

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RAQUEL ALVES PINNA

MALÁRIA E LEISHMANIOSE: ASPECTOS CLÍNICOS, PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS NA COINFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *Plasmodium yoelii* 17XNL E *Leishmania braziliensis*, *L. major* OU *L. amazonensis*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (as): Profa. Dra. Dalma Maria Banic

Profa. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira

RIO DE JANEIRO

2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P656

Pinna, Raquel Alves.

Malária e Leishmaniose : aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos na coinfeção de camundongos BALB/c por *Plasmodium yoelli* 17XNL e *Leishmania braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* / Raquel Alves Pinna – Rio de Janeiro, 2012.

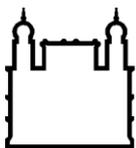
xvii, 161 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.

Bibliografia: f. 137-155

1. Malária. 2. Leishmaniose. 3. Coinfeção. 4. Resposta imune. I. Título.

CDD 571.99411



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RAQUEL ALVES PINNA

MALÁRIA E LEISHMANIOSE: ASPECTOS CLÍNICOS, PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS NA COINFEÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *Plasmodium yoelii* 17XNL E *Leishmania braziliensis*, *L. major* OU *L. amazonensis*

ORIENTADOR (AS): Profa. Dra. Dalma Maria Banic

Profa. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira

Aprovada em: 09/05/2012

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Paula Mello De Luca - **Presidente**

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Profa. Dra. Roberta Olmo Pinheiro

Rio de Janeiro, 9 de maio de 2012.

Dedicatória:

À Deus, pois sem Ele nada é possível.

Aos meus pais, Rogério e Alice, e a minha irmã, Paula pelo apoio e amor incondicionais.

Ao meu namorado, Helio, pelos bons momentos que passamos juntos ao longo desses anos.

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e a dedicação de muitas pessoas. Aproveito a oportunidade para agradecer àqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para que esse sonho pudesse ser realizado. A todos, MUITO OBRIGADA!

Em especial gostaria de agradecer aquelas pessoas que me acompanharam mais de perto:

À minha orientadora, Dra. Dalma Banic, pelo carinho que me recebeu no seu grupo de pesquisa (mesmo sem me conhecer!) e pelo exemplo de profissional que ela é. Pela sua paciência e disponibilidade a qualquer hora do dia ou da noite, sempre disposta a ajudar. Sem dúvida, a melhor orientadora que poderia ter.

À minha orientadora, Dra. Joseli de Oliveira-Ferreira, pelo apoio e dedicação a mim prestados, pelas discussões científicas que sempre renderam muitas ideias e me fizeram acreditar cada vez mais no nosso trabalho.

À Dra. Paula Mello De Luca, do Laboratório de Imunoparasitologia, pela contribuição científica e técnica, fundamentais e indispensáveis para a realização deste trabalho. Agradeço, ainda, por aceitar a tarefa de revisar esta dissertação.

À Dra. Léa Cysne pela amizade e carinho durante as manhãs (e tardes!) de experimento que mobilizavam todo o laboratório. Aprendi muito com você!

Ao Dr. Cláudio Ribeiro, chefe do Laboratório de Pesquisa em Malária, por ter me recebido em seu laboratório.

A Dra. Marilza Herzog, chefe do Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, pelo apoio e por garantir a infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho. Aproveito a oportunidade para agradecer também as funcionárias Érika Nascimento, Raquel Cesário e Ana Carolina Valente, que são sempre solícitas e atenciosas aos nossos pedidos.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, Rogério e Alice, que mesmo distantes me apoiaram, deram força e motivação. Por compreenderem que perder alguns finais de semana em família era necessário. Pelo apoio e amor

incondicionais. À minha irmã, por compartilhar comigo as noites sem dormir e os finais de semana de trabalho na Fiocruz. Pelo carinho e incentivo a mim dispensados ao longo desses dois anos. Agradeço, ainda, a minha querida sobrinha Lavínea por transformar a redação deste trabalho muito mais divertida.

Ao meu grande amor, Helio Moura, por estar presente em todas as horas. Pelos finais de semana de trabalho na Fiocruz, pela compreensão, carinho e cuidado. Por querer sempre me ver sorrindo. E, é claro, por sempre me salvar nas horas em que meu computador parava de funcionar. Obrigada!

Aos meus amigos do Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, principalmente, Daiana, Luciene, Thiago e Natália, pelas horas compartilhadas em bancada e pelos momentos de distração e risadas.

Aos amigos do Laboratório de Malária, em especial, ao Paulo Totino pela grande ajuda no experimento de dosagem de citocinas. Agradeço, ainda, aos amigos que fiz no Laboratório de Imunoparasitologia, Virgínia e Juan, pelo apoio na realização dos experimentos, e a amiga Amanda Beatriz que me acompanha desde os tempos de graduação e que foi fundamental nos experimentos com leishmânia.

Falando de amigos, aproveito a oportunidade para agradecer a todos os meus amigos de Teresópolis que sempre torceram pelo meu sucesso e que me sustentaram através de suas orações. Agradeço, em especial, ao Bruno e a Carla por estarem sempre presentes.

Agradeço a todos os funcionários do IOC que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho. Ao fotógrafo Rodrigo Méxas pela simpatia e excelente trabalho, ao técnico Alessandro Marins da Plataforma de Citometria de Fluxo do IOC pela disponibilidade e atenção e aos funcionários do Biotério de Experimentação do Pavilhão Leônidas Deane por cuidarem dos meus bichinhos.

A Fundação Oswaldo Cruz e ao CNPq por terem financiado os meus estudos e o projeto de pesquisa.

