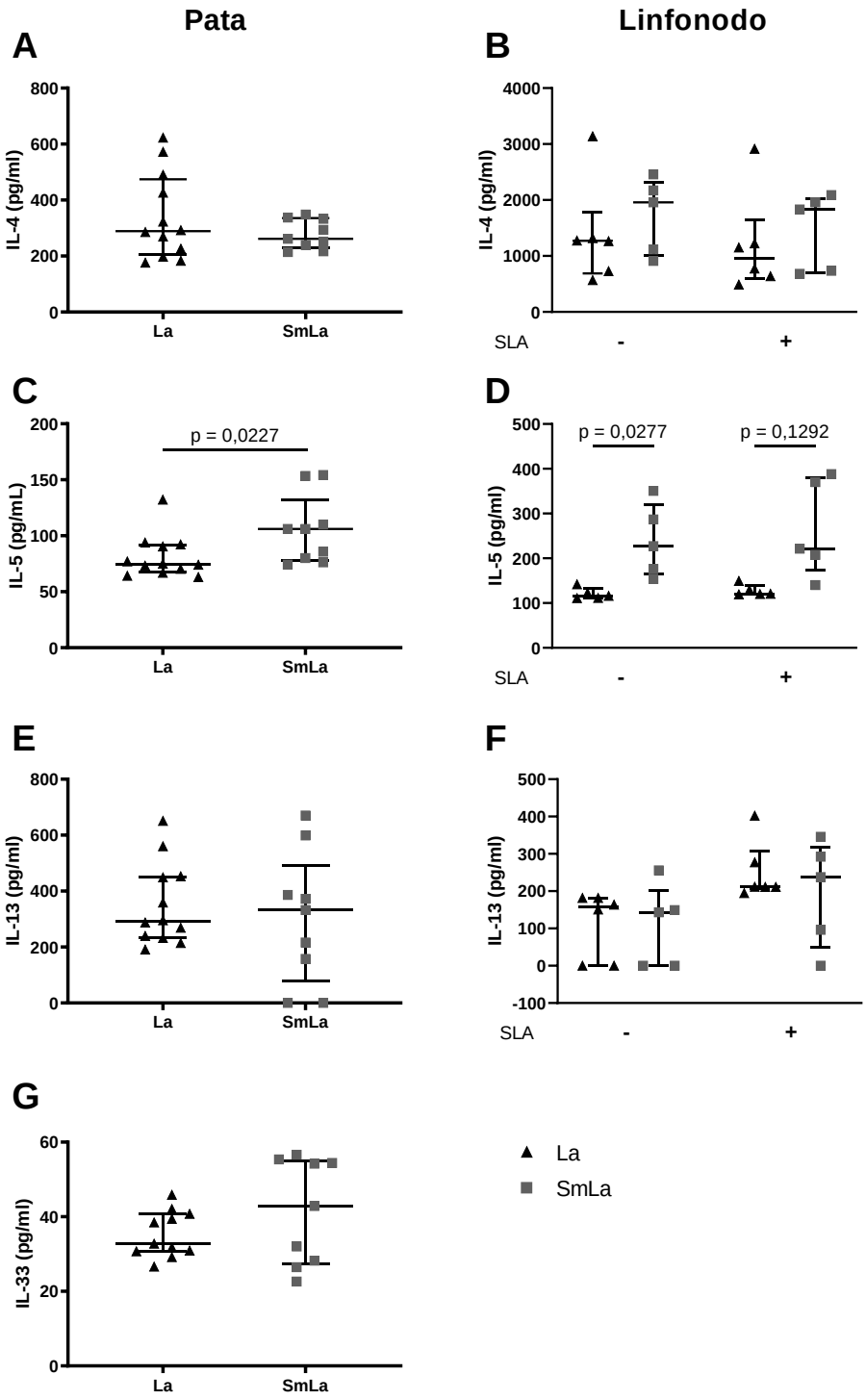


Figura 32. Concentrações de citocinas de perfil tipo 2 em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni*. IL-4 em pata (A) e linfonodo poplíteo (B). IL-5 em pata (C) e linfonodo poplíteo (D). IL-13 em pata (E) e linfonodo poplíteo (F). IL-33 em pata (G). La: monoinfectado por *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. SLA: antígeno solúvel de *L. amazonensis*. Dados de um (B, D, F) ou dois experimentos independentes (A, C, E, G) e apresentados como valores individuais, mediana e intervalo interquartil. Inferências estatísticas baseadas em resultados de teste t de Welch (A, E, G), Mann-Whitney (C) ou Kruskal-Wallis (B, D, F). Fonte: elaborado pelo autor.

Também foram medidas citocinas típicas de perfil regulatório (figura 33). Os níveis de TGF-β (figura 33C, D) se mantiveram semelhantes em todos os grupos, tanto em homogenato de pata quanto em cultura de células do linfonodo poplíteo. Apesar de 1,87 vezes maior nas patas de camundongos coinfectados, não houve diferença significativa nas concentrações de IL-10 no homogenato de pata dos animais monoinfectados ou coinfectados com *L. amazonensis* (figura 33A). Em cultura de linfonodo poplíteo (figura 33B) sem estimulação, as concentrações de IL-10 foram significativamente maiores nos animais coinfectados do que nos monoinfectados por *L. amazonensis*. Ao estimular com SLA, tal diferença estatística não se manteve, mas o perfil de produção entre os grupos continuou semelhante ao encontrado na ausência de estímulo.

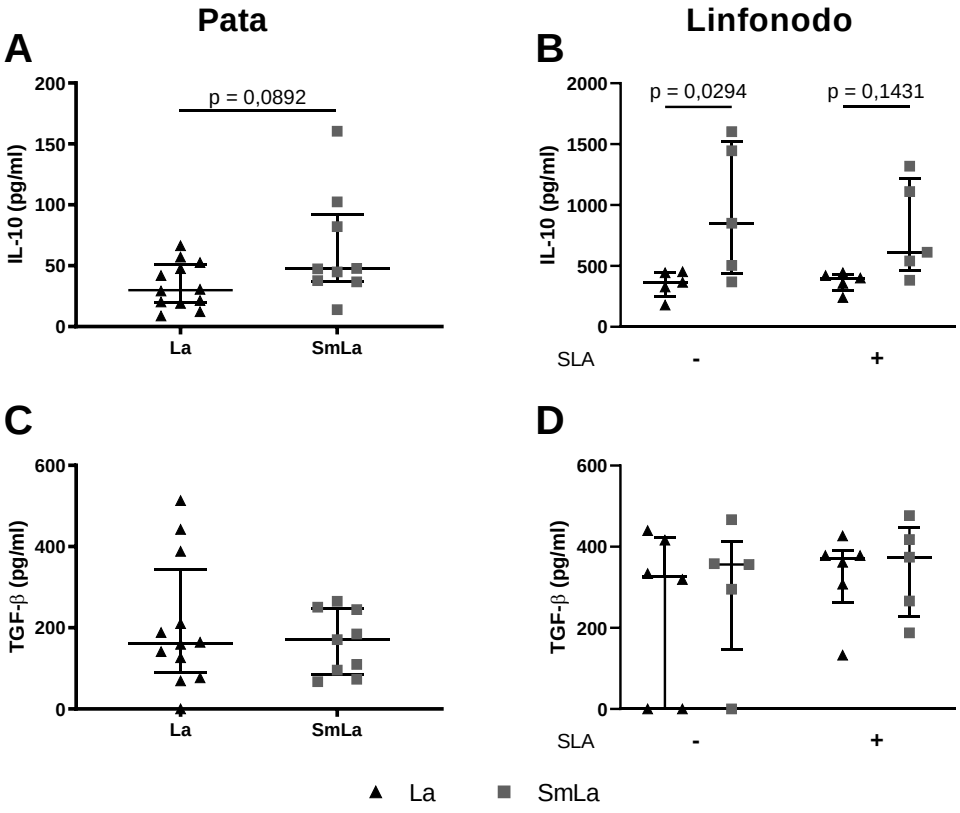


Figura 33. Concentrações de citocinas de perfil regulatório em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni*. IL-10 em pata (A) e linfonodo poplíteo (B). TGF-β em pata (C) e linfonodo poplíteo (D). La: monoinfectado por *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. SLA: antígeno solúvel de *L. amazonensis*. Dados de um (B, D) ou dois experimentos isolados (A, C) e apresentados como valores individuais, mediana e intervalo interquartil. Inferências estatísticas baseadas em resultados de teste t de Welch (A, C) ou Two-way ANOVA (B, D). Fonte: elaborado pelo autor.

As concentrações de citocinas típicas de resposta Th17 também foram estimadas (figura 34). Não houve diferença nos níveis de IL-17 e IL-22 na pata dos camundongos (figura 34A, B). No sobrenadante de cultura de linfonodo poplíteo, não foi possível detectar IL-17 (dados não mostrados), enquanto a produção de IL-22, apesar de detectável, não foi diferente entre os grupos, mesmo após estimulação com SLA (figura 34C).

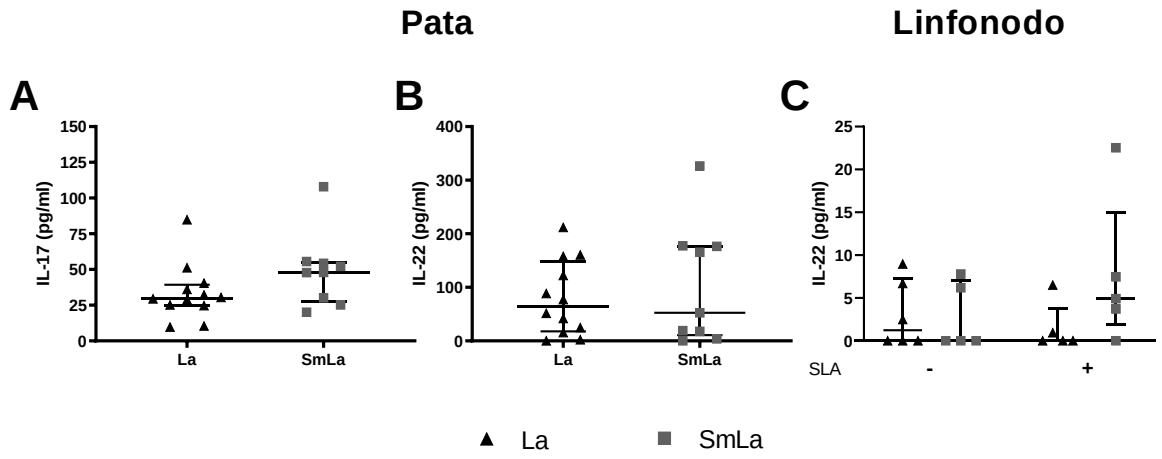


Figura 34. Concentrações de citocinas de perfil Th17 em homogenato de pata e cultura de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni*. IL-17 em pata (A). IL-22 em pata (B) e linfonodo poplíteo (C). La: monoinfectado por *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. SLA: antígeno solúvel de *L. amazonensis*. Dados de um (C) ou dois experimentos independentes (A, B) e apresentados como valores individuais, mediana e intervalo interquartil. Inferências estatísticas baseadas em resultados de teste Mann-Whitney (A), teste t de Welch (B) ou Kruskal-Wallis (C). Fonte: elaborado pelo autor.

Além de citocinas, também foram avaliados os níveis de diferentes quimiocinas nas patas de camundongos monoinfectados por *L. amazonensis* e coinfectados (figura 35). A infecção prévia por *S. mansoni* não afetou significativamente as concentrações de CCL5, CCL17, CCL24, CXCL2 e CXCL13 nas patas de camundongos infectados por *L. amazonensis*.

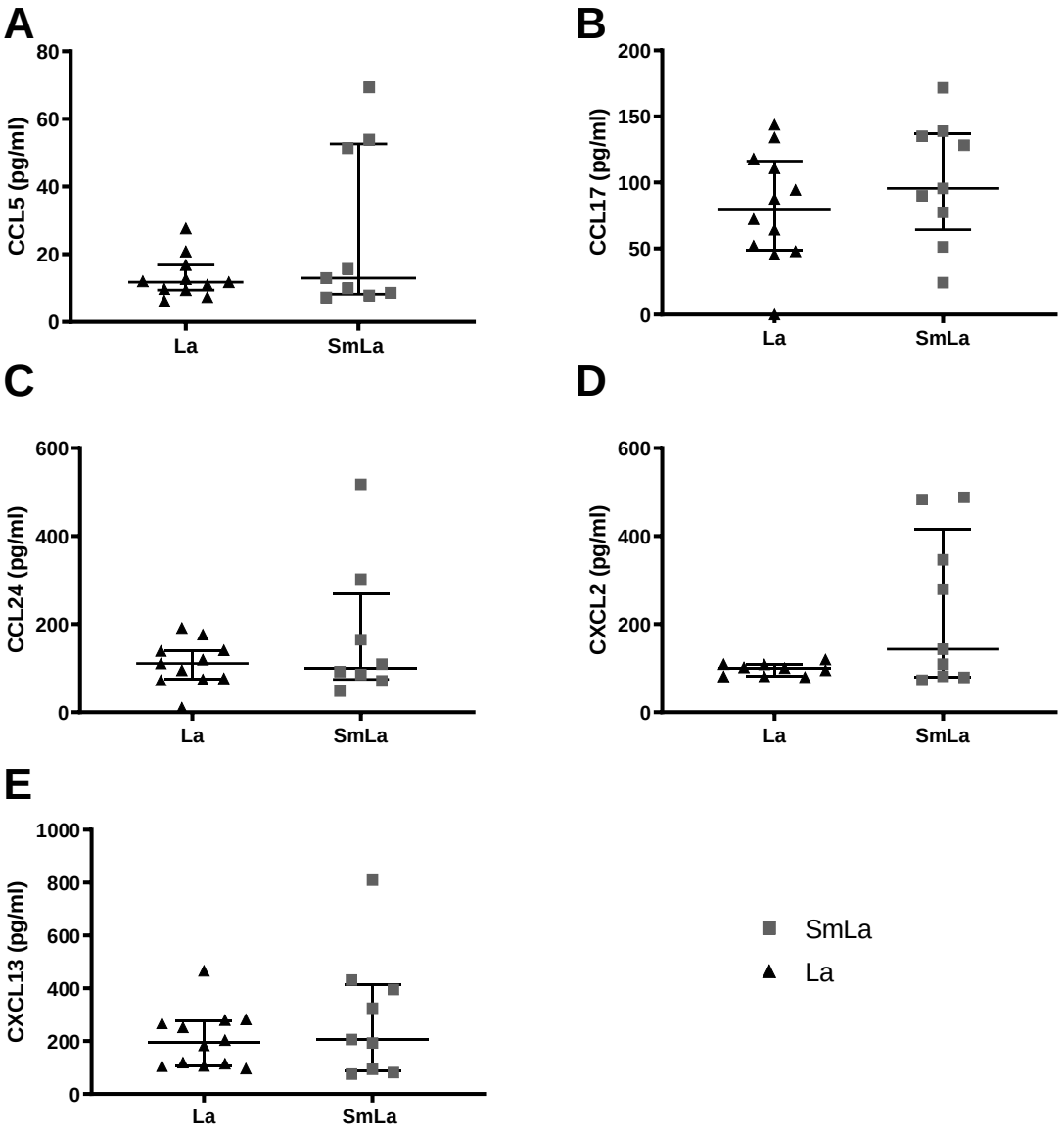


Figura 35. Concentrações de quimiocinas homogenato de pata de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni*. (A) CCL5. (B) CCL17. (C) CCL24. (D) CXCL2. (E) CXCL13. La: monoinfectado por *L. amazonensis*. SmLa: coinfectado com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Dados de dois experimentos independentes apresentados como valores individuais, mediana e intervalo interquartil. Inferências estatísticas baseadas em resultados de teste Mann-Whitney (A, D, E), teste t de Student (B) e teste t de Welch (C). Fonte: elaborado pelo autor.