*"Mesmo que já tenha feito uma longa caminhada,
sempre haverá mais um caminho a percorrer."*

Santo Agostinho



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MALÁRIA E LEISHMANIOSE: ASPECTOS CLÍNICOS, PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS NA COINFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *Plasmodium yoelii* 17XNL E *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* OU *L. major*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Raquel Alves Pinna

Doenças negligenciadas tais como Malária e Leishmaniose são endêmicas em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil. A coinfeção por diferentes parasitos é comumente observada na natureza e representa um desafio no estudo da ecologia dos parasitos e da saúde humana. Atualmente, não existem dados epidemiológicos a respeito das coinfeções por *Plasmodium* spp. e *Leishmania* spp. no Brasil, apesar da área de distribuição das duas doenças causadas por esses parasitos se sobreporem. Dentro desse contexto, achamos importante avaliar o impacto que uma infecção pode ter sobre a resposta imune e a evolução clínica da outra. Para tal, camundongos BALB/c foram coinfectados com *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* e o curso das infecções e da resposta imunológica acompanhados por 77 dias. A coinfeção com diferentes espécies de leishmânia determina um curso distinto na infecção malárica. Assim, a coinfeção com *L. braziliensis* parece ter um efeito benéfico enquanto as coinfeções com *L. major* ou *L. amazonensis* aumentam a gravidade da malária levando a morte de alguns animais. Já a malária parece ter um efeito benéfico no desenvolvimento da leishmaniose causada por *L. major* ou *L. amazonensis*. O perfil da resposta imune foi determinado através de citometria de fluxo multiparamétrica em esplenócitos e da dosagem de citocinas séricas nos dias 5, 10, 17 e 77 após infecção com *P. yoelii* 17XNL. Foi verificada uma redução no percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ no baço dos animais mono e coinfectados durante a fase aguda da malária. Apesar disso, o percentual de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL4⁺ aumentou nesse período. Além disso, o percentual de células CD4⁺IL10⁺ era maior no grupo dos animais coinfectados em relação aos dos monoinfectados. Quanto às células CD8⁺, houve aumento percentual de células produtoras de IFN- γ e IL-4 nos grupos monoinfectado e coinfectados com *P. yoelii* 17XNL, durante a fase aguda da infecção malárica. Um aumento substancial no percentual de células CD8⁺IL10⁺, no dia 77, foi observado apenas nos grupos dos coinfectados com leishmânia. No grupo coinfectado com *L. amazonensis* houve uma aumento importante no percentual dessas células, no dia 5, aparentemente induzido pela *L. amazonensis*. O percentual de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁺ aumenta durante a fase aguda da malária nos grupos mono e coinfectados com *P. yoelii* 17XNL. Todos os grupos coinfectados apresentaram percentuais de células CD14⁺IL10⁺ elevados no dia 77 em relação aos grupos monoinfectados. A concentração sérica das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 aumentou durante a fase aguda da malária nos camundongos mono e coinfectados. Nos grupos coinfectados com *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* ou *L. major*, entretanto, esse aumento foi menor do que o grupo monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL no dia 5. Em resumo, nossos dados sugerem que a coinfeção altera tanto a resposta imune quanto o curso da infecção por plasmódio ou leishmânia sendo essas alterações dependentes da espécie de parasito envolvida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MALARIA AND LEISHMANIASIS: CLINICAL, PARASITOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF CO-INFECTIONS WITH *P. yoelii* 17XNL AND *Leishmania braziliensis*, *L. major* OR *L. amazonensis* IN BALB/c MICE

ABSTRACT

MASTER THESIS

Raquel Alves Pinna

Neglected tropical diseases such as Malaria and Leishmaniasis are endemic in several regions of the world, including Brazil. Co-infection by multiple parasite species is commonly observed in nature and represents a complex challenge in studies of parasites ecology and human health. At present time, there are no available data concerning prevalence of Malaria and Leishmaniasis co-infections in the Brazilian territory. In this context, we believe that is important to study the impact that one infection can have on the immune response and the clinical outcome of the other. Therefore, BALB/c mice were co-infected with *P. yoelii* 17XNL and *L. braziliensis*, *L. major* or *L. amazonensis* and both the course of each disease and its immune response were followed-up for 77 days. In coinfection, we observed that, depending on the species of *Leishmania*, the course of malaria disease was altered in a different way. It seems that co-infection with *L. braziliensis* causes a beneficial effect while co-infections with *L. major* or *L. amazonensis* increases gravity leading some animals to death. Malaria infection, on the other hand, had a beneficial effect in leishmaniasis caused by *L. major* or *L. amazonensis*. Immune response was accessed "ex vivo" by multiparametric flow cytometry using splenocytes and by measurement of serum cytokine levels 5, 10, 17 and 77 days post *P. yoelii* infection. There was a decrease on the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ splenocytes during malaria acute phase in both mono and co-infected groups. Besides that, there was an increase in the percentage of CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD4⁺IL-4⁺ cells. Also, it was observed that CD4⁺IL-10⁺ cells enhanced in co-infected groups compared to control and mono-infected groups. Regarding CD8⁺ cells, there was an increase in IFN- γ e IL-4 producing cells during malaria infection in *P. yoelii* mono-infected and co-infected groups. Percentage of CD8⁺IL-10⁺ cells was transiently increased in *P. yoelii* mono-infected group but significantly enhanced in co-infected groups, mainly on day 77. *L. amazonensis* co-infected group presented an increase in CD8⁺IL-10⁺ on day 5 compared to control and *P. yoelii* mono-infected groups that is apparently due to *L. amazonensis* infection since this *L. amazonensis* mono-infected group had an increase on the percentage of CD8⁺IL-10⁺ on days 5, 10 and 17. The percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells (Tregs) and CD4⁺CD25⁺ were higher during malaria acute phase in both *P. yoelii* mono-infected and co-infected groups. Co-infected groups exhibited an enhancement in the percentage of splenic CD14⁺IL-10⁺ cells on day 77 in comparison to control and mono-infected groups. The serum concentrations of IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 were enhanced during malaria acute stage in both *P. yoelii* mono-infected and co-infected mice. However, *L. braziliensis* and *L. major* co-infected groups presented not as much alteration in serum cytokine concentration when compared to *P. yoelii* mono-infected group. Briefly, it seems that co-infections alter both the course and the immune response of *Plasmodium* or *Leishmania* infection in a way that appears to be dependent on the species of parasites involved.