As alterações histológicas na pata de camundongo BALB/c induzidas pela infecção experimental com *L. amazonensis* em animais monoinfectados e coinfectados com *S. mansoni* estão ilustradas na figura 35. Apesar da presença de poucas áreas com arquitetura tecidual relativamente preservada, tanto o grupo monoinfectado com *L. amazonensis* quanto o coinfectado apresentaram descamação do estrato córneo, juntamente a adelgaçamento e

retificação da epiderme, devido à diminuição ou ausência de papilas dérmicas, além de vacuolização perinuclear em queratinócitos (figura 36A, B, C e D). Em áreas de descontinuidade da epiderme, foi possível visualizar crostas de evidente exsudato inflamatório sobreposto ao epitélio danificado (figura 36B e D). Apesar de parte da derme se encontrar preservada, em especial imediatamente abaixo da epiderme, houve quase completa substituição do tecido conjuntivo por infiltrado mononuclear de aspecto monótono. O infiltrado celular era majoritariamente composto por histiócitos em forma de anel de sinete parasitados com amastigotas. Outros tipos celulares, como células linfoides, polimorfonucleares e células epitelioides também estavam presentes, mas em uma frequência diminuta.

Processos degenerativos e focos necróticos, apesar de presentes em ambos os grupos, também foram notavelmente mais abundantes e extensos nas patas de camundongos coinfectados (figura 36B, D). Já os vacúolos parasitóforos em macrófagos se mostraram grandes e comunais, com morfologia típica de infecção por *L. amazonensis*. Contudo, amastigotas foram aparentemente mais numerosas nos vacúolos de células do grupo coinfectado (figura 36F).

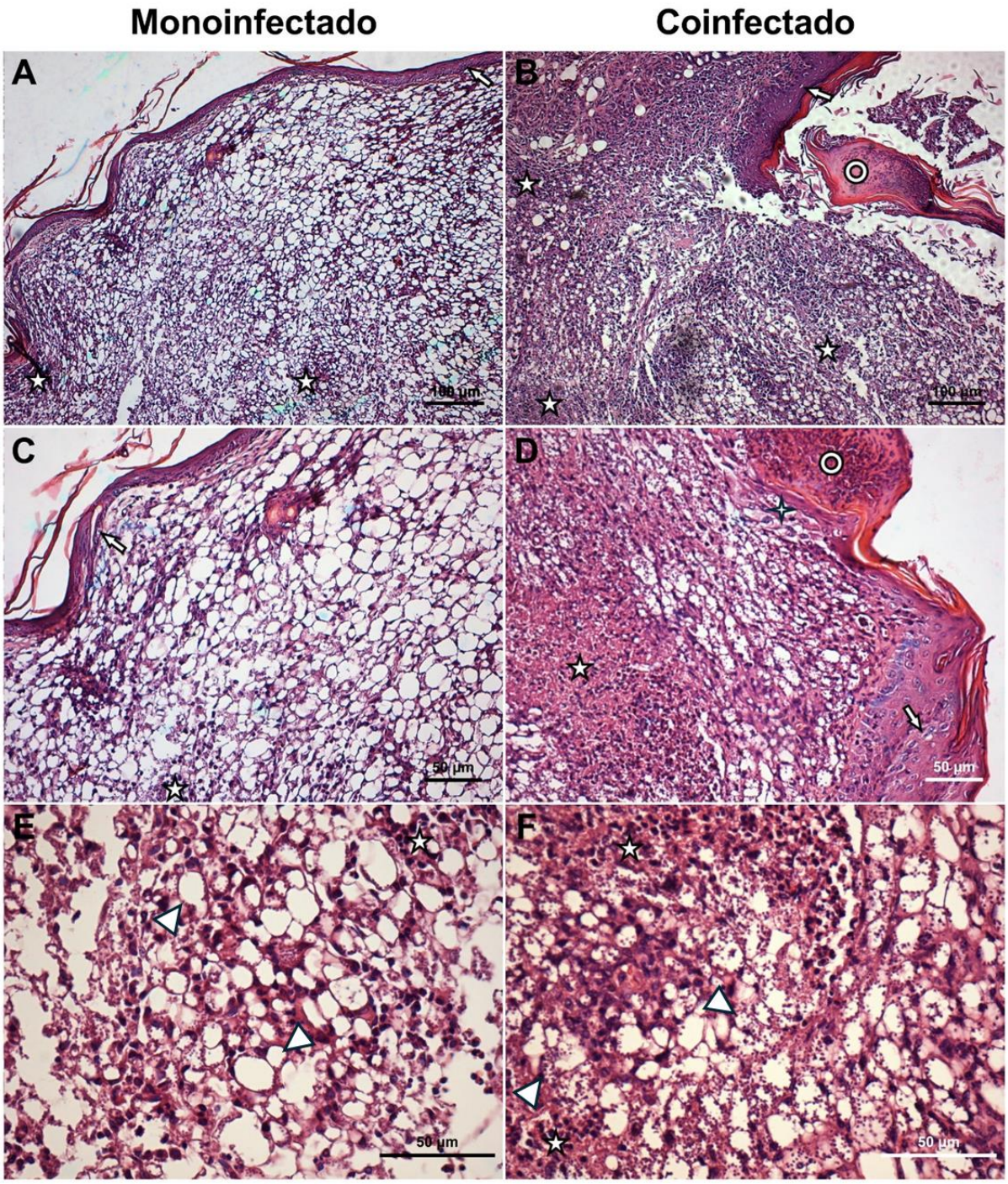


Figura 36. Fotomicrografias de lesão de pata de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e coinfectados ou não com *S. mansoni*. Lesões de patas de animais monoinfectados com *L. amazonensis* (A, C, E) e coinfectados com *S. mansoni* e *L. amazonensis* (B, D, F) coradas com hematoxilina e eosina. Nas imagens, a seta representa vacuolização perinuclear de queratinócito, a estrela de cinco pontas representa áreas de necrose, o círculo representa crosta em úlcera, a estrela de quatro pontas representa células em degeneração, e a cabeça de seta representa vacúolos parasitóforos com amastigotas de *L. amazonensis*. Fonte: elaborado pelo autor.

6.2.3 A transferência de células peritoneais aderentes altera o desenvolvimento de lesões cutâneas

Por fim, foi realizada a transferência de células aderentes recuperados no lavado peritoneal (macrófago) de diferentes microambientes imunológicos para camundongos somente infectados por *L. amazonensis*, a fim de investigar a participação dessas células na resposta ao protozoário. Os resultados são apresentados na figura 37.

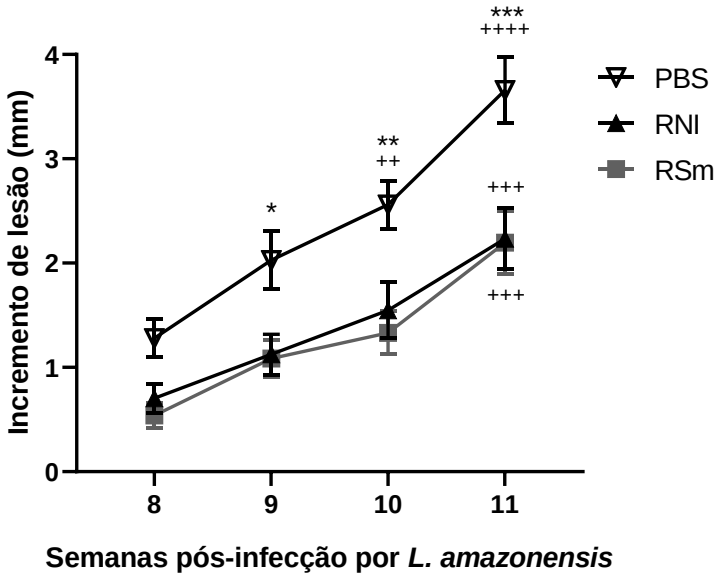


Figura 37. Alteração de cinética de desenvolvimento de lesão cutânea induzida pela infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, após a transferência de células peritoneais aderentes recuperadas de doadores infectados ou não por *S. mansoni*. A transferência de células peritoneais aderentes (macrófagos) foi realizada no tempo zero do protocolo experimental. PBS: animais que somente receberam injeção de PBS (n = 5). RNI: animais receptores de células peritoneais aderentes de camundongos não infectados (n = 6). RSm: animais receptores de células peritoneais aderentes de camundongos com oito semanas de infecção por *S. mansoni* (n = 5). Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Inferências estatísticas baseadas em resultados de teste Two-way ANOVA. $^{+}$ representa diferenças em relação à semana 8 pós-infecção por *L. amazonensis* ($^{++}p < 0,01$, $^{+++}p < 0,001$, $^{++++}p < 0,0001$). * representa diferenças entre grupos em um mesmo ponto no tempo (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). Fonte: elaborado pelo autor.

Não foi observada mortalidade ou lesões em outros órgãos e tecidos em nenhum dos grupos experimentais. Ao final do acompanhamento, todas as lesões se apresentaram como pododermatites ulcerativas típicas de aspecto similar entre os grupos. Contudo, a transferência de células peritoneais se mostrou capaz de alterar o desenvolvimento das lesões cutâneas

causadas por *L. amazonensis*. Tanto o grupo que recebeu macrófagos peritoneais de camundongos não infectados quanto o grupo que recebeu macrófagos de animais na fase aguda da infecção por *S. mansoni* apresentaram lesões de tamanho reduzido, quando comparados ao grupo que não recebeu transferência, a partir da semana 9 do protocolo experimental, sendo estes semelhantes entre si. Além disso, as lesões dos grupos receptores também tiveram crescimento mais lento.

6.3 Discussão – Capítulo 2

Mesmo que alguns aspectos associados a coinfecções experimentais entre *Schistosoma* sp. e *Leishmania* sp. tenham sido investigadas anteriormente (Coelho et al. 1980, Yoshida et al. 1999, la Flamme et al. 2002, Yole et al. 2007, Khayeka–Wandabwa et al. 2013, Thorstenberg et al. 2024), a literatura ainda é relativamente escassa, e a maioria dos estudos focam em coinfecções utilizando *L. major*, um parasito bem descrito como modelo para leishmaniose cutânea experimental, em detrimento de outras espécies dermotrópicas também epidemiologicamente relevantes. Logo, este trabalho teve, como foco, avaliar o impacto da coinfecção *Schistosoma-Leishmania* sobre a infecção por *L. amazonensis*, uma das principais espécies causadoras de LTA no Brasil e o principal agente etiológico da leishmaniose difusa (Barrientos 1948, Barral et al. 1991, Scorza et al. 2017).

Do ponto de vista da esquistossomose, poucos trabalhos sobre a coinfecção *Schistosoma-Leishmania* abordam alterações sobre o desenvolvimento de *S. mansoni* no hospedeiro e suas consequências na evolução da doença. No presente trabalho, somente foi relatada morte nos grupos com animais infectados por *S. mansoni*, tendo os grupos monoinfectado e coinfectado mortalidades semelhantes, consistente com os dados de manutenção de peso. De forma relevante, esse resultado não reflete o que já foi relatado na literatura. Yole et al. (2007) apontaram sobrevivência de todos os animais do grupo coinfectado ao fim de 10 semanas de coinfecção por *S. mansoni* e *L. major*, enquanto houve 60% de mortalidade no grupo monoinfectado por *S. mansoni*. Os autores apontam a maior sobrevivência no grupo infectado em melhora da doença hepática; contudo, é importante ressaltar que a avaliação de lesões no fígado por Yole et al. (2007), após 8 semanas da coinfecção concomitante por *S. mansoni* e *L. major*, só levou em consideração aspectos macropatológicos de textura e granulação, além de utilizar outra espécie, *L. major*, e em um

esquema de coinfecção diferente do utilizado aqui. Além disso, os nossos resultados apontam que a carga parasitária de *S. mansoni* não é alterada durante a coinfecção em camundongos BALB/c quando a coinfecção com *L. amazonensis* ocorre na 8ª semana de infecção por *S. mansoni*, o que vai de encontro aos achados em coinfecção entre *S. mansoni* e *L. donovani* (Hassan et al. 2006) ou *L. major* (la Flamme et al. 2002, Khayeka–Wandabwa et al. 2013).

Quanto às alterações macroscópicas no fígado, foi possível observar aumento expressivo no peso relativo do fígado em animais coinfectados, diferente do que foi visto por Khayeka-Wandabwa et al. (2013). Devido à retenção semelhante de ovos no fígado, o maior peso relativo desse órgão nesse grupo não se justifica no maior acúmulo de ovos. Em lâminas histopatológicas, fígados de ambos os grupos apresentaram intensa presença de ovos retidos, sustentando esse achado. O número grande de ovos, inclusive a presença especialmente elevada de ovos calcificados, é compreensível devido ao longo tempo de infecção por *S. mansoni* (18 semanas ao fim do experimento). Ademais, em análise subjetiva, apesar da congestão de sinusoides de intensidade similar entre os grupos, áreas de hepatócitos em degeneração de hepatócitos e hiperplasia de ductos biliares foram mais extensas no fígado de animais coinfectados, o que indica uma integridade diminuída do parênquima hepático.

Curiosamente, no grupo coinfectado, foi notado acúmulo de células no interior de vasos de maior calibre ao redor de um ovo circulante. Normalmente, ovos imaturos de *S. mansoni* interagem com o endotélio e são levados para fora da circulação, enquanto somente ovos em estágios mais avançados de maturação promovem o recrutamento de leucócitos para formação de granuloma (Takaki et al. 2021, Yeh et al. 2022). Isso torna a formação de granuloma intravascular, no mínimo, improvável; contudo, esse fenômeno ocorre em outros modelos, como na infecção endovenosa por *Cryptococcus neoformans* (Yamaoka et al. 1996). Também há a possibilidade de haver uma aglomeração de células ao redor do ovo como um sinal de coagulação intravascular disseminada, possível ocorrência em humanos com esquistossomose (Omran et al. 1995, Mebius et al. 2013), que poderia levar à formação de um trombo envolvendo o ovo. De qualquer forma, tal achado pode ser indicativo de piora na circulação – tanto como consequência, por permitir que ovos permaneçam mais tempo na corrente sanguínea, quanto como causa, por um granuloma intravascular/trombo possivelmente funcionar como êmbolo em vasos de maior calibre. Para investigar melhor as alterações funcionais do fígado desses animais, foi feita análise de enzimas associadas à lesões hepáticas no soro dos animais experimentais.

Neste trabalho, houve aumento na atividade sérica de AST e GGT, assim como da razão AST/ALT em animais coinfectados. ALT e AST são enzimas comumente utilizadas para indicar dano hepático, sendo a atividade sérica de ALT relativamente mais específica, já que AST está presente em todos os tecidos à exceção de ossos, estando em quantidades consideráveis no fígado e músculo esquelético (Washington & Van Hoosier 2012). O aumento concomitante da atividade sérica de ALT e AST é presente em, aproximadamente, 50% dos indivíduos com esquistossomose, mas não são, isoladamente, bons parâmetros para diferenciar formas mais ou menos graves (Mansour et al. 1982, Barreto et al. 2017). Em outras doenças hepáticas, como hepatite C, doença hepática gordurosa não alcoólica e cirrose alcoólica, o aumento da razão AST/ALT já foi associado a complicações e piora do prognóstico (Giannini et al. 2003, McPherson et al. 2010, Vilar-Gomez et al. 2018). Como o aumento desse indicador é mais frequente em animais coinfectados, é possível que isso sugira maior dano ao parênquima hepático, o que condiz com os achados de maiores áreas de lesão de hepatócitos nesse grupo.

Por sua vez, GGT é uma enzima comum na membrana plasmática de hepatócitos, e, durante lesão hepática ou bloqueio de ductos biliares, seu acúmulo leva à secreção de excessos dessa enzima na corrente sanguínea (Kunutsor 2016). A atividade sérica de GGT elevada também é frequente em quadros que envolvem o sistema hepatobiliar. Neste trabalho, uma das alterações observadas no grupo coinfectado durante a análise histopatológica foi a hiperplasia de ductos biliares. O aumento da atividade sérica de GGT segue a proliferação de ductos biliares, decorrente do aumento da pressão interna do sistema biliar, desorganização das junções intracelulares do epitélio dos ductos biliares ou necrose (Bulle et al. 1990, Brouillet et al. 1998). Em crianças com atresia de vias biliares, na qual a proliferação de ductos biliares é característica, ocorre aumento da atividade sérica de GGT, que se eleva progressivamente, refletindo a constante proliferação de ductos conforme a criança se torna adulta (Shen et al. 2020). Semelhantemente, a administração de 1-naftilisotiocianato em ratos também promove aumentos da atividade sérica de GGT que correspondem fortemente ao aumento do volume de ductos biliares (Leonard et al. 1984). Logo, o aumento da atividade de GGT pode ser um reflexo da hiperplasia de ductos biliares vista na análise histopatológica.

Paralelamente, a atividade de GGT em pacientes com esquistossomose crônica é correlacionada diretamente ao aumento do fluxo sanguíneo portal (Alves Jr. et al. 2003), estando elevada em indivíduos com manifestações hepatoesplênica em relação a formas não complicadas (Mansour et al. 1982). O fluxo portal, por sua vez, é um dos fatores que determinam a pressão portal, juntamente com a resistência dos vasos hepáticos à passagem do

sangue (Bosch & Iwakiri 2018), e normalmente se encontra aumentado em camundongos às 11 semanas de infecção experimental por *S. mansoni* (Sarin et al. 1991). A degeneração hidrópica, vista com mais frequência no grupo coinfectado, também corresponde a uma alteração causada por isquemia em indivíduos com esquistossomose hepatoesplênica (Cullen & Stalker 2016), corroborando como sinal de pior circulação nesses animais. Apesar de não terem sido notadas, à primeira vista, diferenças marcantes na congestão de sinusoides entre o grupo monoinfectado por *S. mansoni* e o grupo coinfectado, é possível que o aumento de GGT e áreas de degeneração no grupo coinfectado em relação aos animais monoinfectados por *S. mansoni* sejam um indicativos de maior comprometimento da circulação portal intra-hepática.

Além do grupo coinfectado, também houve indivíduos no grupo monoinfectado por *L. amazonensis* que também apresentaram animais com atividade de GGT elevada. Em cães infectados por *L. infantum*, aumento da atividade de GGT sérica é relacionado a comprometimento hepatobiliar e renal (Valladares et al. 1997, Paltrinieri et al. 2018, Frazilio et al. 2018). Logo, é possível que a infecção por *L. amazonensis* possa ter levado a complicações hepáticas durante a coinfecção, especialmente levando em consideração que Hassan et al. (2006) observou que o granuloma esquistossomótico fornece um ambiente favorável à proliferação de *L. donovani* no fígado. Contudo, não foram observadas amastigotas durante a análise histopatológica do fígado, assim como não foram realizadas quantificações de carga parasitária para a averiguação da presença de *L. amazonensis* nesse órgão neste trabalho. Além disso, é possível que alterações na atividade de GGT sejam, pelo menos que parcialmente, de origem extra-hepática, como perturbação da função renal nesses animais (Valladares et al. 1997, Paltrinieri et al. 2018, Frazilio et al. 2018), a qual não foi avaliada.

Quanto aos granulomas esquistossomóticos, apesar de haver um aparente aumento na celularidade dos granulomas de animais coinfectados, ainda não é possível afirmar que a coinfecção tenha alterado de maneira significativa a formação dessas estruturas. Porém, a integridade e formação apropriada do granuloma esquistossomótico é indispensável para a proteção do parênquima hepático contra a ação dos ovos de *S. mansoni* (Hoffmann et al. 2000, Hesse et al. 2004, Herbert et al. 2004, Maggi et al. 2021). Logo, é possível que uma má formação do granuloma por conta da coinfecção tenha permitido o maior extravasamento de antígenos citotóxicos dos ovos, contribuindo para maior lesão hepática no grupo coinfectado. Trabalhos com o uso de hamster sírio mostraram que a coinfecção entre *S. mansoni* e *L. infantum* modificou a morfologia de granulomas hepáticos (Mangoud et al. 1997, 1998), dando base a essa possibilidade no modelo aqui utilizado. Contudo, Hassan et al. (2006) não notaram

mudanças na morfologia dos granulomas de *S. mansoni* em coinfecção com *L. donovani*. Análises mais precisas, como morfometria e o uso de outras colorações, como prata amoniacal de Gomori (Gömöri 1937), tricômico de Masson (Masson 1929) e vermelho de picrosirius (Llewellyn 1970), podem permitir uma melhor investigação da composição dos granulomas e processos fibróticos durante a coinfecção.

Já no que diz questão à leishmaniose tegumentar experimental, os dados presentes na literatura, até o momento, contrastam quanto à conclusão sobre lesões cutâneas induzidas por *Leishmania* spp. serem ou não afetadas pela infecção por *S. mansoni*. Enquanto alguns estudos (Yoshida et al. 1999, Khayeka–Wandabwa et al. 2013) mostram que a coinfecção por *S. mansoni* e *L. major* não afeta a cinética de crescimento das lesões em camundongos BALB/c e C57BL/6, outros descreveram que a coinfecção concomitante poderia resultar em lesões maiores de crescimento e cura mais demorados em camundongos C57BL/6 (la Flamme et al. 2002, Yole et al. 2007). Por outro lado, utilizando camundongos não isogênicos e *L. mexicana*, uma espécie filogeneticamente próxima a *L. amazonensis* (Tschoeke et al. 2014), Coelho et al. (1980) demostraram lesões com um menor período de incubação. Esses resultados conflitantes podem ser resultado de variações no modelo experimental escolhido, tempo de coinfecção ou espécie e cepa dos parasitos utilizados. Enquanto isso, nossos dados mostram que a coinfecção com *L. amazonensis* em camundongos BALB/c infectados há 8 semanas com *S. mansoni* causa um período de incubação maior, mas lesões de menor espessura, constituindo uma alteração de perfil clínico não antes relatado na literatura sobre coinfecções *Schistosoma-Leishmania*.

Apesar de menos espessas, a carga parasitária de *L. amazonensis* nas lesões cutâneas de animais coinfectados foi impressionantemente maior, sendo notável inclusive em corte histológico. Esse resultado é apoiado pelo evidenciado por Thorstenberg et al. (2024), que mostrou maior carga parasitária em linfonodo poplíteo de camundongos Swiss coinfectados com *S. mansoni* e *L. amazonensis*. Logo, a redução na espessura da lesão não correspondeu a um perfil de proteção e controle, diferente do que ocorre com a monoinfecção de *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6, os quais apresentam lesões menos espessas e com baixa carga parasitária quando comparado a camundongos BALB/c (Velasquez et al. 2016). Nossos dados também contrastam com os dados de la Flamme et al. (2002), que constataram lesões mais espessas com maior carga parasitária de *L. major* em camundongos C57BL/6 coinfectados com *S. mansoni*. Isso sugere que a resposta imune no sítio de infecção de *L. amazonensis* foi alterada pela infecção prévia com *S. mansoni*, resultando em um microambiente que favoreceu o crescimento de amastigotas.

Normalmente, ambientes imunológicos que favorecem o crescimento de amastigotas de *Leishmania* spp. são associados ao controle de dano tecidual causado por respostas de tipo 1 (Scott & Novais 2016, Scorza et al. 2017). À primeira vista, com base nas atividades de NAG, EPO e MPO e níveis de quimiocinas nas patas dos camundongos coinfectados, não houve diferença aparente na infiltração de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. Sob análise histopatológica, foi possível ver que a infiltração de eosinófilos e neutrófilos foi mínima perto do infiltrado de macrófagos devido à quase completa substituição da derme por infiltrado de células do SFM. Surpreendentemente, a histopatologia também evidenciou que, na realidade, não houve indução de um perfil imune protetor durante a coinfecção – pelo contrário, camundongos coinfectados apresentaram áreas de necrose mais numerosas e maiores, e perda da integridade da derme é que pode ter ocasionado lesões menos espessas nesse grupo. Portanto, há a necessidade de explorar o microambiente imunológico como um todo para melhor entender as alterações na cinética de desenvolvimento das lesões num contexto de coinfecção *S. mansoni-L. amazonensis*, assim como o dano tecidual e proliferação de amastigotas.

A fim de ter uma visão mais confiável sobre a resposta imune nos sítios de infecção por *L. amazonensis*, foram medidas as concentrações de citocinas nas patas e linfonodos poplíteos. Apesar de não ser significativamente diferente no homogenato de pata, houve elevação dos níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de linfonodo poplíteo na ausência de estimulação por SLA. Esperam-se níveis mais altos de IL-10 durante a fase crônica da esquistossomose, já que antígenos dos ovos são responsáveis por induzir uma resposta regulatória nas fases tardias da infecção (Hoffmann et al. 2000, Hesse et al. 2004, Haeberlein et al. 2017). A fonte principal de IL-10 durante a infecção por *L. major* aparentam ser células T $CD4^{+}FoxP3^{+}$, como mostrado em camundongos BALB/c $CD4^{Cre/+}IL\text{-}10^{flox/flox}$, os quais apresentam melhor controle da infecção, com lesões autolimitadas e com baixa carga parasitária (Schwarz et al. 2013).

Além disso, IL-10 compromete a capacidade de secreção de IL-12p70 mediada por IFN-γ/LPS por macrófagos infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*, além de aumentar a carga parasitária nessas células (Kane & Mosser 2001, Ji et al. 2003). Já em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LCL, a estimulação de simultânea com SLA e antígenos de *S. mansoni* levaram à maior produção de IL-10, aumento na expressão de CTLA-4 e menor expressão de HLA-DR (Bafica et al. 2011, 2012). De forma semelhante, células dendríticas de indivíduos com esquistossomose infectadas *in vitro* com *L. braziliensis* apresentaram diminuição de HLA-DR e aumento de IL-10R (Lopes et al. 2018), o que aumentaria a sensibilidade dessas células à IL-10 e diminuiria a sua capacidade de ativação de linfócitos T.

Logo, apesar de não ser capaz de controlar a inflamação na pata e lesão tecidual, existe a possibilidade de IL-10 estar envolvida no aumento da proliferação de *L. amazonensis* em camundongos previamente infectados por *S. mansoni*. A coinfecção, contudo, não foi capaz de reduzir os níveis de citocinas de perfil tipo 1, como IL-6, IL-12p70, IFN-γ e TNF-α, sugerindo que níveis de resposta tipo 1 mantidos também podem ter participação no dano à pele observado. Sendo assim, a menor espessura das lesões de pata, novamente, não reflete proteção contra LTA, nem parasitológica nem patologicamente. É possível que o incremento de lesão no grupo coinfectado não tenham crescido na mesma medida que o grupo monoinfectado por *L. amazonensis* devido à perda de tecidos sadios por necrose e exsudação através do epitélio danificado, levando à retração da espessura da pata.

Ademais, foi notado que níveis de IL-5, uma citocina associada à diferenciação, migração e ativação de eosinófilos (Stirling et al. 2001), estavam aumentados tanto no homogenato de pata quanto no sobrenadante de cultura de linfonodo poplíteo de camundongos infectados. Apesar de apresentar um pico durante a fase aguda da esquistossomose, assim como outras citocinas associadas à resposta de tipo 2, como IL-4 e IL-13, os níveis de IL-5 podem manter-se elevados durante os estágios iniciais da fase crônica, coincidindo com o aumento de eosinófilos (Costain et al. 2022). Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos com LCL, quando expostas a SLA e PIII (um antígeno de *S. mansoni*) aumentaram sua produção de IL-5 (Bafica et al. 2011).

Durante a infecção por *L. amazonensis* e *L. mexicana*, existe evidência de que eosinófilos possam ter um papel protetor tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Watanabe et al. 2004, Marques et al. 2021, Salaiza-Suazo et al. 2024). Por outro lado, também há trabalhos que demonstram que proteínas citotóxicas de grânulos de eosinófilos podem ser parcialmente responsáveis pela patogênese de dermatite atópica e de lesões ulceradas na síndrome hipereosinofílica (Simon et al. 2004, Plager et al. 2009). Além disso, camundongos deficientes em Sharpin, os quais apresentam dermatite eosinofílica, apresentam melhora quando tratados com IgG anti-IL-5 (Seymour et al. 2007, Renninger et al. 2010). Eosinófilos também são envolvidos em colite ulcerativa, sendo recrutados por IL-5 e TNF-α (Carlson et al. 1999, Lampinen et al. 2001). Já em pacientes com leishmaniose difusa por *L. mexicana*, nos quais há eosinofilia sanguínea e aumento da infiltração intralesional de eosinófilos, estes são produtores de IL-6, IL-8 e IL-13, citocinas que podem estar associadas à progressão da doença (Salaiza-Suazo et al. 2024). Além disso, CCL11, uma quimiocinas associada ao recrutamento de eosinófilos (Bandeira-Melo et al. 2001), é detectada com mais frequência em indivíduos

infectados por *S. mansoni* com histórico de LTA em comparação a quem é somente infectado por *S. mansoni* (Miranda et al. 2021).

Neste trabalho, a análise histopatológica não evidenciou diferenças relevantes no infiltrado de eosinófilos nas patas de camundongos coinfectados, apoiado pelos resultados similares de CCL24 e atividade de EPO (Bailey 1988, Barcelos et al. 2005, Lee et al. 2020). Futuramente, outras análises, como colorações específicas para eosinófilos, como vermelho de Sirius alcalino (Llewellyn 1970, Meyerholz et al. 2009), ou citometria de fluxo, podem confirmar a ausência de diferenças na infiltração de eosinófilos ou mostrar diferenças aqui não observadas por limitações das metodologias utilizadas. De qualquer forma, devido à baixa proporção de eosinófilos em relação a macrófagos no sítio de infecção, é possível que aqueles não tenham sido capazes de auxiliar no controle da infecção demonstrado anteriormente.

Alguns trabalhos, apesar de demonstrarem um papel importante de eosinófilos no controle de *L. amazonensis*, só mostraram tal capacidade com grandes quantidades dessas células. Marques et al. (2021) observaram que eosinófilos exercem papel de controle *in vitro* de *L. amazonensis* em macrófagos infectados pela secreção de prostaglandina D_2, mas somente na proporção de 5 eosinófilos para cada macrófago; o mesmo não sendo observado nas proporções de 1:1 ou 2:1. De forma similar, Watanabe et al. (2004), utilizando camundongos IL-5 TG com eosinófilos correspondentes a, pelo menos, 50% dos leucócitos circulantes, obtiveram um fenótipo de resistência à infecção por *L. amazonensis*. Portanto, é possível que o controle de *L. amazonensis* por eosinófilos só seja biologicamente relevante quando a proporção de eosinófilos para macrófagos é relativamente alta no sítio de infecção, o que não foi observado neste trabalho. Sendo assim, pode-se sugerir que, pela baixa proporção de eosinófilos nas patas de camundongos coinfectados em relação à imensa quantidade de macrófagos, a ativação dessas células mediada por IL-5, associada aos níveis mantidos de TNF-α, talvez tenha contribuído somente para o dano tecidual observado, mas não colaborado para o controle das amastigotas.

Em relação aos macrófagos, estudos anteriores do nosso grupo (Camelo-Júnior 2019) mostraram que macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com 8 semanas de infecção por *S. mansoni* são mais susceptíveis à infecção *in vitro* por *L. amazonensis*, produzindo concentrações maiores de TGF-β e níveis menores de NO. Os resultados do presente trabalho vão ao encontro dessa informação, mostrando que o fenômeno observado *in vitro* se estende para um fenótipo de susceptibilidade *in vivo* associada à proliferação do parasito. Algo similar foi demonstrado por la Flamme, Scott & Pearce (2002)

em camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* na fase aguda, cujos macrófagos peritoneais eram irresponsivos a IFN-γ, produzindo menos NO, o que refletiu também no aumento da carga parasitária de *L. major* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Logo, para investigar mais profundamente a participação de macrófagos, foi realizada a transferência de células peritoneais aderentes de animais na oitava semana de infecção por *S. mansoni* para outros camundongos no momento da infecção por *L. amazonensis*.