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Malária	18
1.1.2 Malária no Mundo	19
1.1.3 Malária no Brasil	20
1.2 Ciclo Evolutivo dos Plasmódios	21
1.3 Aspectos gerais da resposta imune na fase eritrocítica da infecção malárica	24
1.4 O Modelo Murino no Estudo da Malária	28
1.4.1 Aspectos da Resposta Imune da Malária Murina na Fase Eritrocítica	31
1.5 Leishmanioses	33
1.5.1 Leishmaniose Tegumentar no Velho Mundo.....	36
1.5.2 Leishmaniose Tegumentar Americana	37
1.5.3 Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.....	37
1.6 Ciclo Evolutivo das Leishmânias.....	39
1.7 Resposta Imune na Leishmaniose	41
1.8 Modelo Murino no Estudo da Leishmaniose	45
1.8.1 Aspectos da Resposta Imune a Leishmaniose no Modelo Murino.....	48
1.9 Coinfecção	51
2. Justificativa	53
3. Objetivos	54
3.1 Objetivo Geral	54
3.2 Objetivos Específicos	54
4. Material e Métodos	55
4.1 Animais	55
4.2 Parasitos	55
4.2.1 <i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL (não letal)	55
4.2.2 <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>L. major</i> e <i>L. amazonensis</i>	55
4.3 Infecção Experimental.....	56
4.3.1 <i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL (não letal)	56
4.3.2 <i>L. braziliensis</i> , <i>L. major</i> e <i>L. amazonensis</i>	56
4.4 Desenho Experimental.....	57
4.4.1 Grupos de Animais	57
4.5 Acompanhamento da infecção.....	58

4.5.1 <i>P. yoelii</i>	58
4.5.2 <i>L. braziliensis</i> , <i>L. major</i> e <i>L. amazonensis</i>	59
4.6 Avaliação da Carga Parasitária de <i>Leishmania</i> sp. nas Lesões.....	60
4.7 Obtenção e Armazenamento de Esplenócitos de Camundongos	61
4.8 Descongelamento de Esplenócitos Obtidos de Camundongos	61
4.9 Imunofenotipagem e Padrão de Citocinas Citoplasmáticas de Esplenócitos Murinos	62
4.10 Imunofenotipagem de Células T Reguladoras (Tregs) de Esplenócitos Murinos	64
4.11 Dosagem de Citocinas no Soro de Camundongos por Citometria de Fluxo ..	66
4.12 Análise Estatística	68
5. Resultados	69
5.1 Influência da Coinfecção por <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	69
5.1.1 Alterações Parasitológicas na Infecção por <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	69
5.1.2 Alterações Parasitológicas na Infecção por <i>L. brasiliensis</i>	70
5.1.3 Sinais Clínicos	71
5.1.4 Alterações Imunológicas	74
5.2 Influência da Coinfecção por <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL	87
5.2.1 Alterações Parasitológicas na Infecção por <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	87
5.2.2 Alterações Parasitológicas na Infecção por <i>L. major</i>	87
5.2.3 Sinais Clínicos	89
5.2.4 Alterações Imunológicas	93
5.3 Influência da Coinfecção por <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL	106
5.3.1 Alterações Parasitológicas na Infecção por <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	106
5.3.2 Alterações Parasitológicas na Infecção por <i>L. amazonensis</i>	107
5.3.3 Sinais Clínicos	108
5.3.4 Alterações Imunológicas	112
6- Discussão	125
7- Conclusões.....	135
8- Referências.....	137
9- Anexos	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Distribuição mundial da malária em 2010, OMS (13).....	19
Figura 1.2: Endemicidade da Malária no Brasil em 2010.	21
Figura 1.3: Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> sp. nos hospedeiros vertebrado e invertebrado	24
Figura 1.4: Resposta imune na fase eritrocítica.	27
Figura 1.5: Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão de LTA no Brasil.....	38
Figura 1.6: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	41
Figura 1.7: Leishmaniose cutânea experimental em camundongos.....	47
Figura 4.1: Cronograma de infecção	58
Figura 4.2: Paquímetro utilizado para medir o tamanho das lesões por <i>Leishmania</i> sp.	59
Figura 4.3: Análise dos dados de citometria referentes ao perfil de células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e produção de citocinas por esplenócitos murinos no programa <i>FlowJo</i>	64
Figura 4.4: Análise dos dados de citometria referentes à imunofenotipagem de células Tregs no programa <i>FlowJo</i>	66
Figura 4.5: Análises dos níveis de citocinas séricas no programa <i>WinMDI</i>	67
Figura 5.1: Comparação entre as parasitemias dos animais monoinfectados e coinfectados com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL ao longo do tempo.....	69
Figura 5.2: Medida de lesão e porcentagem de lesões úlceras ao longo do tempo em animais monoinfectados e coinfectados com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL. ...	70
Figura 5.3: Comparação entre a carga parasitária das lesões dos grupos monoinfectado com <i>L. braziliensis</i> e coinfectado com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL.	71
Figura 5.4: Comparação entre as médias de temperatura corporal dos animais monoinfectados e coinfectados com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL ao longo do tempo.	72
Figura 5.5: Variação de peso em animais coinfectados com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> em comparação com os animais controle e monoinfectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. braziliensis</i>	73

Figura 5.6: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. braziliensis</i> e co infectados com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.	75
Figura 5.7: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. braziliensis</i> e co infectado com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.	76
Figura 5.8: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL e co infectado com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	77
Figura 5.9: Comparação entre o percentual de células Tregs no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. braziliensis</i> e co infectado com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.	78
Figura 5.10: Comparação entre o percentual de células CD8 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. braziliensis</i> e co infectado com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.	79
Figura 5.11: Comparação entre o percentual de células CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. braziliensis</i> e co infectado com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.	81
Figura 5.12: Comparação entre o percentual de células CD14 ⁺ IL-10 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. braziliensis</i> e co infectado com <i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.	82
Figura 5.13: Comparação entre as parasitemias dos animais mono infectados e co infectados com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL ao longo do tempo.....	87
Figura 5.14: Medida de lesão e porcentagem de lesões úlceras ao longo do tempo em animais mono infectados e co infectados com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	88
Figura 5.15: Comparação entre a carga parasitária das lesões dos grupos mono infectado com <i>L. major</i> e co infectado com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	89
Figura 5.16: Comparação entre as médias de temperatura corporal dos animais mono infectados e co infectados com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL ao longo do tempo	90