No presente estudo, a transferência de células peritoneais por si só se mostrou eficiente em diminuir a espessura da pododermatite provocada por *L. amazonensis.* Contudo, não houve diferença entre o grupo receptor de macrófagos de animais infectados com *S. mansoni* em relação aos animais que receberam macrófagos de camundongos não infectados. Isso pode ter ocorrido por macrófagos serem células muito plásticas (Davis et al. 2013, Liao et al. 2019, Liu et al. 2020), possivelmente levando mesmo os macrófagos de animais com *S. mansoni* a assumir um perfil mais classicamente ativado em um ambiente de monoinfecção por *L. amazonensis*. A nível de delineamento experimental, é possível que, para compensar a possível plasticidade dos macrófagos transferidos, realizar mais transferências durante o curso da infecção por *L. amazonensis* poderia manter mais elevadas as quantidades de macrófagos polarizados. Além disso, mais de uma transferência em diferentes pontos refletiria mais fielmente o que ocorre durante a coinfecção. Importante ressaltar que, mesmo só tendo ocorrido uma transferência na semana 0, isso foi o suficiente para mudar as manifestações no final do protocolo experimental. Neste momento, não é plausível descartar a possibilidade de ter havido alterações não macroscópicas, como mudanças na carga parasitária, no aspecto histopatológico das lesões e na resposta imune no sítio de infecção. Paralelamente, é possível (e, inclusive, provável) que macrófagos não sejam os únicos responsáveis pelas alterações vistas durante a coinfecção *in vivo*. Outros tipos celulares que estejam proeminentemente envolvidos nas diferenças vistas em coinfecção *in vivo* podem ser indispensáveis para os fenótipos observados

6.4 Conclusões – Capítulo 2

A infecção prévia por *S. mansoni* é capaz de alterar as lesões cutâneas causadas por *L. amazonensis*, assim como promover o seu crescimento intracelular. Contudo, apesar de haver mudanças na resposta imune, a coinfecção não levou a um significante aumento de regulação de respostas de tipo 1 no sítio de infecção, ocasionando um maior dano tecidual na derme, com

o aparecimento de extensas áreas de necrose. Além disso, a coinfecção com *L. amazonensis* durante uma infecção já estabelecida por *S. mansoni* levou à piora nas lesões hepáticas na esquistossomose, com diminuição da integridade do parênquima hepático e possível piora da circulação hepática.

7 RESUMO DOS RESULTADOS

7.1 Principais resultados – Capítulo 1

- Dos 90 países endêmicos para leishmaniose tegumentar e 78 para esquistossomose em 2022, 40 foram classificados coendêmicos, 23 dos quais apresentam transmissão ativa das duas doenças, incluindo o Brasil;
- Em Minas Gerais, entre 2013 e 2017, 61 municípios foram classificados como agrupamentos *high-high* para leishmaniose tegumentar e esquistossomose, distribuídos nas mesorregiões do Norte de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Zona da Mata e Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte.

7.2 Principais resultados – Capítulo 2

- A coinfecção entre *S. mansoni* e *L. amazonensis* gera aumento expressivo do fígado associado à perda de integridade do parênquima hepático e níveis elevados de AST e GGT em comparação a animais monoinfectados com *S. mansoni*;
- A infecção prévia por *S. mansoni* levou à diminuição do incremento da lesão de pata induzida pela infecção experimental por *L. amazonensis,* redução esta que não foi associada à proteção do hospedeiro devido à maior destruição tecidual e aumento da carga parasitária;
- Na coinfecção experimental, houve aumento de IL-5 e IL-10, além da manutenção de citocinas de perfil Th1 nos sítios de infecção por *L. amazonensis;*
- A transferência de células peritoneais, no delineamento utilizado, reduziu o crescimento da lesão cutânea induzida por *L. amazonensis* independentemente da origem dessas células.

8 CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho evidenciou que diversos países possuem transmissão concomitante de esquistossomose e leishmaniose tegumentar e que é análise de LISA é uma ferramenta útil para indicar áreas onde há possibilidade aumentada de haver casos de coinfecção. Contudo, a epidemiologia das coinfecções *Schistosoma-Leishmania* ainda precisa ser mais bem abordada. Estudos que abordem fatores socioambientais de risco para coinfecção e que determinem áreas de risco em outras regiões do mundo são indispensáveis para melhor entendimento da dinâmica de interação entre a transmissão da esquistossomose e a da leishmaniose tegumentar.

Quanto à interação entre esquistossomose e leishmaniose tegumentar em modelo experimental, é possível observar que há mudanças marcantes nas lesões cutâneas e parasitismo de *L. amazonensis*, assim como uma potencial piora da doença hepática, possivelmente relacionadas às alterações na resposta imune dos camundongos durante a coinfecção. Uma possível relação entre o recrutamento e ativação de alguns tipos celulares com as alterações patológicas observadas durante a coinfecção *Schistosoma-Leishmania*, principalmente eosinófilos e macrófagos, ainda precisa ser mais bem investigada. Além disso, devido a características espécie-específicas, também é de grande importância estudar outras espécies de *Leishmania* spp. e *Schistosoma* spp. no contexto de coinfecção.

REFERÊNCIAS

Afchain D, Desjeux P, Fuente C la, Ray D le, Cesbron JY, Neyrinck JL, Capron A 1983. Specific IgE antibodies to *Leishmania braziliensis* in patients with mucocutaneous leishmaniasis. *Ann Inst Pasteur Immunol (1985)* 134: 311–319.

Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, Clarêncio J, Oliveira CI de, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI 2008. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol* 84: 389–396.

Aga E, Katschinski DM, Zandbergen G van, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T 2002. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169: 898–905.

Akuffo H, Costa C, Griensven J van, Burza S, Moreno J, Herrero M 2018. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006375.

Alves Jr. A, Fontes DA, Melo VA de, Machado MCC, Cruz JF, Santos EAS 2003. Hipertensão portal esquistossomótica: influência do fluxo sangüíneo portal nos níveis séricos das enzimas hepáticas. *Arq Gastroenterol* 40: 203–208.

Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC 2008. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop* 105: 1–9.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA 2007. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 77: 266–274.

Amiri P, Locksley RM, Parslow TG, Sadickt M, Rector E, Ritter D, McKerrow JH 1992. Tumour necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 356: 604–607.

Anselin L 1995. Local Indicators of Spatial Association-LISA. *Geogr Anal* 27: 93–115.

Araújo VEM de, Pinheiro LC, Almeida MC de M, Menezes FC de, Morais MHF, Reis IA, Assunção RM, Carneiro M 2013. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2540.

Armstrong JC 1965. Mating Behavior and Development of Schistosomes in the Mouse. *J Parasitol* 51: 605.

Ashton PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA 2001. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitol* 122.

Atanaka-Santos M, Souza-Santos R, Czeresnia D 2007. Spatial analysis for stratification of priority malaria control areas, Mato Grosso State, Brazil. *Cad Saude Publica* 23: 1099–1112.

Aula OP, McManus DP, Jones MK, Gordon CA 2021. Schistosomiasis with a Focus on Africa. *Trop Med Infect Dis* 6: 109.

Azeredo-Coutinho RBG, Pimentel MI, Zanini GM, Madeira MF, Cataldo JI, Schubach AO, Quintella LP, Mello CX de, Mendonça SCF 2016. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop* 154: 42–49.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Jesus AR De, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734–6740.

Bafica AMB, Cardoso LS, Oliveira SC, Loukas A, Góes A, Oliveira RR, Carvalho EM, Araujo MI 2012. Changes in T-Cell and Monocyte Phenotypes In Vitro by *Schistosoma mansoni* Antigens in Cutaneous Leishmaniasis Patients. *J Parasitol Res* 2012: 520308.

Bafica AMB, Cardoso LS, Oliveira SC, Loukas A, Varela GT, Oliveira RR, Bacellar O, Carvalho EM, Araújo MI 2011. *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 856–863.

Bailey PJ 1988. Sponge Plants as Models. Immunochemical Techniques. Part L: Chemotaxis and Inflammation. *Methods Enzymol* 162: 327–334.

Bandeira-Melo C, Herbst A, Weller PF 2001. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Resp Cell Mol Biol* 24: 653–657.

Barbosa DS, Belo VS, Rangel MES, Werneck GL 2014. Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Acta Trop* 131: 56–62.

Barbosa MA, Pellegrino J, Coelho PMZ, Sampaio IBM 1978. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 20: 121–132.

Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol* 78: 352–358.

Barral A, Badaro R, Carvalho EM, Barral-Netto M, Jesus AR de, Johnson WD, Momen H, Almeida R, McMahon-Pratt D, Pedral-Sampaio D, Grimaldi G 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* Produces a Wide Spectrum of Clinical Disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536–546.

Barral A, Costa JML, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM 1995a. POLAR AND SUBPOLAR DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN BRAZIL: CLINICAL AND IMMUNOPATHOLOGIC ASPECTS. *Int J Dermatol* 34: 474–479.

Barral A, Guerreiro J, Correia D, Bomfim G, Barral-Netto M, Carvalho EM 1995b. Lymphadenopathy as the First Sign of Human Cutaneous Infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 53: 256–259.

Barreto AVMS, Alecrim VM, Medeiros TB de, Domingues ALC, Lopes EP, Martins JRM, Nader HB, Diniz GTN, Montenegro SML, Morais CNL de 2017. New index for the diagnosis of liver fibrosis in Schistosomiasis mansoni. *Arq Gastroenterol* 54: 51–56.

Barrientos LP 1948. Um caso atípico de leishmaniose cutâneo-mucosa (Espundia). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 46: 415–418.

Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T 2013. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *J Adv Res* 4: 433–444.

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

Belo VS, Bruhn FRP, Barbosa DS, Câmara DCP, Simões TC, Buzanovsky LP, Duarte AGS, Melo SN de, Cardoso DT, Donato LE, Maia-Elkhoury ANS, Werneck GL 2023. Temporal patterns, spatial risks, and characteristics of tegumentary leishmaniasis in Brazil in the first twenty years of the 21st Century. *PLoS Negl Trop Dis* 17: e0011405.

Berhe N, Medhin G, Erko B, Smith T, Gedamu S, Bereded D, Moore R, Habte E, Redda A, Gebre-Michael T, Gundersen SG 2004. Variations in helminth faecal egg counts in Kato–

Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 92: 205–212.

Berman JD, Fioretti TB, Dwyer DM 1981. In Vivo and In Vitro Localization of *Leishmania* within Macrophage Phagolysosomes: Use of Colloidal Gold as a Lysosomal Label1. *J Protozool* 28: 239–242.

Bezerra JMT, Araújo VEM de, Barbosa DS, Martins-Melo FR, Werneck GL, Carneiro M 2018a. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006697.

Bezerra FSM, Leal JKF, Sousa MS, Pinheiro MCC, Ramos AN, Silva-Moraes V, Katz N 2018b. Evaluating a point-of-care circulating cathodic antigen test (POC-CCA) to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic area in north-eastern Brazil. *Acta Trop* 182: 264–270.

Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, Andrade J de, Santos WLC dos, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A 2010. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 40: 2830–2836.

Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG 2000. Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. *J Exp Med* 191: 2121–2130.

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A 1996. Variation of Cytokine Patterns Related to Therapeutic Response in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *Exp Parasitol* 84: 188–194.

Bosch J, Iwakiri Y 2018. The portal hypertension syndrome: etiology, classification, relevance, and animal models. *Hepatol Int* 12: 1–10.

Brasil 2014. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Ministério da Saúde, Brasília.

Brasil 2017. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Saúde, Brasília.

Brazil 2023. *Guia de Vigilância em Saúde*. Ministério da Saúde, Brasília.

Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M 1997. Parasite-Driven in Vitro Human Lymphocyte Cytotoxicity Against Autologous Infected Macrophages from Mucosal Leishmaniasis. *J Immunol* 159: 4467–4473.

Brouillet A, Holic N, Chobert MN, Laperche Y 1998. The gamma-glutamyl transpeptidase gene is transcribed from a different promoter in rat hepatocytes and biliary cells. *Am J Pathol* 152: 1039–1048.

Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ 1997. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol* 159: 777–785.

Brustolin AÁ, Ramos-Milaré ÁCFH, Castro KR de, Mota CA, Pelloso SM, Silveira TGV 2021. Successful combined therapy with Glucantime^{TM} and pentoxifylline for the nasal mucosal lesion recently developed in a leishmaniasis patient having untreated cutaneous lesion for seven decades. *Parasitol Int* 85: 102422.

Bulle F, Mavier P, Zafrani ES, Preaux A-M, Lescs M-C, Siegrist S, Dhumeaux D, Guellaën G 1990. Mechanism of γ-glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat: A histochemical, biochemical and molecular approach. *Hepatol* 11: 545–550.

Buxbaum LU, Scott P 2005. Interleukin 10- and Fcγ Receptor-Deficient Mice Resolve *Leishmania mexicana* Lesions. *Infect Immun* 73: 2101–2108.

Camelo-Júnior GMA 2019. DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* AFETAM A SUSCEPTIBILIDADE DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* IN VITRO.

Campanelli AP, Brodskyn CI, Boaventura V, Silva C, Roselino AM, Costa J, Saldanha AC, Rodrigues de Freitas LAÔ, Oliveira CI de, Barral-Netto M, Silva JS, Barral A 2010. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol* 71: 1220–1227.

Cañeda-Guzmán IC, Salaiza-Suazo N, Fernández-Figueroa EA, Carrada-Figueroa G, Aguirre-García M, Becker I 2014. NK Cell Activity Differs between Patients with Localized and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Infected with <i>Leishmania mexicana/i>: A Comparative Study of TLRs and Cytokines (S Stager, Ed.). *PLoS One* 9: e112410.

Cantacessi C, Dantas-Torres F, Nolan MJ, Otranto D 2015. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitol* 31: 100–108.

Cao J, Liu W-JL, Xu X-Y, Zou X-P 2010. Endoscopic findings and clinicopathologic characteristics of colonic schistosomiasis: A report of 46 cases. *World J Gastroenterol* 16: 723.

Capron M, Béghin L, Leclercq C, Labreuche J, Dendooven A, Standaert A, Delbeke M, Porcherie A, Nachury M, Boruchowicz A, Dupas J-L, Fumery M, Paupard T, Catteau S, Deplanque D, Colombel J-F, Desreumaux P 2019. Safety of P28GST, a Protein Derived from a Schistosome Helminth Parasite, in Patients with Crohn's Disease: A Pilot Study (ACROHNEM). *J Clin Med* 9: 41.

Cardoso DT, Magalhães F do C, Enk MJ, Geiger SM, Barbosa DS 2024. Challenges to Schistosomiasis Control Program in Brazil: setbacks in the control program and critical analysis of the disease notification. *Rev Soc Bras Med Trop* 57: e00409.

Cardoso DT, Souza DC de, Castro VN de, Geiger SM, Barbosa DS 2019. Identification of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial analysis approaches in Southeastern Brazil. *BMC Infect Dis* 19: 318.

Carlson M, Raab Y, Peterson C, Hällgren R, Venge P 1999. Increased Intraluminal Release of Eosinophil Granule Proteins Epo, Ecp, Epx, and Cytokines in Ulcerative Colitis and Proctitis in Segmental Perfusion. *Am J Gastroenterol* 94: 1876–1883.

Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden P 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 56: 315–325.

Carvalho EM de, Guimarães LH, Machado PRL, Meireles E, Brito G, Schriefer A, Dourado M 2017. Oral Pentoxifylline Associated with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 96: 1155–1159.

Carvalho J de P, Silva SN, Freire ML, Alves LL, Souza CSA de, Cota G 2022. The cure rate after different treatments for mucosal leishmaniasis in the Americas: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 16: e0010931.

Castro M del M, Cossio A, Navas A, Fernandez O, Valderrama L, Cuervo-Pardo L, Marquez-Oñate R, Gómez MA, Saravia NG 2022. Pentoxifylline in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized Clinical Trial in Colombia. *Pathogens* 11: 378.

Catalano S, Sène M, Diouf ND, Fall CB, Borlase A, Léger E, Bâ K, Webster JP 2018. Rodents as Natural Hosts of Zoonotic *Schistosoma* Species and Hybrids: An Epidemiological and Evolutionary Perspective From West Africa. *J Infect Dis* 218: 429–433.

Cavalcante-Costa VS, Costa-Reginaldo M, Queiroz-Oliveira T, Silva Oliveira AC, Couto NF, Anjos DO dos, Lima-Santos J, Andrade L de O, Horta MF, Castro-Gomes T 2019. Leishmania amazonensis hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. *J Cell Sci* 132.

Chadeka EA, Nagi S, Sunahara T, Cheruiyot NB, Bahati F, Ozeki Y, Inoue M, Osada-Oka M, Okabe M, Hirayama Y, Changoma M, Adachi K, Mwende F, Kikuchi M, Nakamura R, Kalenda YDJ, Kaneko S, Hirayama K, Shimada M, Ichinose Y, Njenga SM, Matsumoto S, Hamano S 2017. Spatial distribution and risk factors of *Schistosoma haematobium* and hookworm infections among schoolchildren in Kwale, Kenya. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005872.

Cheever AW 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull World Health Organ* 39: 328–331.

Chen R, Wang J, Gradinaru I, Vu HS, Geboers S, Naidoo J, Ready JM, Williams NS, DeBerardinis RJ, Ross EM, Collins JJ 2022. A male-derived nonribosomal peptide pheromone controls female schistosome development. *Cell* 185: 1506-1520.e17.