Figura 5.17: Variação de peso em animais coinfectedados com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL em comparação aos animais controle e mono infectados com <i>L. major</i> ou <i>P. yoelii</i> 17XNL	91
Figura 5.18: Curva de sobrevivência de camundongos coinfectedados com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL em comparação com a curva de camundongos mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. major</i>	92
Figura 5.19: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. major</i> e coinfectedados com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	93
Figura 5.20: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. major</i> e coinfectedado com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	95
Figura 5.21: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. major</i> e coinfectedado com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	96
Figura 5.22: Comparação entre o percentual de células Tregs no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. major</i> e coinfectedado com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	97
Figura 5.23: Comparação entre o percentual de células CD8 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. major</i> e coinfectedado com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	99
Figura 5.24: Comparação entre o percentual de células CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. major</i> e coinfectedado com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	100
Figura 5.25: Comparação entre o percentual de células CD14 ⁺ IL-10 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. major</i> e coinfectedado com <i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	102
Figura 5.26: Comparação entre as parasitemias dos animais mono infectados e coinfectedados com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL ao longo do tempo	106
Figura 5.27: Medida de lesão e porcentagem de lesões úlceras ao longo do tempo em animais mono infectados e coinfectedados com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL	107
Figura 5.28: Comparação entre a carga parasitária das lesões dos grupos mono infectado com <i>L. amazonensis</i> e coinfectedado com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL	108

Figura 5.29: Comparação entre as médias de temperatura corporal dos animais mono infectados e co infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL ao longo do tempo	109
Figura 5.30: Variação de peso em animais co infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL em comparação aos animais controle e mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i>	110
Figura 5.31: Curva de sobrevivência de camundongos co infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL em comparação com a curva de camundongos mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i>	111
Figura 5.32: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i> e co infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	113
Figura 5.33: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i> e co infectado com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	114
Figura 5.34: Comparação entre o percentual de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i> e co infectado com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	115
Figura 5.35: Comparação entre o percentual de células Tregs no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i> e co infectado com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	116
Figura 5.36: Comparação entre o percentual de células CD8 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i> e co infectado com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	117
Figura 5.37: Comparação entre o percentual de células CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i> e co infectado com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	119
Figura 5.38: Comparação entre o percentual de células CD14 ⁺ IL-10 ⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com <i>P. yoelii</i> 17XNL ou <i>L. amazonensis</i> e co infectado com <i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i> 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Infecção por plasmódios murinos em diferentes linhagens de camundongos.....	30
Tabela 1.2: Principais espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de doença humana.	36
Tabela 1.3: Infecção experimental com <i>Leishmania</i> sp. em diferentes linhagens de camundongos.....	46
Tabela 4.1: Infecção experimental de camundongos BALB/c com <i>P. yoelii</i> 17XNL e <i>Leishmania</i> sp.	56
Tabela 4.2: Grupos de animais.....	57
Tabela 4.3: Relação dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem de esplenócitos murinos.....	63
Tabela 4.4: Relação dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem de células Tregs de esplenócitos murinos.....	65
Tabela 4.5: Limite de detecção do kit comercial <i>Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit</i> (BD Biosciences).	67
Tabela 5.1: Alterações nos níveis séricos de citocinas observadas nos animais mono infectados (em comparação com o grupo controle) e co infectados (em comparação com os grupos controle e mono infectados).	85
Tabela 5.2: Alterações nos níveis séricos de citocinas observadas nos animais mono infectados (em comparação com o grupo controle) e co infectado (em comparação com os grupos controles e mono infectados).	104
Tabela 5.3: Alterações nos níveis séricos de citocinas observadas nos animais mono infectados (em comparação com o grupo controle) e co infectados (em comparação com os grupos controle e mono infectados).	123

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos
ADCI – Inibição Celular Dependente de Anticorpo
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC – Alofocianina
APC – Célula Apresentadora de Antígeno
APC Cy7 – Alofocianina-cianina 7
BCG – Bacilo de Calmette-Guérin
BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio
BSA – Albumina de Soro Bovino
C3 – Proteína do Complemento 3
CD – Grupo de Diferenciação
CR – Receptor de Complemento
CTL – Linfócito T Citotóxico
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
h - Horas
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HP – Hemácias Parasitadas
Id – Intradérmica
IFN- γ – Interferon gama
IL – Interleucina
iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida
Ip – Intraperitoneal
LACK – Antígeno de *Leishmania* Homólogo à Receptores de Quinase C Ativada
LC – Leishmaniose Cutânea
LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
LM – Leishmaniose Mucosa
M1 – Macrófagos Ativados pela Via Clássica
MCE – Malária Experimental Cerebral
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL – Mililitro
NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – Solução Tamponada com Fosfatos
PE – Ficoeritrina
PE Cy5 – Ficoeritrina-cianina 5
PE Cy7 – Ficoeritrina-cianina 7
PFA – Paraformaldeído
pg – Picograma
SBF – Soro Bovino Fetal
Sc – Subcutânea
SPF – Livre de Patógenos Específicos
Tc1 – Célula T Citotóxica do Tipo 1
Tc2 – Célula T Citotóxica do Tipo 2
TCR – Receptor de Células T
TGF- β – Fator de Transformação de Crescimento beta
Th – Células T Auxiliadoras
TLR – Receptor Semelhante à Toll
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa
Tregs – Células T Reguladoras
UI – Unidades Internacionais
 μ g – Micrograma

1.1 Malária

A malária é uma doença parasitária causada por hematozoários do filo Apicomplexa e gênero *Plasmodium*. Existem cerca de 80 espécies de plasmódios que parasitam mamíferos, aves ou répteis (1, 2). Dessas, apenas 5 são responsáveis pela infecção humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo este último, parasito simiano, recentemente descrito como causador de infecções entre humanos no sudeste asiático (3, 4). Cada uma dessas espécies apresenta peculiaridades em relação a sua distribuição geográfica, gravidade e biologia. As espécies mais comumente encontradas são *P. falciparum* e *P. vivax* que juntas respondem por 95% de todas as infecções. *P. falciparum*, largamente predominante no continente Africano e ocorrendo também em outras regiões tropicais e subtropicais, é considerada a espécie de maior impacto na saúde pública em virtude das altas taxas de morbidade, mortalidade e multirresistência aos fármacos antimaláricos (5). *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo; por ser encontrada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, é a principal causa de malária fora da África, afetando especialmente a Ásia e as Américas (5,6). A infecção por *P. vivax*, que nem sempre se apresenta benigna, pode ser altamente debilitante causando importantes perdas sócio-econômicas (7).