Chen Y-F, Yu S-F, Wu C-Y, Wu N, Shen J, Shen J, Gao J-M, Wen Y-Z, Hide G, Lai D-H, Lun Z-R 2021. Innate Resistance to *Leishmania amazonensis* Infection in Rat Is Dependent on NOS2. *Front Microbiol* 12.

Cherif MS, Keita M, Dahal P, Guilavogui T, Beavogui AH, Diassy L, Conde M, Touré A, Delamou A 2023. Neglected tropical diseases in Republic of Guinea: disease endemicity, case burden and the road towards the 2030 target. *Int Health* 15: 490–504.

Coelho PRS, Ker FTO, Araújo AD, Guimarães RicardoJPS, Negrão-Corrêa DA, Caldeira RL, Geiger SM 2021. Identification of Risk Areas for Intestinal Schistosomiasis, Based on

Malacological and Environmental Data and on Reported Human Cases. *Front Med* 8: 642348.

Coelho PMZ, Mayrink W, Dias M, Pereira LH 1980. Susceptibility to Leishmania mexicana of mice infected with Schistosoma mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 141.

Coêlho ZCB, Teixeira MJ, Mota EF, Frutuoso MS, Silva JS da, Barral A, Barral-Netto M, Pompeu MML 2010. In vitro initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. *Braz J Infect Dis* 14: 476–482.

Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH 2014. Human schistosomiasis. In: *The Lancet*, Lancet Publishing Group, pp. 2253–2264.

Convit J, Castellanos PL, Ulrich M, Castes M, Rondon A, Pinardi ME, Rodriquez N, Bloom BR, Formica S, Valecillos L, Bretana A 1989. Immunotherapy of Localized, Intermediate, and Diffuse Forms of American Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis* 160: 104–115.

Convit J, Pinardi ME, Rondón AJ 1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 603–610.

Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174: 231–235.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães A v, Barreto AC 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 89: 319–323.

Costain AH, Phythian-Adams AT, Colombo SAP, Marley AK, Owusu C, Cook PC, Brown SL, Webb LM, Lundie RJ, Borger JG, Smits HH, Berriman M, MacDonald AS 2022. Dynamics of host immune response development during *Schistosoma mansoni* infection. *Front Immunol* 13: 906338.

Cota F, In L, Pinto BF, Santos-oliveira JR, Da-cruz AM, Pedrosa S, Tafuri WL, Rabello A 2012. Dyarrheal Syndrome in a Patient Co-Infected with *Leishmania infantum* and *Schistosoma mansoni*. *Case Rep Med* 2012: 240512.

Couppié P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, Pradinaud R 2004. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg* 71: 558–560.

Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, Antoine J-C 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci* 115: 2303–2316.

Cullen JM, Stalker MJ 2016. Liver and Biliary System. In: *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2*, Elsevier, pp. 258-352.e1.

DaMata JP, Mendes BP, Maciel-Lima K, Menezes CAS, Dutra WO, Sousa LP, Horta MF 2015. Distinct Macrophage Fates after in vitro Infection with Different Species of Leishmania: Induction of Apoptosis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, but Not by *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *PLoS One* 10: e0141196.

Dantas NM, Andrade LA, Paz WS da, Borges WN, Barbosa VGB, Hora DPG da, Silva CE da, Carmo RF do, Souza CDF de, Santos AD dos, Wanderley FS, Negrão-Corrêa DA, Fujiwara RT, Bezerra-Santos M, Porto WJN 2023. Impact of the COVID-19 pandemic on the actions of the Schistosomiasis Control Program in an endemic area in Northeastern Brazil. *Acta Trop* 240: 106859.

Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski MA 2013. Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in Cryptococcus neoformans Infection (F Dromer, Ed.). *mBio* 4: e00264.

Dennison CL, Oliveira LB de, Fraga LA de O, e Lima RS, Ferreira JA, Clennon JA, Mondesert L de, Stephens J, Magueta EB, Castelo Branco A, Rezende M de C, Negrão-Corrêa D, Faria Grossi MA de, Fairley JK 2021. *Mycobacterium leprae*–helminth co-infections and vitamin D deficiency as potential risk factors for leprosy: A case–control study in south-eastern Brazil. *Int J Infect Dis* 105: 261–266.

Diaz NL, Arvelaez FA, Zerpa O, Tapia FJ 2006. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 31: 114–117.

Díaz NL, Zerpa O, Tapia FJ 2013. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 446–452.

Doenhoff M, Musallam R, Bain J, McGregor A 1978. Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: the immunological dependence of parasite egg excretion. *Immunol* 35: 771–778.

Dolabella SS, Coelho PMZ, Borçari IT, Mello NAST, Andrade Z de A, Silva EF 2007. Morbidity due to *Schistosoma mansoni-Entamoeba histolytica* coinfection in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 170–174.

Dostálová A, Volf P 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* 5: 276.

Du R, Hotez PJ, Al-Salem WS, Acosta-Serrano A 2016. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004545.

Dunne DW, Cooke A 2005. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 5: 420–426.

Dunne DW, Jones FM, Doenhoff MJ 1991. The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (α_1 and ω_1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitol* 103: 225–236.

Egesa M, Lubyayi L, Tukahebwa EM, Bagaya BS, Chalmers IW, Wilson S, Hokke CH, Hoffmann KF, Dunne DW, Yazdanbakhsh M, Labuda LA, Cose S 2018. Schistosoma mansoni schistosomula antigens induce Th1/Pro-inflammatory cytokine responses. *Parasite Immunol* 40: 1–11.

Enk MJ, Lima ACL, Drummond SC, Schall VT, Coelho PMZ 2008. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Trop* 108: 222–228.

Espinoza-Morales D, Lucchetti Rodríguez A, Silva-Caso W, Suarez-Ognio L, Pons MJ, Valle Mendoza J del 2017. An atypical case of disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania peruviana* in the valleys of Ancash-Peru. *Asian Pac J Trop Med* 10: 1101–1103.

Esteves BB, Melo-Braga MN, Gorshkov V, Verano-Braga T, Larsen MR, Gontijo CMF, Quaresma PF, Andrade HM 2022. Characterization of Differentially Abundant Proteins

Among *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strains Isolated From Atypical or Typical Lesions. *Front Cell Infect Microbiol* 12: 824968.

Everts B, Hussaarts L, Driessen NN, Meevissen MHJ, Schramm G, Ham AJ van der, Hoeven B van der, Scholzen T, Burgdorf S, Mohrs M, Pearce EJ, Hokke CH, Haas H, Smits HH, Yazdanbakhsh M 2012. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *J Exp Med* 209: 1753–1767.

Everts B, Perona-Wright G, Smits HH, Hokke CH, Ham AJ van der, Fitzsimmons CM, Doenhoff MJ, Bosch J van der, Mohrs K, Haas H, Mohrs M, Yazdanbakhsh M, Schramm G 2009. Omega-1, a glycoprotein secreted by Schistosoma mansoni eggs, drives Th2 responses . *J Exp Med* 206: 1673–1680.

Falcão SAC, Weinkopff T, Hurrell BP, Celes FS, Curvelo RP, Prates DB, Barral A, Borges VM, Tacchini-Cottier F, Oliveira CI de 2015. Exposure to *Leishmania braziliensis* Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis (S Kamhawi, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003601.

Fallon PG, Richardson EJ, Smith P, Dunne DW 2000. Elevated type 1, diminished type 2 cytokines and impaired antibody response are associated with hepatotoxicity and mortalities during *Schistosoma mansoni* infection of CD4-depleted mice. *Eur J Immunol* 30: 470–480.

Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi Júnior G 1991. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil: further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 499–500.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Schriefer A, Machado PRL, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, Jesus AR de, Carvalho EM, Dutra WO 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 7853–7859.

Faria DR, Souza P. E. A., Durães F v., Carvalho EM, Gollob KJ, Machadp PR, Dutra WO 2009. Recruitment of $CD8^+$ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 432–439.

Favre TC, Beck LCNH, Bezerra FSM, Graeff-Teixeira C, Coelho PMZ, Enk MJ, Katz N, Oliveira RR, Reis MG dos, Pieri OS 2022. Reliability of point-of-care circulating cathodic antigen assay for diagnosing schistosomiasis mansoni in urine samples from an endemic area of Brazil after one year of storage at -20 degrees Celsius. *Rev Soc Bras Med Trop* 55: e0389.

Filardy AA, Pires DR, DosReis GA 2011. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to *Leishmania* infection. *Cell Mol Life Sci* 68: 1863–1870.

Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA 2010. Proinflammatory Clearance of Apoptotic Neutrophils Induces an IL-12^{low}IL-10^{high} Regulatory Phenotype in Macrophages. *J Immunol* 185: 2044–2050.

Fiorott BD, Falqueto A, Sá RT, Moura LA de 2023. Disseminated cutaneous leishmaniasis: lesional polymorphism and late diagnosis in an immunocompetent patient. *J Trop Pathol* 52: 151–157.

Fitzsimmons CM, Schramm G, Jones FM, Chalmers IW, Hoffmann KF, Grevelding CG, Wuhrer M, Hokke CH, Haas H, Doenhoff MJ, Dunne DW 2005. Molecular characterization of omega-1: A hepatotoxic ribonuclease from Schistosoma mansoni eggs. *Mol Biochem Parasitol* 144: 123–127.

Flamme AC la, Scott P, Pearce EJ 2002. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite Immunol* 24: 339–345.

Forestier C-L, Machu C, Loussert C, Pescher P, Späth GF 2011. Imaging Host Cell-*Leishmania* Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process. *Cell Host Microbe* 9: 319–330.

Franke ED, Lucas CM, Tovar AA, Kruger JH, Rivera M v de, Wignall FS 1990. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Acquired in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 43: 260–262.

Frazilio F de O, Borges F de A, Souza AI de, Palumbo MIP, Ramos CA do N, Freire DH, Galvão ALB, Freitas MG de, Barbosa FB 2018. Biomarkers and renal arterial resistive index in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasitol Res* 117: 3399–3405.

Freedman DO, Ottesen EA 1988. Eggs of *Schistosoma mansoni* Stimulate Endothelial Cell Proliferation in Vitro. *J Infect Dis* 158: 556–562.

Freitas CRL, Barbosa Jr AA, Fernandes ALM, Andrade ZA 1999. Pathology of the spleen in hepatosplenic schistosomiasis. Morphometric evaluation and extracellular matrix changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 815–822.

Freites CO, Gundacker ND, Pascale JM, Saldaña A, Diaz-Suarez R, Jimenez G, Sosa N, García E, Jimenez A, Suarez JA 2018. First Case of Diffuse Leishmaniasis Associated With *Leishmania panamensis*. *Open Forum Infect Dis* 5.

Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, Jesus AR de, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ 2006. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol* 63: 70–78.

Gentile R, Costa-Neto SF, D'Andrea PS 2010. A REVIEW ON THE ROLE OF THE WATER-RAT *NECTOMYS SQUAMIPES* ON THE TRANSMISSION DYNAMICS OF MANSONIC SCHISTOSOMIASIS: A LONG TERM MULTIDISCIPLINARY STUDY IN AN ENDEMIC AREA. *Oecologia Australis* 14: 711–725.

Giannini E, Risso D, Botta F, Chiarbonello B, Fasoli A, Malfatti F, Romagnoli P, Testa E, Ceppa P, Testa R 2003. Validity and Clinical Utility of the Aspartate Aminotransferase–Alanine Aminotransferase Ratio in Assessing Disease Severity and Prognosis in Patients With Hepatitis C Virus–Related Chronic Liver Disease. *Arch Intern Med* 163: 218–224.

Gobert GN, Tran MH, Moertel L, Mulvenna J, Jones MK, McManus DP, Loukas A 2010. Transcriptional Changes in *Schistosoma mansoni* during Early Schistosomula Development and in the Presence of Erythrocytes (E Ghedin, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 4: e600.

Gomes EC de S, Mesquitta MCS, Wanderley LB, Melo FL de, Guimarães RJ de PS e, Barbosa CS 2018. Spatial risk analysis on occurrences and dispersal of *Biomphalaria straminea* in and endemic area for schistosomiasis. *J Vector Borne Dis* 55: 208–214.

Gomes DS, Silva Coelho PR, Jesus Mendonça Severino A de, Martins Cirilo T, Moreira Teodoro de Oliveira N, Soeiro Barbosa D, Michael Geiger S 2023. Intestinal schistosomiasis-related mortality in Minas Gerais, Brazil, 2000–2019: Temporal trends and spatial patterns for determining priority areas. *Tropical Medicine & International Health* 28: 215–225.

Gomides TAR, Souza MLM de, Figueiredo AB de, Lima MR, Silveira AMS, Assis GFM de, Fraga LAO, Silveira-Nunes G, Martucci L, Garcia JD, Afonso LCC, Teixeira-Carvalho A, Leite PM 2024. Expression of SmATPDases 1 and 2 in *Schistosoma mansoni* eggs favours IL-10 production in infected individuals. *Parasite Immunol* 46.

Gömöri G 1937. Silver Impregnation of Reticulum in Paraffin Sections. *Am J Pathol* 13: 993–1002.

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 145: 4290–4297.

Gregorio AW, Vasconcellos MRA, Enokihara MMSS, Guerra JM, Nonogaki S, Tomimori J 2019. Cutaneous schistosomiasis and leishmaniasis coinfection: a case report. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 33: 1781–1783.

Grimaldi Jr G, Soares MJ, Moriearty PL 1984. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 6: 397–408.

Gryseels B 2012. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am* 26: 383–397.

Guimarães LH, Machado PRL, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM 2009. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 712–715.

Guimarães LH, Queiroz A, Silva JA, Silva SC, Magalhães V, Lago EL, Machado PRL, Bacellar O, Wilson ME, Beverley SM, Carvalho EM, Schriefer A 2016. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0005100.

Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, Saraiva EM 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Nat Acad Sci* 106: 6748–6753.

Haas W, Grabe K, Geis C, Päch T, Stoll K, Fuchs M, Haberl B, Loy C. 2002. Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine. *Parasitol* 124: 153–167.

Haeberlein S, Obieglo K, Ozir-Fazalalikhan A, Chayé MAM, Veninga H, Vlugt LEPM van der, Voskamp A, Boon L, Haan JMM den, Westerhof LB, Wilbers RHP, Schots A, Schramm G, Hokke CH, Smits HH 2017. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells. *PLoS Pathog* 13: 1–28.

Hams E, Aviello G, Fallon PG 2013. The *Schistosoma* Granuloma: Friend or Foe? *Front Immunol* 4: 1–8.

Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H 2016. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: Clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health* 44.

Hassan MF, Zhang Y, Engwerda CR, Kaye PM, Sharp H, Bickle QD 2006. The *Schistosoma mansoni* Hepatic Egg Granuloma Provides a Favorable Microenvironment for Sustained Growth of *Leishmania donovani*. *Am J Pathol* 169: 943–953.

He YX, Salafsky B, Ramaswamy K 2005. Comparison of skin invasion among three major species of *Schistosoma*. *Trends Parasitol* 21: 201–203.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169: 59–72.

Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Förster I, Brombacher F 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20: 623–635.

Hesse M, Modolell M, Flamme AC la, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA 2001. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. *J Immunol* 167: 6533–6544.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA 2004. The Pathogenesis of Schistosomiasis Is Controlled by Cooperating IL-10-Producing Innate Effector and Regulatory T Cells. *J Immunol* 172: 3157–3166.

Heyde S, Philipsen L, Formaglio P, Fu Y, Baars I, Höbbel G, Kleinholz CL, Seiß EA, Stettin J, Gintschel P, Dudeck A, Bousso P, Schraven B, Müller AJ 2018. CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient *Leishmania* proliferation and cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog* 14: e1007374.

Hockley DJ, McLaren DJ 1973. *Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *Int J Parasitol* 3: 13–20.

Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA 2000. IL-10 and the Dangers of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. *J Immunol* 164: 6406–6416.

Hurdayal R, Ndlovu HH, Revaz-Breton M, Parihar SP, Nono JK, Govender M, Brombacher F 2017. IL-4–producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2-controlled diseases. *Proc Natl Acad Sci* 114.

Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I 2001. The Inhibition of Arginase by Nω-Hydroxy-L-Arginine Controls the Growth of *Leishmania* Inside Macrophages. *J Exp Med* 193: 777–784.

Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I 2002. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 24: 113–118.

Ismail M, Bennett JL, Tao L-F, Farghaly A, Bruce J, Metwally A 1996. Characterization of Isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian Villagers that Tolerate High Doses of Praziquantel. *Am J Trop Med Hyg* 55: 214–218.

James SL, Cook KW, Lazdins JK 1990. Activation of human monocyte-derived macrophages to kill schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro. *J Immunol* 145: 2686–2690.

Jeremias WDJ, Araújo FMG, Queiroz FR, Pais FSM, Mattos ACA De, Salim ACDM, Coelho PMZ, Oliveira GC, Kusel JR, Guerra-Sá R, Coimbra RS, Babá ÉH 2017. Comparative

sequence analysis reveals regulation of genes in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni* exposed to host portal serum. *PLoS One* 12: e0178829.

Ji J, Sun J, Soong L 2003. Impaired Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines at Early Stages of Infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 71: 4278–4288.

Johari NA, Annuzaili DA, El-Talabawy HF, Ba-Break M, Al-Mekhlafi AM, Al-Eryani S, Alkohlani AA, Gabrielli AF, Ben-Ismail R, Alhaidari S, Muaydh A, Alshami R, Gunaid M Al, Hamed A, Kamel N, Palacio K, Fleming F, French MD 2022. National mapping of schistosomiasis, soil-transmitted helminthiasis and anaemia in Yemen: Towards better national control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 16: e0010092.

Junqueira LCU, Junqueira LMMS 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo Editora, São Paulo.

Kane MM, Mosser DM 2001. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *J Immunol* 166: 1141–1147.

Katz N 2018. *Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses*. CPqRR, Belo Horizonte.

Khayeka–Wandabwa C, Kutima HL, Nyambati VCS, Ingonga J, Oyoo–Okoth E, Karani LW, Jumba B, Githuku KS, Anjili CO 2013. Combination therapy using Pentostam and Praziquantel improves lesion healing and parasite resolution in BALB/c mice co-infected with *Leishmania major* and *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors* 6: 244.

Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* Complex Amastigotes via the Fc Receptor Is Required to Sustain Infection in Murine Cutaneous Leishmaniasis. *J Exp Med* 191: 1063–1068.

Kincaid-Smith J, Tracey A, Carvalho Augusto R de, Bulla I, Holroyd N, Rognon A, Rey O, Chaparro C, Oleaga A, Mas-Coma S, Allienne J-F, Grunau C, Berriman M, Boissier J, Toulza E 2021. Morphological and genomic characterisation of the *Schistosoma* hybrid infecting humans in Europe reveals admixture between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis*. *PLOS Negl Trop Dis* 15: e0010062.

Koh CC, Wardini AB, Vieira M, Passos LSA, Martinelli PM, Neves EGA, Antonelli LR do V, Barbosa DF, Velikkakam T, Gutseit E, Menezes GB, Giunchetti RC, Machado PRL,

Carvalho EM, Gollob KJ, Dutra WO 2020. Human CD8+ T Cells Release Extracellular Traps Co-Localized With Cytotoxic Vesicles That Are Associated With Lesion Progression and Severity in Human Leishmaniasis. *Front Immunol* 11.

Kokaliaris C, Garba A, Matuska M, Bronzan RN, Colley DG, Dorkenoo AM, Ekpo UF, Fleming FM, French MD, Kabore A, Mbonigaba JB, Midzi N, Mwinzi PNM, N'Goran EK, Polo MR, Sacko M, Tchuem Tchuenté L-A, Tukahebwa EM, Uvon PA, Yang G, Wiesner L, Zhang Y, Utzinger J, Vounatsou P 2022. Effect of preventive chemotherapy with praziquantel on schistosomiasis among school-aged children in sub-Saharan Africa: a spatiotemporal modelling study. *Lancet Infect Dis* 22: 136–149.

Kunutsor SK 2016. Gamma-glutamyltransferase—friend or foe within? *Liver Int* 36: 1723–1734.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 199: 309–320.

Lampinen M, Carlson M, Sangfelt P, Taha Y, Thörn M, Lööf L, Raab Y, Venge P 2001. IL-5 and TNF-alpha participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 46: 2004–2009.

Layland LE, Rad R, Wagner H, da Costa CUP 2007. Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. *Eur J Immunol* 37: 2174–2184.

Layoun A, Samba M, Santos MM 2015. Isolation of Murine Peritoneal Macrophages to Carry Out Gene Expression Analysis Upon Toll-like Receptors Stimulation. *J Vis Exp*: 52749.

Lee SH, Chaves MM, Kamenyeva O, Gazzinelli-Guimaraes PH, Kang B, Pessenda G, Passelli K, Tacchini-Cottier F, Kabat J, Jacobsen EA, Nutman TB, Sacks DL 2020. M2-like, dermal macrophages are maintained via IL-4/CCL24–mediated cooperative interaction with eosinophils in cutaneous leishmaniasis. *Sci Immunol* 5.

Leger E, Webster JP 2017. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitol* 144: 65–80.

Lejoly-Boisseau H, Appriou M, Seigneur M, Pruvost A, Tribouley-Duret J, Tribouley J 1999. *Schistosoma mansoni*: In Vitro Adhesion of Parasite Eggs to the Vascular Endothelium.

Subsequent Inhibition by a Monoclonal Antibody Directed to a Carbohydrate Epitope. *Exp Parasitol* 91: 20–29.

Leonard TB, Neptun DA, Popp JA 1984. Serum gamma glutamyl transferase as a specific indicator of bile duct lesions in the rat liver. *Am J Pathol* 116: 262–269.

Leopoldo PTG, Machado PRL, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, Ribeiro de Jesus A, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM 2006. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis* 6.

Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz ÁA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM 2001. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65: 87–89.

Lestinova T, Rohousova I, Sima M, Oliveira CI de, Volf P 2017. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania* (G Milon, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005600.

Liao Z-X, Fa Y-C, Kempson IM, Tseng S-J 2019. Repolarization of M2 to M1 Macrophages Triggered by Lactate Oxidase Released from Methylcellulose Hydrogel. *Bioconjug Chem* 30: 2697–2702.

Liew FY, Li Y, Millott S 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145: 4306–4310.

Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers M v., Moncada S 1991. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Immunol* 21: 3009–3014.

Lima CMF de, Magalhães AS, Costa R, Barreto CC, Machado PRL, Carvalho EM, Lessa MM, Carvalho LP 2021. High Anti-*Leishmania* IgG Antibody Levels Are Associated With Severity of Mucosal Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* 11.

Liu SX, Gustafson HH, Jackson DL, Pun SH, Trapnell C 2020. Trajectory analysis quantifies transcriptional plasticity during macrophage polarization. *Sci Rep* 10: 12273.

Llewellyn BD 1970. An improved Sirius red method for amyloid. *J Med Lab Technol* 27: 308–309.

Loeffler DA, Lundy SK, Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL 2002. Soluble Egg Antigens from *Schistosoma mansoni* Induce Angiogenesis-Related Processes by Up-Regulating Vascular Endothelial Growth Factor in Human Endothelial Cells. *J Infect Dis* 185: 1650–1656.

Lopes DM, Almeida TVVS de, Souza R da P de, Ribeiro LEV, Page B, Fernandes J de S, Carvalho EM, Cardoso LS 2018. Susceptibility of dendritic cells from individuals with schistosomiasis to infection by *Leishmania braziliensis*. *Mol Immunol* 93: 173–183.

Lopes DM, Fernandes JS, Cardoso TM de S, Bafica AMB, Oliveira SC, Carvalho EM, Araujo MI, Cardoso LS 2014. Dendritic Cell Profile Induced by *Schistosoma mansoni* Antigen in Cutaneous Leishmaniasis Patients. *Biomed Res Int* 2014: 1–10.

Lopes DM, Oliveira SC, Page B, Carvalho LP, Carvalho EM, Cardoso LS 2019. *Schistosoma mansoni* rSm29 Antigen Induces a Regulatory Phenotype on Dendritic Cells and Lymphocytes From Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol* 9: 3122.

Lukeš J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, Kuhls K, Tintaya KWQ, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci* 104: 9375–9380.

Lutz A 1918. Caramujos de agua doce do genero *Planorbis*, observados no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 10: 65–82.

Lutz A 1919. O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo observações, feitas no Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11: 121–155.

Lyke KE, Dicko A, Dabo A, Sangare L, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, Traore K, Daou M, Diarra I, Sztein MB, Plowe C V, Doumbo OK 2005. Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute *Plasmodium falciparum* malaria in Malian children. *Am J Trop Med Hyg* 73: 1124–1130.

Machado PR, Rosa MEA, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, Teixeira MM, Bacellar O, Carvalho EM 2011. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: In situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 438–444.

Magalhães A, Carvalho LP, Costa R, Pita MS, Cardoso TM, Machado PRL, Carvalho EM, Arruda S, Carvalho AM 2021. Anti-Leishmania IgG is a marker of disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Int J Infect Dis* 106: 83–90.

Maggi L, Rocha IC, Camelo GMA, Fernandes VR, Negrão-Corrêa D 2021. The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with *Schistosoma mansoni* in mice. *Cytokine* 138: 155390.

Malta KK, Palazzi C, Neves VH, Aguiar Y, Silva TP, Melo RCN 2022. Schistosomiasis Mansoni-Recruited Eosinophils: An Overview in the Granuloma Context. *Microorganisms* 10: 2022.

Mangoud AM, Ramadan ME, Morsy TA, Amin AM, Mostafa SM 1998. The histopathological picture of the liver of hamsters experimentally infected with Leishmania D. infantum on top of Schistosoma mansoni infection. *J Egypt Soc Parasitol* 28: 101–117.

Mangoud AM, Ramadan ME, Morsy TA, Mostafa SM 1997. Immunological pattern in Syrian golden hamsters experimentally infected with Schistosoma mansoni and Leishmania d. infantum. *J Egypt Soc Parasitol* 27: 497–504.

Mansour MM, Farid Z, Bassily S, Salah LH, Watten RH 1982. Serum enzyme tests in hepatosplenic schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76: 109–111.

Marques P da S, Fonseca-Martins AM da, Carneiro MPD, Amorim NRT, Pão CRR de, Canetti C, Diaz BL, Matos Guedes HL de, Bandeira-Melo C 2021. Eosinophils increase macrophage ability to control intracellular *Leishmania amazonensis* infection via PGD2 paracrine activity in vitro. *Cell Immunol* 363: 104316.

Martins-Melo FR, Carneiro M, Ramos AN, Heukelbach J, Ribeiro ALP, Werneck GL 2018. The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016 (A Angheben, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006559.

Martins-Melo FR, Lima M da S, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J 2014a. Mortality and Case Fatality Due to Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Nationwide Analysis of Epidemiology, Trends and Spatial Patterns. *PLoS One* 9: e93770.

Martins-Melo FR, Pinheiro MCC, Ramos AN, Alencar CH, Bezerra FS de M, Heukelbach J 2014b. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011. *Int J Parasitol* 44: 1055–1062.

Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J 2016. Trends and spatial patterns of mortality related to neglected tropical diseases in Brazil. *Parasite Epidemiol Control* 1: 56–65.

Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Lange W, Heukelbach J 2012. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. *Tropical Medicine & International Health* 17: 1066–1075.

Marzochi MC de A, Marzochi KBF 1994. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthropozoonosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10: S359–S375.

Masson PJ 1929. Trichrome Stainings and their Preliminary Techniques. *J Tech Met* 12: 75.

McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou X-N 2018. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers* 4: 13.

McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP 2010. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 59: 1265–1269.

Mebius MM, Genderen PJJ van, Urbanus RT, Tielens AGM, Groot PG de, Hellemond JJ van 2013. Interference with the Host Haemostatic System by Schistosomes. *PLoS Pathog* 9: e1003781.

Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, Mutuku MW, Karanja DMS, Colley DG, Black CL, Secor WE, Mkoji GM, Loker ES 2009. Reduced Susceptibility to Praziquantel among Naturally Occurring Kenyan Isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e504.

Mendonça MG, Brito MEF de, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC 2004. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? *J Infect Dis* 189: 1018–1023.

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

Meyerholz DK, Griffin MA, Castilow EM, Varga SM 2009. Comparison of Histochemical Methods for Murine Eosinophil Detection in an RSV Vaccine-enhanced Inflammation Model. *Toxicol Pathol* 37: 249–255.

Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201: 747–754.

Miranda GS, Resende SD, Cardoso DT, Camelo GMA, Silva JKAO, Castro VN de, Geiger SM, Carneiro M, Negrão-Corrêa D 2021. Previous History of American Tegumentary Leishmaniasis Alters Susceptibility and Immune Response Against *Schistosoma mansoni* Infection in Humans. *Front Immunol* 12: 630934.

Miranda GS, Rodrigues JGM, Lira MGS, Nogueira RA, Gomes GCC, Silva-Souza N 2015. MONITORING POSITIVITY FOR *Schistosoma mansoni* IN RODENTS *Holochilus* sp. NATURALLY INFECTED. *Ciência Animal Brasileira* 16: 456–463.

Miranda GS, Rodrigues JGM, Silva JKA de O, Camelo GMA, Silva-Souza N, Neves RH, Machado-Silva JR, Negrão-Corrêa DA 2022. New challenges for the control of human schistosomiasis: The possible impact of wild rodents in Schistosoma mansoni transmission. *Acta Trop* 236: 106677.

Momen H, Cupolillo E 2000. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 583–588.

Moore D V., Sandground JH 1956. The Relative Egg Producing Capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Am J Trop Med Hyg* 5: 831–840.

Moran PAP 1948. The Interpretation of Statistical Maps. *J R Stat Soc* 10: 243–251.

Muxel SM, Aoki JI, Fernandes JCR, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Acuña SM, Müller KE, Vanderlinde RH, Floeter-Winter LM 2018. Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection. *Front Microbiol* 8: 1–15.

Naiff RD, Talhari S, Barrett T v. 1988. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 529–530.

Neves RL, Ker FTO, Dutra-Rêgo F, Rugani JMN, Andrade Filho JD, Soares RP, Gontijo CMF 2023. Increased Risk of American Tegumentary Leishmaniasis in an Urban and Rural Area of Caratinga, Brazil between 2016 and 2021. *Am J Trop Med Hyg* 109: 791–803.

Newlove T, Guimarães LH, Morgan DJ, Alcântara L, Glesby MJ, Carvalho EM, Machado PR 2011. Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 551–555.

Novais FO, Nguyen BT, Scott P 2021. Granzyme B Inhibition by Tofacitinib Blocks the Pathology Induced by CD8 T Cells in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 141: 575–585.

Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn DA 1999. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 163: 6712–6717.

Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA 2001. Lacto-N-fucopentaose III Found on *Schistosoma mansoni* Egg Antigens Functions as Adjuvant for Proteins by Inducing Th2-Type Response. *J Immunol* 167: 442–450.

Oliveira WJ, Magalhães F do C, Elias AMS, Castro VN de, Favero V, Lindholz CG, Oliveira ÁA, Barbosa FS, Gil F, Gomes MA, Graeff-Teixeira C, Enk MJ, Coelho PMZ, Carneiro M, Negrão-Corrêa DA, Geiger SM 2018. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test (L van Lieshout, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006232.

Omran SA, El-Bassiouni NE, Hussein NA, Akl MM, Hussein AT, Mohamed AA 1995. Disseminated Intravascular Coagulation in Endemic Hepatosplenic Schistosomiasis. *Haemostasis* 25: 218–228.

O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM 2007. Influence of Helminth Infections on the Clinical Course of and Immune Response to *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 142–148.

Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT 1998. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. *Am J Trop Med Hyg* 59: 49–52.

Oyana TJ, Margai FM 2016. *Spatial Analysis: Statistics, Visualization, and Computational Methods*. CRC Press, Boca Raton.

Paltrinieri S, Mangiagalli G, Ibba F 2018. Use of urinary γ-glutamyl transferase (GGT) to monitor the pattern of proteinuria in dogs with leishmaniasis treated with N-methylglucamine antimoniate. *Res Vet Sci* 119: 52–55.

Paran Y 2018. Massive Splenomegaly: A Case Report of Visceral Leishmania and Schistosomiasis Co-infection and a Review of Infectious Causes of Massive Splenomegaly. *Clin Case Rep Rev* 4: 1–3.

Pearson RD, Sousa A d. Q 1996. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 22: 1–13.