Os vetores da malária são fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Contudo, apenas algumas espécies estão implicadas na transmissão da doença. No mundo, o principal vetor é o *An. gambiae*, espécie de elevada capacidade vetorial encontrada na África e que já existiu no nordeste brasileiro de onde foi erradicada no início da década de 1940 (8). Atualmente no Brasil, as espécies de maior importância são *An. darlingi* e *An. aquasalis*. O primeiro é vetor na maior parte do território brasileiro, é altamente antropofílico, endofágico e muito suscetível a infecção por diferentes espécies de plasmódios. O segundo, ao contrário, apresenta hábitos exofágicos e baixa antropofilia. Na região de mata atlântica, onde ocorre transmissão autóctone esporádica de malária por *P. vivax*, *An. cruzii* é considerado o principal vetor (9, 10).

1.1.2 Malária no Mundo

A malária é a doença parasitária que mais mata e apesar da redução do número de casos nos últimos anos, ela continua sendo o maior desafio em saúde pública em todo o mundo (11-13). Essa doença é endêmica em mais de 100 países, onde aproximadamente 3.3 bilhões de pessoas vivem sob risco de contrair a infecção, o que representa mais de 40% da população mundial (13) (Figura 1.1). Estima-se que no ano de 2010 ocorreram 216 milhões de casos de malária no mundo com aproximadamente 655 mil óbitos, sendo a maioria de crianças (11, 13). Cerca de 81% dos casos de malária se concentra na África e o outros 10% estão distribuídos nas Américas Central e do Sul, Sudeste Asiático e Ilhas Oceânicas (13).

Nas Américas a transmissão da malária ocorre em 21 países. De maneira geral, o *P. vivax* é a espécie responsável por cerca de 70% dos casos, seguida por *P. falciparum* (13). As exceções são República Dominicana e Haiti que apresentam quase 100% das infecções por *P. falciparum* (13). O Brasil ainda é responsável por mais de 50% do total de casos nas Américas (13).

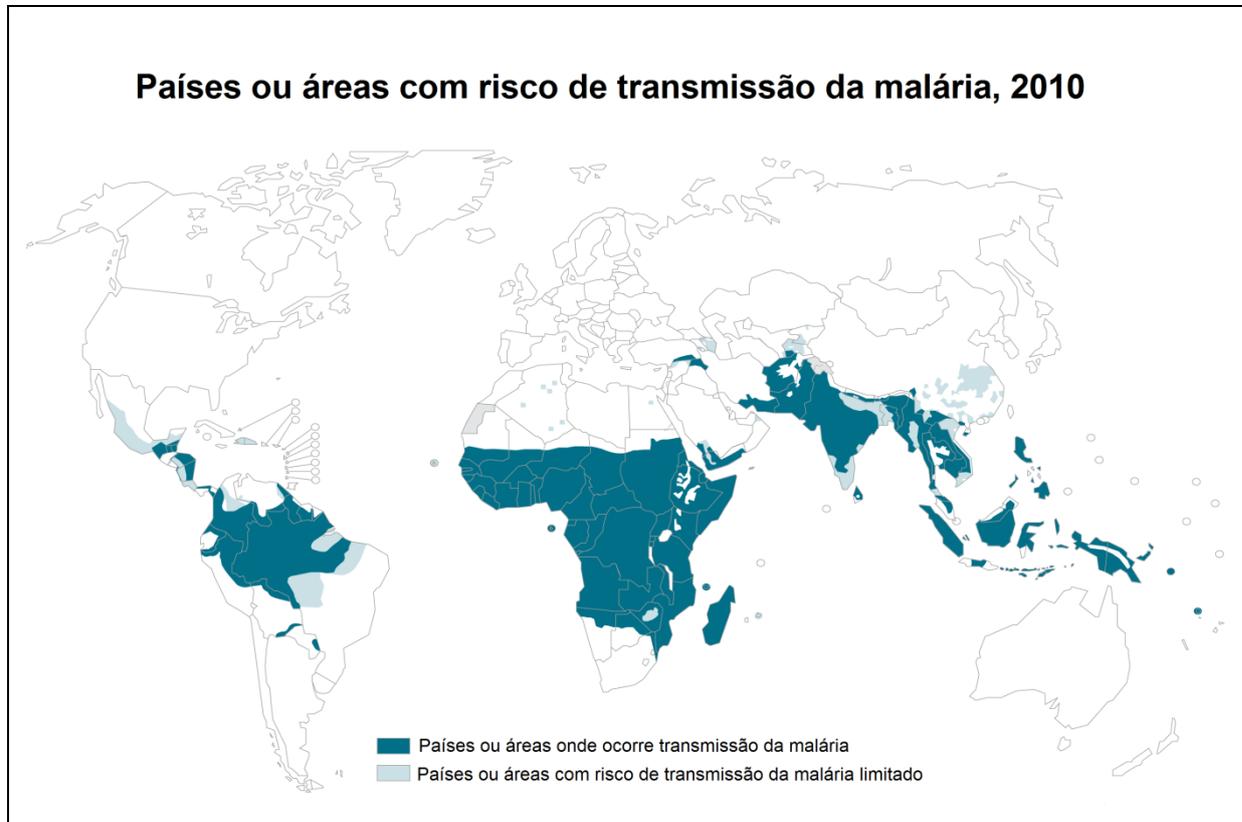


Figura 1.1: Distribuição mundial da malária em 2010, OMS (13).

1.1.3 Malária no Brasil

No Brasil, 99% dos casos de malária estão concentrados na região da Amazônia Legal que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Segundo o Ministério da Saúde, em 2010 foram registrados 334 mil casos de malária. Deste total, 283.022 mil foram causados por *P. vivax*, 47.243 por *P. falciparum*, 171 por *P. malariae* e 4 por *P. ovale*, além de 3.564 infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum* (14).

De acordo com a estratificação epidemiológica estabelecida pela OMS, atualmente o padrão de endemicidade no Brasil é heterogêneo predominando áreas de alto risco (Índice Parasitário Anual - IPA > 50) em 5 dos 9 estados da Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia) (Figura 1.2). Além da heterogeneidade, a transmissão em áreas endêmicas brasileiras é considerada instável com flutuações sazonais anuais. Nessas áreas tendem a ocorrer surtos epidêmicos que afetam adultos e crianças, podendo ser potencialmente grave quando a epidemia é causada por *P. falciparum* (15,16).

Na região extra-amazônica, o risco de transmissão autóctone de malária é muito pequeno, a maioria dos casos nessa região é importada da Amazônia Legal ou de outros países, principalmente os do Continente Africano (17). Nesse contexto, nos últimos anos ocorreram surtos epidêmicos nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro. Esses estados apresentam características comuns, favoráveis ao estabelecimento e a manutenção da transmissão, como: população susceptível, presença do vetor, além de boas condições ecológicas e geográficas (18). Embora os casos de malária na região extra-amazônica representem 1% da malária total do Brasil, o coeficiente de letalidade por malária nessa região é alto devido principalmente à falta de profissionais da saúde treinados para diagnosticar a doença a tempo de se fazer o tratamento adequado (19).

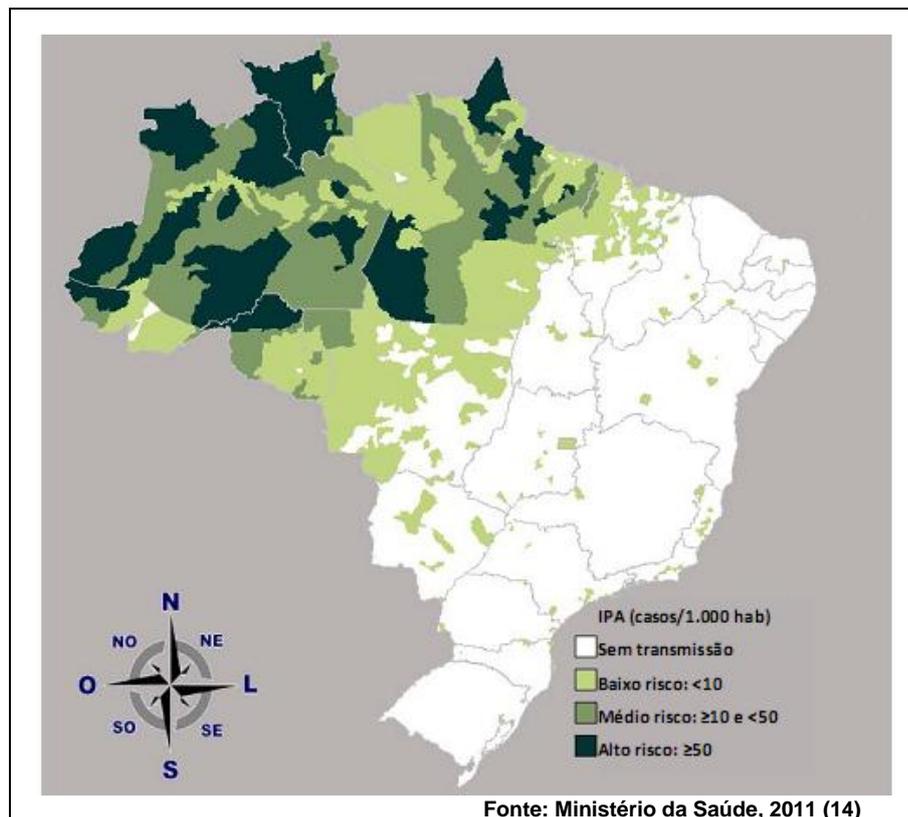


Figura 1.2: Endemicidade da Malária no Brasil em 2010.

1.2 Ciclo Evolutivo dos Plasmódios

Os plasmódios são parasitos que apresentam ciclo biológico complexo com diferentes formas evolutivas. Para que o ciclo se complete são necessários dois hospedeiros: um vertebrado onde ocorre a fase assexuada do ciclo e outro invertebrado onde ocorre a fase sexuada. Apesar da variedade de espécies que atuam como hospedeiros vertebrados e invertebrados de diferentes plasmódios, seus ciclos biológicos mantêm pontos em comum.

No ser humano o ciclo se inicia quando, no momento do repasto sanguíneo, mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* infectados por uma das espécies de plasmódios que acometem o homem, inoculam na pele juntamente com sua saliva a forma infectante do plasmódio, os esporozoítos. Evidências em modelo experimental murino mostram que os esporozoítos inoculados se mantêm viáveis na derme durante várias horas, alguns ficam na derme e outros penetram ativamente em vasos linfáticos ou/e vasos sanguíneos (20, 21, 22). Tanto os esporozoítas que ficam na derme quanto os que seguem pelos vasos linfáticos e atingem os linfonodos podem se desenvolver em formas exoeritrocíticas gerando merozoítos

infectantes, sendo liberados através de merossomos (estrutura vesicular), assim como observado no ciclo hepático (22). Os esporozoítos que ficam na derme também podem migrar para os folículos pilosos, sitio de privilégio imunológico (23), onde permanecem dormentes ou em crescimento lento. Sugerindo que essas formas possam atuar com um reservatório de merozoítos infectantes como proposto para os hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* (22) e/ou atuem como fonte de antígenos para os linfonodos drenantes (22).

Os esporozoítos que chegam aos vasos sanguíneos migram para o fígado. Ao chegarem ao fígado, os esporozoítos logo se aderem às células endoteliais dos sinusóides hepáticos e iniciam o processo de movimentação denominado de “*gliding*”, na qual eles fazem um deslizamento. Em seguida eles atravessam a barreira sinusal, provavelmente via células de Kupfer. Uma vez no parênquima hepático estes parasitos migram através de diversos hepatócitos de forma ativa (24, 25). Em um certo momento os esporozoítos promovem uma adesão mais firme em determinados hepatócitos e iniciam simultaneamente a formação de um vacúolo parasitóforo e o processo de maturação e multiplicação por reprodução assexuada (esquizogonia extra-eritrocítica) (25). Como resultado desta fase há o desenvolvimento de esquizontes hepáticos, repletos de merozoítos no seu interior. Durante esta etapa do ciclo a infecção é assintomática e seu tempo de duração, que varia entre as espécies, é estimado em: 8-11 dias em *P. falciparum*, 8-17 em *P. vivax*, 10-17 em *P. ovale*, 18-40 em *P. malariae* e de 9-12 em *P. knowlesi* (5). Em um determinado momento há liberação dos merozoítos para a circulação sanguínea por meio de merossomos. Experimentalmente, verificou-se que essas organelas são formadas a partir da membrana plasmática do hepatócito, que não apresenta fosfatidilserina em sua superfície, não sendo de pronto reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro garantindo a liberação de merozoítos viáveis na circulação (26). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos, após a penetração no hepatócitos, não se multiplicam, permanecendo quiescentes no fígado, e por isso foram denominados de hipnozoítos (do grego *hypnos*, sono). Desta forma, passado algum tempo, o indivíduo infectado pode voltar a ter crises de malária devido à reativação dos parasitos latentes, isto é, recidivar (27, 28).