Pêgo B, Martinusso CA, Bernardazzi C, Ribeiro BE, Fernandes A, Cunha DA, Mesquita JDS, Nanini HF, Souza HSP De 2019. Schistosoma mansoni Coinfection Attenuates Murine Toxoplasma gondii -Induced Crohn ' s-Like Ileitis by Preserving the Epithelial Barrier and Downregulating the Inflammatory Response. *Front Immunol* 10: 1–16.

Pellegrino J, Macedo DG 1955. A Simplified Method for the Concentration of Cercariae. *J Parasitol* 41: 329.

Pellegrino J, Siqueira A 1956. Técnica de perfusão para colheita de *S. mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 8: 585–597.

Pereira LIA, Dorta ML, Pereira AJCS, Bastos RP, Oliveira MAP, Pinto SA, Galdino H, Mayrink W, Barcelos W, Toledo VPCP, Lima GMCA, Ribeiro-Dias F 2009a. Increase of NK Cells and Proinflammatory Monocytes Are Associated with the Clinical Improvement of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis after Immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* Antigens. *Am J Trop Med Hyg* 81: 378–383.

Pereira CG, Silva ALN, Castilhos P de, Mastrantonio EC, Souza RA, Romão RP, Rezende RJ, Pena JDO, Beletti ME, Souza MA 2009b. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol* 165: 231–240.

Perera DJ, Koger-Pease C, Paulini K, Daoudi M, Ndao M 2024. Beyond schistosomiasis: unraveling co-infections and altered immunity. *Clin Microbiol Rev*: e0009823.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D 2008. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science (1979)* 321: 970–974.

Petersen C, Ghosh M, Gibson K, Patten C, Mukbel RM, Jones DE 2007. MACROPHAGE KILLING OF *LEISHMANIA AMAZONENSIS* AMASTIGOTES REQUIRES BOTH NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE. *Am J Trop Med Hyg* 76: 669–675.

Petersen EA, Neva FA, Oster CN, Diaz HB 1982. Specific Inhibition of Lymphocyte-Proliferation Responses by Adherent Suppressor Cells in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *New Engl J Med* 306: 387–392.

Pieri OS, Bezerra FSM, Coelho PMZ, Enk MJ, Favre TC, Graeff-Teixeira C, Oliveira RR, Reis MG dos, Andrade LS de A, Beck LCNH, Favero V, Fialho TR de S, Guimarães RJ de PS e, Oliveira BSS, Pascoal VF, Pinheiro MCC, Santos RA dos, Silva LK, Siqueira IC de, Souza RP de, Katz N 2023. Accuracy of the urine point-of-care circulating cathodic antigen assay for diagnosing Schistosomiasis mansoni infection in Brazil: A multicenter study. *Rev Soc Bras Med Trop* 56: 0238.

Pinheiro MCC, Ferreira AF, Silva Filho JD da, Lima M da S, Martins-Melo FR, Bezerra FSM, Sousa MS, Ramos AN 2020. Burden of schistosomiasis-related mortality in Brazil: epidemiological patterns and spatial–temporal distribution, 2003–2018. *Trop Med Int Health* 25: 1395–1407.

Pinheiro RO, Pinto EF, Benedito AB, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2004. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *An Acad Bras Cienc* 76: 519–527.

Pinto MOKM, Oliveira TM de, Aguiar AN de A, Pinto PEM, Barbosa DS, Diniz S de A, Silva MX 2020. Profile of American tegumentary leishmaniasis in transmission areas in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2007 to 2017. *BMC Infect Dis* 20: 163.

Pirajá da Silva M 1909. La schistosomose à Bahia. *Arch Parasitol* 13: 83–302.

Pirajá da Silva M 1912. Cercaire brésilienne (Cercaria blanchardi) à queue bifurquèe. *Arch Parasitol* 15: 398–400.

Plager DA, Davis MDP, Andrews AG, Coenen MJ, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM 2009. Eosinophil Ribonucleases and Their Cutaneous Lesion-Forming Activity. *J Immunol* 183: 4013–4020.

Pompeu ML, Freitas LA, Santos MLV, Khouri M, Barral-Netto M 1991. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Trop* 48: 185–193.

Prajeeth CK, Haeberlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C 2011. Leishmania-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity (JH Adams, Ed.). *Infect Immun* 79: 2699–2708.

Quaresma PF, Brito CFA de, Rugani JMN, Freire J de M, Baptista R de P, Moreno EC, Gontijo RC, Rego FD, Diniz JE, Melo MN, Gontijo CMF 2018. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. *Parasitol* 145: 1161–1169.

Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* 5: 1–10.

Real F, Florentino PTV, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PST, Goto H, Mortara RA 2014. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cell Microbiol* 16: 1549–1564.

Rêgo FD, Cardoso C d. A, Moreira POL, Nogueira PM, Araújo MS, Borges VM, Laurenti MD, Bartholomeu DC, Reis AB, Monte-Neto RL d., Soares RP 2022. *Leishmania amazonensis* from distinct clinical forms/hosts has polymorphisms in Lipophosphoglycans, displays variations in immunomodulatory properties and, susceptibility to antileishmanial drugs. *Cell Biol Int* 46: 1947–1958.

Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581–596.

Renninger ML, Seymour RE, Whiteley LO, Sundberg JP, HogenEsch H 2010. Anti-IL5 decreases the number of eosinophils but not the severity of dermatitis in Sharpin-deficient mice. *Exp Dermatol* 19: 252–258.

Resende SD, Magalhães FC, Rodrigues-Oliveira JL, Castro VN, Souza CSA, Oliveira EJ, Carneiro M, Geiger SM, Negrão-Corrêa DA 2019. Modulation of Allergic Reactivity in Humans Is Dependent on *Schistosoma mansoni* Parasite Burden, Low Levels of IL-33 or TNF-α and High Levels of IL-10 in Serum. *Front Immunol* 9: 3158.

Reynolds SR, Harn DA 1992. Comparison of irradiated-cercaria schistosome vaccine models that use 15- and 50-kilorad doses: the 15-kilorad dose gives greater protection, smaller liver sizes, and higher gamma interferon levels after challenge. *Infect Immun* 60: 90–94.

Rezende MC de, Araújo ES, Moreira JMP, Rodrigues VF, Rodrigues JL, Pereira CA de J, Negrão-Corrêa D 2015. Effect of different stages of *Schistosoma mansoni* infection on the parasite burden and immune response to *Strongyloides venezuelensis* in co-infected mice. *Parasitol Res* 114: 4601–4616.

Rezende MC de, Moreira JMP, Fernandes LLM, Rodrigues VF, Negrão-Corrêa D 2020. *Strongyloides venezuelensis*-infection alters the profile of cytokines and liver inflammation in mice co-infected with *Schistosoma mansoni*. *Cytokine* 127: 154931.

Ridi R El, Tallima H, Mahana N, Dalton JP 2010. Innate immunogenicity and in vitro protective potential of Schistosoma mansoni lung schistosomula excretory-secretory candidate vaccine antigens. *Microbes Infect* 12: 700–709.

Ritter DM, McKerrow JH 1996. Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. *Infect Immun* 64: 4706–4713.

Ritter U, Moll H, Laskay T, Bröcker EB, Velazco O, Becker I, Gillitzer R 1996. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 173: 699–709.

Roberts M, Butterworth AE, Kimani G, Kamau T, Fulford AJ, Dunne DW, Ouma JH, Sturrock RF 1993. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect Immun* 61: 4984–4993.

Rocha MOC, Rocha RL, Pedroso ÊRP, Greco DB, Ferreira CS, Lambertucci JR, Katz N, Rocha RS, Rezende DF, Neves J 1995. Pulmonary manifestations in the initial phase of schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 311–318.

Rodríguez OL, Lugo DA, Cabrera M, Sánchez MA, Zerpa O, Tapia FJ 2021. Innate lymphoid cells in peripheral blood of patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *Exp Dermatol* 30: 982–987.

Rogers ME, Chance ML, Bates PA 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol* 124: 495–507.

Romano A, Carneiro MBH, Doria NA, Roma EH, Ribeiro-Gomes FL, Inbar E, Lee SH, Mendez J, Paun A, Sacks DL, Peters NC 2017. Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major* (P Loke, Ed.). *PLoS Pathog* 13: e1006479.

Ronet C, Voigt H, Himmelrich H, Doucey M-A, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Tacchini-Cottier F, Bron C, Louis J, Launois P 2008. *Leishmania major* -Specific B Cells Are Necessary for Th2 Cell Development and Susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c Mice. *J Immunol* 180: 4825–4835.

Roy S, Kumar GA, Jafurulla Md, Mandal C, Chattopadhyay A 2014. Integrity of the Actin Cytoskeleton of Host Macrophages is Essential for *Leishmania donovani* Infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838: 2011–2018.

Rugani JN, Quaresma PF, Gontijo CF, Soares RP, Monte-Neto RL 2018. Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. *Biomed Pharmacother* 108: 1170–1180.

Ruiz-Postigo JA, Jain S, Madjou S, Agua JF V, Maia-Elkhoury AN, Valadas S, Warusavithana S, Osman M, Yajima A, Lin Z, Beshah A 2023. Global leishmaniasis surveillance, 2022: assessing trends over the past 10 years. *Wkly Epidemiol Rec* 98: 471–487.

Ruiz-Postigo JA, Jain S, Madjou S, Maia-Elkhoury AN, Valadas S, Warusavithana S, Osman M, Yajima A, Lin Z, Beshahe A, Kim S 2022. Global leishmaniasis surveillance: 2021, assessing the impact of the COVID-19 pandemic. *Wkly Epidemiol Rec* 97: 575–590.

Saidu U, Ibrahim MA, Koning HP de, McKerrow JH, Caffrey CR, Balogun EO 2023. Human schistosomiasis in Nigeria: present status, diagnosis, chemotherapy, and herbal medicines. *Parasitol Res* 122: 2751–2772.

Salaiza-Suazo N, Porcel-Aranibar R, Cañeda-Guzmán IC, Ruiz-Remigio A, Zamora-Chimal J, Delgado-Domínguez J, Cervantes-Sarabia R, Carrada-Figueroa G, Sánchez-Barragán B, Leal-Ascencio VJ, Pérez-Torres A, Rodríguez-Martínez HA, Becker I 2024. Eosinophils of patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis: Differential response to *Leishmania mexicana*, with insights into mechanisms of damage inflicted upon the parasites by eosinophils. *PLoS One* 19: e0296887.

Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* 173: 49–54.

Sarin SK, Mosca P, Sabbà C, Groszmann RJ 1991. Hyperdynamic circulation in a chronic murine schistosomiasis model of portal hypertension. *Hepatol* 13: 581–584.

Sasse C, Barinberg D, Obermeyer S, Debus A, Schleicher U, Bogdan C 2022. Eosinophils, but Not Type 2 Innate Lymphoid Cells, Are the Predominant Source of Interleukin 4 during the Innate Phase of *Leishmania major* Infection. *Pathogens* 11: 828.

Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira A V, Araujo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB 1998. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 58: 824–827.

Schwartz C, Fallon PG 2018. Schistosoma “Eggs-Iting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Front Immunol* 9: 2492.

Schwarz T, Remer KA, Nahrendorf W, Masic A, Siewe L, Müller W, Roers A, Moll H 2013. T Cell-Derived IL-10 Determines Leishmaniasis Disease Outcome and Is Suppressed by a Dendritic Cell Based Vaccine. *PLoS Pathog* 9: e1003476.

Scorza B, Carvalho E, Wilson M 2017. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci* 18: 1296.

Scott P, Novais FO 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 16: 581–592.

Serafim TD, Coutinho-Abreu I v., Dey R, Kissinger R, Valenzuela JG, Oliveira F, Kamhawi S 2021. Leishmaniasis: the act of transmission. *Trends Parasitol* 37: 976–987.

Serafim TD, Coutinho-Abreu I V., Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG 2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol* 3: 548–555.

Seymour RE, Hasham MG, Cox GA, Shultz LD, HogenEsch H, Roopenian DC, Sundberg JP 2007. Spontaneous mutations in the mouse Sharpin gene result in multiorgan inflammation, immune system dysregulation and dermatitis. *Genes Immun* 8: 416–421.

Shariati F, Pérez-Arellano JL, Carranza C, López-Abán J, Vicente B, Arefi M, Muro A 2011. Evaluation of the role of angiogenic factors in the pathogenesis of schistosomiasis. *Exp Parasitol* 128: 44–49.

Shen Q, Tan SS, Wang Z, Cai S, Pang W, Peng C, Chen Y 2020. Combination of gamma-glutamyl transferase and liver stiffness measurement for biliary atresia screening at different ages: a retrospective analysis of 282 infants. *BMC Pediatr* 20: 276.

Silva LE de O, Wanderley FS 2022. Analysis of the Schistosomiasis Control Program in the reduction of epidemiological indicators of the disease in Brazil, from 1995 to 2017. *Rev Pan-Amaz Saúde* 13.

Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Corrêa A, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D 2002. Infection with *Strongyloides venezuelensis* Induces Transient Airway Eosinophilic Inflammation, an Increase in Immunoglobulin E, and Hyperresponsiveness in Rats. *Infect Immun* 70: 6263–6272.

Simon D, Braathen LR, Simon H -U. 2004. Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy* 59: 561–570.

Smithers SR, Gammage K 1980. Recovery of *Schistosoma mansoni* from the skin, lungs and hepatic portal system of naive mice and mice previously exposed to *S. mansoni*: evidence for two phases of parasite attrition in immune mice. *Parasitol* 80: 289–300.

Smithers SR, Miller KL 1980. Protective Immunity in Murine Schistosomiasis Mansoni: Evidence for Two Distinct Mechanisms. *Am J Trop Med Hyg* 29: 832–841.

Sokhna C, Hesran JY Le, Mbaye PA, Akiana J, Camara P, Diop M, Ly A, Druilhe P 2004. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Malar J* 3: 3–7.

Sousa LMA, Carneiro MBH, Resende ME, Martins LS, Santos LM dos, Vaz LG, Mello PS, Mosser DM, Oliveira MAP, Vieira LQ 2014. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 36: 13–31.

Sousa A de Q, Parise ME, Pompeu MML, Coelho Filho JM, Vasconcelos IAB, Lima JWO, Oliveira EG, Vasconcelos AW, David JR, Maguire JH 1995. Bubonic Leishmaniasis: A Common Manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection in Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 53: 380–385.

Souza COS, Gardinassi LG, Rodrigues V, Faccioli LH 2020. Monocyte and Macrophage-Mediated Pathology and Protective Immunity During Schistosomiasis. *Front Microbiol* 11: 1–9.

Souza AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, Oliveira CI de, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A 2013. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. *PLoS One* 8: e66110.

Stelma FF, Talla I, Sow S, Kongs A, Niang M, Polman K, Deelder AM, Gryseels B 1995. Efficacy and Side Effects of Praziquantel in an Epidemic Focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 53: 167–170.

Stirling RG, Rensen ELJ Van, Barnes PJ, Fan Chung K 2001. Interleukin-5 Induces $CD34^{+}$ Eosinophil Progenitor Mobilization and Eosinophil CCR3 Expression in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1403–1409.

Takaki KK, Rinaldi G, Berriman M, Pagán AJ, Ramakrishnan L 2021. *Schistosoma mansoni* Eggs Modulate the Timing of Granuloma Formation to Promote Transmission. *Cell Host Microbe* 29: 58–67.

Tavares N, Afonso L, Suarez M, Ampuero M, Prates DB, Araújo-Santos T, Barral-Netto M, DosReis GA, Borges VM, Brodskyn C 2016. Degranulating Neutrophils Promote Leukotriene B 4 Production by Infected Macrophages To Kill *Leishmania amazonensis* Parasites. *The Journal of Immunology* 196: 1865–1873.

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ 2006. Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Population. *J Immunol* 176: 5839–5847.

Thorstenberg ML, Martins MDA, Oliveira NF, Monteiro MMLV, Santos GustavoRC, Pereira HenriqueMG, Savio LEB, Coutinho-Silva R, Silva CLM 2024. Altered purinergic P2X7 and A2B receptors signaling limits macrophage-mediated host defense in schistosomiasis. *Biomed J*: 100713.

Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 7: 545–555.