Milhares de merozoítos são liberados na circulação sanguínea, após o rompimento dos merossomos, e invadem os eritrócitos iniciando, assim, a fase eritrocítica da doença (29, 30). Estudos, em modelo experimental murino, sugerem

que a ruptura dos merossomos ocorra no pulmão (30). A penetração dos merozoítos em eritrócitos é feita de forma ativa envolvendo uma série de interações ligante-específicas. O mecanismo de penetração é complexo e envolve muitas etapas incluindo: 1) reconhecimento e adesão do merozoíto à membrana do eritrócito; 2) reorientação apical do merozoíto em direção à membrana da célula hospedeira; 3) formação de uma junção no ponto de contato entre o cone apical do parasito e a membrana celular do eritrócito; e 4) movimento da junção ao redor do merozoíto com simultânea invaginação da membrana do eritrócito, até que o parasito se encontre dentro da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo (29). No vacúolo parasitóforo os merozoítos se diferenciam em trofozoítas (jovem e maduro), que por sua vez, se multiplicam (esquizogonia eritrocítica) e dão origem a esquizontes sanguíneos, também repletos de merozoítos. Essas formas parasitárias recém formadas são liberadas e invadem outros eritrócitos, repetindo o ciclo eritrocítico, esse momento coincide com manifestações clínicas da doença, notadamente o paroxismo febril, caracterizado por calafrio, febre e sudorese.

Após algumas gerações, alguns merozoítos sanguíneos se diferenciam em formas sexuadas, gametócitos masculinos e femininos. Esses, ao serem ingeridos por mosquitos do gênero *Anopheles*, darão continuidade ao ciclo do parasito com a formação de gametas. A fusão dos gametas masculino e feminino no interior do estômago do inseto origina um zigoto móvel denominado oocineto, que após atravessar a parede intestinal do mosquito, por um mecanismo transcelular, aloja-se na membrana basal onde se desenvolve em oocisto (28). No interior do oocisto ocorrem diferenciação e divisão nuclear que resulta na formação de milhares de esporozoítos (esporogonia). Parte dos esporozoítos liberados na hemocele migra para as glândulas salivares do mosquito. A fêmea do anofelino, ao realizar repasto sanguíneo, inoculará essas formas no hospedeiro vertebrado, reiniciando um novo ciclo (Figura 1.3). Estima-se que um número relativamente pequeno de esporozoítos são inoculados no hospedeiro vertebrado (20 a 100) apesar do elevado número de parasitos presentes nas glândulas salivares (29-34).

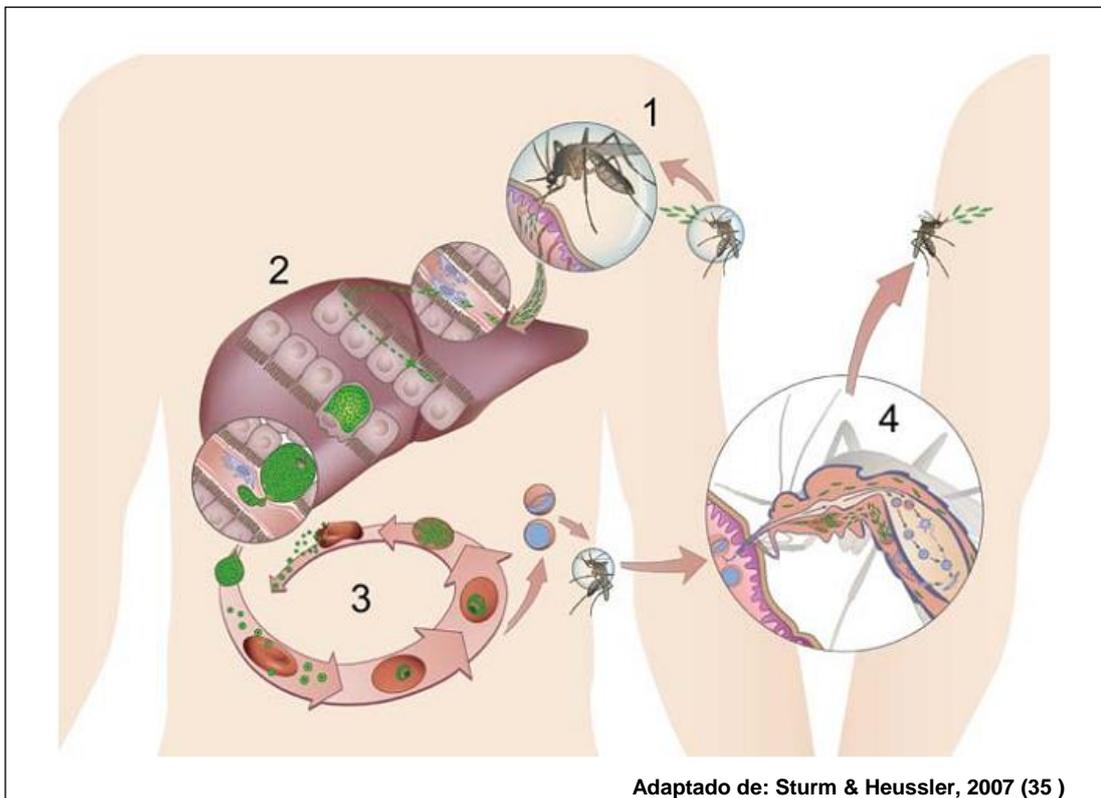


Figura 1.3: Ciclo evolutivo do *Plasmodium* sp. nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. 1) inoculação dos esporozoítos de *Plasmodium* sp. durante o repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* infectados; 2) os esporozoítos chegam ao fígado através da circulação sanguínea e deslizam pelo endotélio dos sinusóides até penetrarem nas células de Kupfer e hepatócitos, onde se transformam em esquizontes hepáticos repletos de merozoítos. Os merossomos são liberados nos sinusóides hepáticos. 3) os merossomos se rompem e liberam merozoítos que invadem os eritrócitos. Ciclos eritrocíticos se repetem até que alguns parasitos se desenvolvam em formas sexuadas (gametócitos). 4) anofelino, ao se alimentar, ingere as formas sexuadas e ocorre fertilização, formação do oocineto, oocisto e esporozoítos que caem na hemolinfa e chegam até as glândulas salivares. Transmissão dos esporozoítos para outro hospedeiro vertebrado, dando início a outro ciclo. (30)