Tomiotto-Pellissier F, Miranda-Sapla MM, Silva TF, Bortoleti BT da S, Gonçalves MD, Concato VM, Rodrigues ACJ, Detoni MB, Staurengo-Ferrari L, Verri WA, Costa IN, Panis C, Conchon-Costa I, Bordignon J, Pavanelli WR 2021. Murine Susceptibility to *Leishmania amazonensis* Infection Is Influenced by Arginase-1 and Macrophages at the Lesion Site. *Front Cell Infect Microbiol* 11.

Tschoeke DA, Nunes GL, Jardim R, Lima J, Dumaresq ASR, Gomes MR, Mattos Pereira L De, Loureiro DR, Stoco PH, Matos Gliedes HL De, Miranda AB De, Ruiz J, Pitaluga A, Silva FP, Probst CM, Dickens NJ, Mottram JC, Grisard EC, Dávila AMR 2014. The Comparative Genomics and Phylogenomics of *Leishmania amazonensis* Parasite. *Evol Bioinform* 10: EBO.S13759.

Tsikas D 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B* 851: 51–70.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson, Jr. WD, Carvalho EM 2002. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. *J Infect Dis* 186: 1829–1834.

Turner JD, Jenkins GR, Hogg KG, Aynsley SA, Paveley RA, Cook PC, Coles MC, Mountford AP 2011. CD4+CD25+ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5.

Turner JD, Narang P, Coles MC, Mountford AP 2012. Blood Flukes Exploit Peyer's Patch Lymphoid Tissue to Facilitate Transmission from the Mammalian Host. *PLoS Pathog* 8.

Unger A, O'Neal S, Machado PRL, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM 2009. Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 80: 574–579.

Valladares JE, Riera C, Pastor J, Gállego M, Portús M, Arboix M 1997. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 141: 574–575.

Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, Gam AA, Neva FA 1989. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 41: 280–288.

Velasquez LG, Galuppo MK, Rezende E de, Brandão WN, Peron JP, Uliana SRB, Duarte MI, Stolf BS 2016. Distinct courses of infection with *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitol* 143: 692–703.

Vilar-Gomez E, Calzadilla-Bertot L, Wai-Sun Wong V, Castellanos M, Aller-de la Fuente R, Metwally M, Eslam M, Gonzalez-Fabian L, Alvarez-Quiñones Sanz M, Conde-Martin AF, Boer B De, McLeod D, Hung Chan AW, Chalasani N, George J, Adams LA, Romero-Gomez M 2018. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study. *Gastroenterol* 155: 443-457.e17.

Villanueva POF, Harris TS, Ricklan DE, Stadecker MJ 1994. Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes in vitro and down-regulate schistosomal granulomatous disease in vivo. *J Immunol* 152: 1847–1855.

Villela F, Pestana BR, Pessoa SB 1939. Presença da *Leishmania braziliensis* na mucosa nasal sem lesão aparente em casos recentes de leishmaniose cutânea. *O Hospital* 16: 953–960.

Vries HJC de, Schallig HD 2022. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol* 23: 823–840.

Wallerstein RS 1949. Longevity of *Schistosoma mansoni*: Observations Based on a Case. *Am J Trop Med Hyg* s1-29: 717–722.

Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM 1994. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 179: 1367–1371.

Washington IM, Hoosier G Van 2012. Clinical Biochemistry and Hematology. In: *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, Elsevier, pp. 57–116.

Watanabe Y, Hamaguchi-Tsuru E, Morimoto N, Nishio Y, Yagyu KI, Konishi Y, Tominaga M, Miyazaki JI, Furuya M, Tominaga A 2004. IL-5-induced eosinophils suppress the

growth of *Leishmania amazonensis* in vivo and kill promastigotes in vitro in response to either IL-4 or IFN-γ. *DNA Cell Biol* 23: 412–418.

Webster BL, Diaw OT, Seye MM, Webster JP, Rollinson D 2013. Introgressive Hybridization of *Schistosoma haematobium* Group Species in Senegal: Species Barrier Break Down between Ruminant and Human Schistosomes (WE Secor, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2110.

Weerakoon KGAD, Gobert GN, Cai P, McManus DP 2015. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 28: 939–967.

Weinstock J v, Boros DL 1983. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 130: 418–422.

WHO 2020. *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WHO 2021a. Neglected tropical diseases: impact of COVID-19 and WHO's response – 2021 update. *Wkly Epidemiol Rec* 96: 461–468.

WHO 2021b. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: progress report, 2020. *Wkly Epidemiol Rec* 96: 585–595.

WHO 2022. *WHO guideline on control and elimination of human schistosomiasis*.

WHO 2023. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: progress report, 2022. *Wkly Epidemiol Rec* 98: 667–676.

Wilson RA, Draskau T, Miller P, Lawson JR 1978. *Schistosoma mansoni*: The activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. *Parasitol* 77: 57–73.

Wolmarans CT, Kock KN de, Strauss HD, Bornman M 2002. Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. *J Helminthol* 76: 273–277.

Wu YP, Lenting PJ, Tielens AGM, Groot PG De, Hellemond JJ Van 2007. Differential platelet adhesion to distinct life-cycle stages of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J Thromb Haemost* 5: 2146–2148.

Yamaoka H, Sakaguchi N, Sano K, Ito M 1996. Intravascular granuloma induced by intravenous inoculation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 133: 149–158.

Yeh Y-T, Skinner DE, Criado-Hidalgo E, Chen NS, Garcia-De Herreros A, El-Sakkary N, Liu L, Zhang S, Kandasamy A, Chien S, Lasheras JC, Álamo JC del, Caffrey CR 2022. Biomechanical interactions of *Schistosoma mansoni* eggs with vascular endothelial cells facilitate egg extravasation. *PLOS Pathog* 18: e1010309.

Yole D, Shamala K, Kithome K, Gicheru M 2007. Studies on the interaction of Schistosoma mansoni and Leishmania major in experimentally infected Balb/c mice. *Afr J Health Sci* 14: 80–85.

Yoshida A, Maruyama H, Yabu Y, Amano T, Kobayakawa T, Ohta N 1999. Immune responses against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Int* 48: 73–79.

Zaccone P, Burton O, Miller N, Jones FM, Dunne DW, Cooke A 2009. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *Eur J Immunol* 39: 1098–1107.

Zandbergen G van, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Muller A, Holscher C, Herrmann M, Sacks D, Solbach W, Laskay T 2006. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci* 103: 13837–13842.

Zandbergen G van, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T 2004. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *J Immunol* 173: 6521–6525.

Zeb I, Qureshi NA, Shaheen N, Zafar MI, Ali A, Hamid A, Shah SAA, Ashraf A 2021. Spatiotemporal patterns of cutaneous leishmaniasis in the district upper and lower Dir, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan: A GIS-based spatial approaches. *Acta Trop* 217: 105861.

Zenian A, Rowles P, Gingell D 1979. Scanning electron-microscopic study of the uptake of *Leishmania* parasites by macrophages. *J Cell Sci* 39: 187–199.

Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, Polegre M, Avila A, Matos N, Mendoza I, Pratlong F, Ravel C, Convit J 2007. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Brit J Dermatol* 156: 1328–1335.

Zida A, Guiguemde T, Sawadogo MP, Tchekounou C, Soulama I, Barry CS, Siribie M, Marks F, Sangaré I, Bamba S 2024. Schistosomiasis in Burkina Faso: review on 60 years' research. *Ann Parasitol* 69.

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG)

UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 398/2018
Título do projeto: Efeito da co-infecção por Schistosoma mansoni e por Leishmania na susceptibilidade, resposta imune e morbidade do hospedeiro
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Deborah Aparecida Negrao Correa
Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas
Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

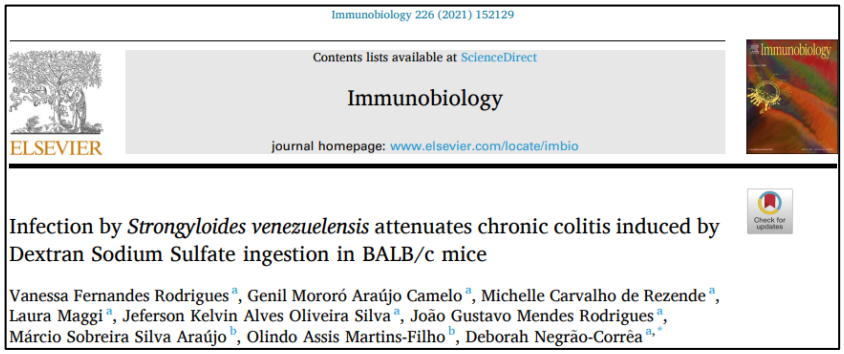
Aprovado na reunião do dia 25/02/2019. Validade: 25/02/2019 à 24/02/2023
Belo Horizonte, 25/02/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

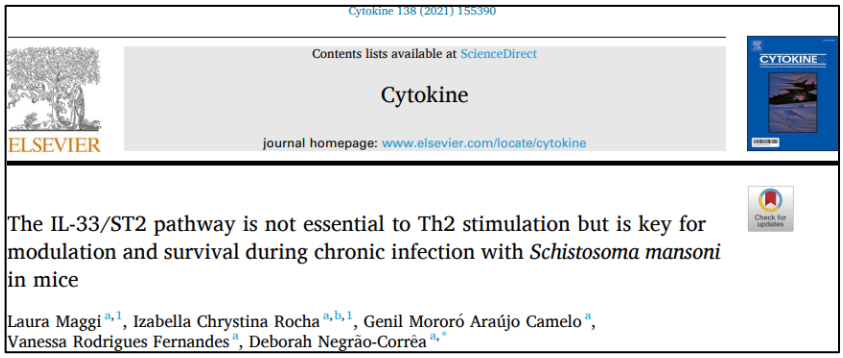
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B – PUBLICAÇÕES COMO COAUTOR



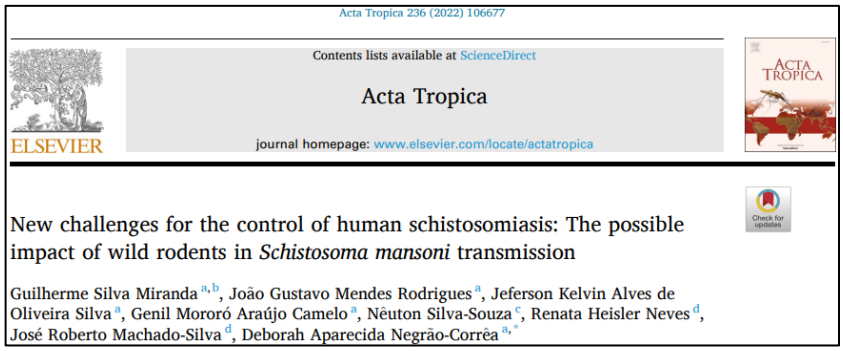
Referência: RODRIGUES, Vanessa Fernandes *et al.* Infection by *Strongyloides venezuelensis* attenuates chronic colitis induced by Dextran Sodium Sulfate ingestion in BALB/c mice. *Immunobiology*, v. 226, n. 5, p. 152129, 2021.

Referência: MIRANDA, Guilherme Silva *et al.* Previous History of American Tegumentary Leishmaniasis Alters Susceptibility and Immune Response Against *Schistosoma mansoni* Infection in Humans. *Front Immunol*, v. 12, n. March, p. 630934, 2021.



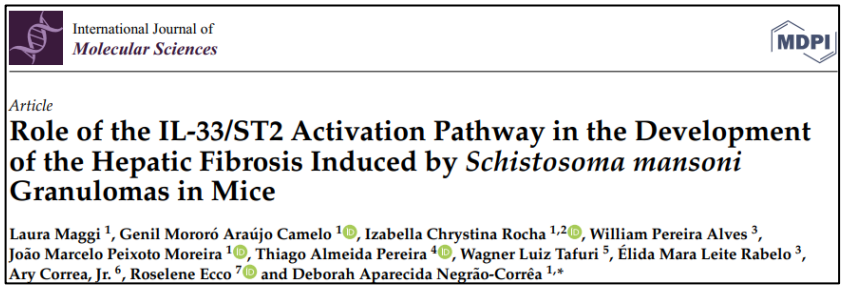
Referência: MAGGI, Laura *et al.* The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with *Schistosoma mansoni* in mice. *Cytokine*, v. 138, p. 155390, 2021.

Referência: MIRANDA, Guilherme Silva *et al.* From field to laboratory: isolation, genetic assessment, and parasitological behavior of *Schistosoma mansoni* obtained from naturally infected wild rodent *Holochilus sciureus* (Rodentia, Cricetidae), collected in Northeastern Brazil. *Parasitol Res*, v. 122, n. 2, p. 395–411, 2023.

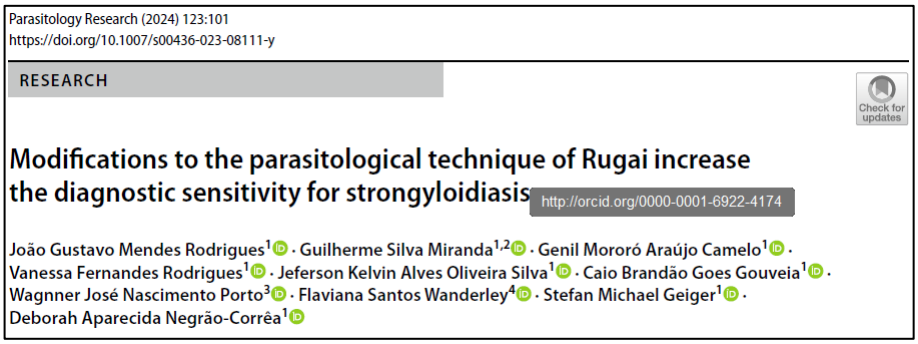


Referência: MIRANDA, Guilherme Silva *et al.* New challenges for the control of human schistosomiasis: The possible impact of wild rodents in Schistosoma mansoni transmission. *Acta Tropica*, v. 236, p. 106677, 2022.

Referência: MIRANDA, Guilherme Silva *et al.* Experimental infection with *Schistosoma mansoni* isolated from the wild rodent *Holochilus sciureus* shows a low parasite burden but induces high schistosomiasis severity in BALB/c mice. *Parasitology*, v. 149, n. 11, p. 1381–1396, 2022.



Referência: MAGGI, Laura *et al.* Role of the IL-33/ST2 Activation Pathway in the Development of the Hepatic Fibrosis Induced by *Schistosoma mansoni* Granulomas in Mice. *Int J Mol Sci*, v. 24, n. 12, p. 10237, 2023.



Parasitology Research (2024) 123:101
https://doi.org/10.1007/s00436-023-08111-y

RESEARCH

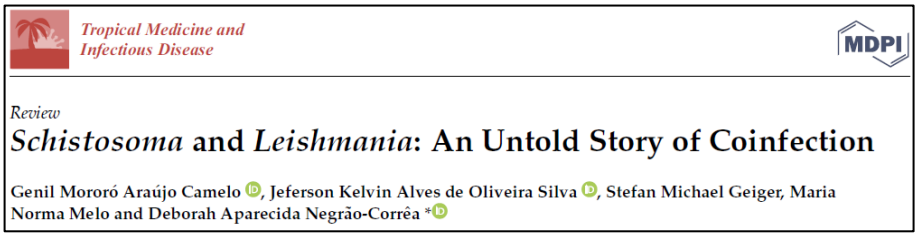
Modifications to the parasitological technique of Rugai increase the diagnostic sensitivity for strongyloidiasis

http://orcid.org/0000-0001-6922-4174

João Gustavo Mendes Rodrigues[1] · Guilherme Silva Miranda[1,2] · Genil Mororó Araújo Camelo[1] · Vanessa Fernandes Rodrigues[1] · Jeferson Kelvin Alves Oliveira Silva[1] · Caio Brandão Goes Gouveia[1] · Wagnner José Nascimento Porto[3] · Flaviana Santos Wanderley[4] · Stefan Michael Geiger[1] · Deborah Aparecida Negrão-Corrêa[1]

Referência: RODRIGUES, João Gustavo Mendes *et al.* Modifications to the parasitological technique of Rugai increase the diagnostic sensitivity for strongyloidiasis. *Parasitol Res*, v. 123, n. 1, p. 101, 2024.

ANEXO C – PUBLICAÇÃO COMO PRIMEIRO AUTOR



Referência: CAMELO, Genil Mororó Araújo *et al. Schistosoma* and *Leishmania*: An Untold Story of Coinfection. *Trop Med Infect Dis*, v. 8, n. 8, p. 383, 2023.