1.3 Aspectos gerais da resposta imune na fase eritrocítica da infecção malárica

Vários estudos têm demonstrado que em condições naturais, a aquisição de uma imunidade protetora antimalárica ocorre em populações de área endêmica após sucessivas infecções (36). Essa imunidade, denominada de premunição, torna os sintomas clínicos da doença geralmente ausentes (imunidade clínica ou antidoença) e os níveis de parasitos sanguíneos extremamente baixos, atingindo níveis subpatentes (imunidade antiparasito) (37). O processo de aquisição de imunidade na malária é, ainda hoje, pouco compreendido, sendo que inúmeros fatores o influenciam, como: a complexidade do ciclo biológico dos plasmódios, sua extensa

diversidade antigênica, o perfil de transmissão da área endêmica, a maturidade do sistema imunológico relacionado à idade, *status* imunológico do indivíduo e/ou os mecanismos inatos de resistência que diferem intra e inter-etnicamente (38).

A invasão dos eritrócitos pelos plasmódios é um processo fundamental para o estabelecimento da infecção malárica, constituindo assim um dos principais alvos para a resposta imune protetora. Diversos trabalhos têm demonstrado que a imunidade direcionada ao estágio eritrocítico pode contribuir para a redução/eliminação dos parasitos assim como para o desenvolvimento das manifestações clínicas da doença (39-41). Considerando que os eritrócitos são células anucleadas e desprovidas de moléculas de classe I e II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), os anticorpos são considerados as principais moléculas responsáveis pela imunidade adquirida contra os parasitos nesse estágio. O papel protetor dos anticorpos na infecção malárica foi claramente demonstrado a partir de experimentos de transferência passiva de anticorpos de soro de adultos imunes para crianças com malária, realizados nas décadas de 60 e 90 (42, 43). Os anticorpos passivamente transferidos reduziam a parasitemia e protegiam as crianças da forma grave da doença. Outros experimentos em humanos evidenciaram que a proteção conferida pela transferência passiva de soro imune era mediada por anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 (44).

Experimentos *“in vitro”*, demonstraram que os anticorpos anti-*P. falciparum* agiriam dificultando a invasão dos eritrócitos pelos merozoítas, inibindo o desenvolvimento intra-eritrocítico dos merozoítas, em cooperação com células efectoras, por mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (45) e/ou de inibição celular dependente de anticorpos (ADCI) (46). Corroborando com estes dados alguns trabalhos, verificaram que os anticorpos citofílicos têm um papel importante na mediação do fenômeno de premunição na malária, visto que tais subclasses são predominantes em indivíduos protegidos (47-50).

Entretanto, apesar do importante papel dos anticorpos na imunidade antiparasitária adquirida contra as formas eritrocíticas, a resposta imune mediada por células também contribui nesse processo. Estudos realizados em seres humanos, demonstraram que após repetidos inóculos com doses ultra-baixas de eritrócitos infectados com *P. falciparum*, voluntários sadios e sem história prévia de

malária foram capazes de desenvolver uma imunidade protetora contra doença, mediante o desafio com doses infectantes do parasito, com ausência de parasitemia e sintomas clínicos. A resposta imune desses indivíduos foi caracterizada, pela resposta proliferativa de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e da secreção de IFN- γ , porém não de IL-4 e IL-10, consistindo em uma resposta imunológica do tipo Th1. Além disso, foi observada uma alta concentração da atividade da enzima óxido nítrico sintase em células mononucleares do sangue periférico (51). Trabalhos têm sugerido que as interações iniciais entre os parasitos da fase eritrocítica e as células do sistema imunológico inato são importantes no controle da multiplicação do parasito e posteriormente na eliminação e resolução da infecção (52). O principal papel da imunidade inata parece ser a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)- γ , que são críticas para o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1 envolvendo células T CD4⁺, T CD8⁺, células B e células efetoras que medeiam a resposta imune adaptativa tanto celular quanto humoral (52, 53). Dentre os componentes envolvidos na imunidade inata se encontram as células dendríticas, monócitos/macrófagos, células natural killer (NK), células NKT, células T γ/δ e células B1.

Grande parte dos sintomas observados na fase eritrocítica é consequência da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 e IFN- γ , em resposta a liberação dos merozoítos e de seus produtos metabólicos. Os macrófagos, por exemplo, ao entrarem em contato com metabólitos solúveis do parasito produzem TNF- α e IL-1 (53). Essas citocinas são pirógenos endógenos que atuam no centro de termorregulação do hipotálamo e que provocam aumento da temperatura corporal, o que explica a febre observada no momento da ruptura dos eritrócitos parasitados (54). Além disso, TNF- α induz a produção de NO pelos macrófagos e a expressão de moléculas de adesão no endotélio e em leucócitos explicando, em parte, outro mecanismo patológico da doença, a citoadesão (53).

As citocinas pró-inflamatórias têm papel fundamental no controle da parasitemia, mas também são responsáveis pela exacerbação da doença. O papel das citocinas anti-inflamatórias como o Fator de Transformação de Crescimento beta (TGF- β) e a IL-10, ao contrário, é regular as respostas protetoras potencialmente danosas ao organismo assim que as parasitemias são mantidas sob controle (55, 56). Este delicado balanço entre resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória parece

ser um fator determinante no desfecho clínico da malária. Células T reguladoras (Tregs), uma subpopulação de linfócitos T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ que atua na supressão da resposta imune, aparentemente também estão implicadas nesse processo de regulação. De fato, foram encontradas células expressando os marcadores de células Tregs que estavam associadas ao aumento de TGF- β , diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da resposta imune antígeno-específica na malária (57-59).

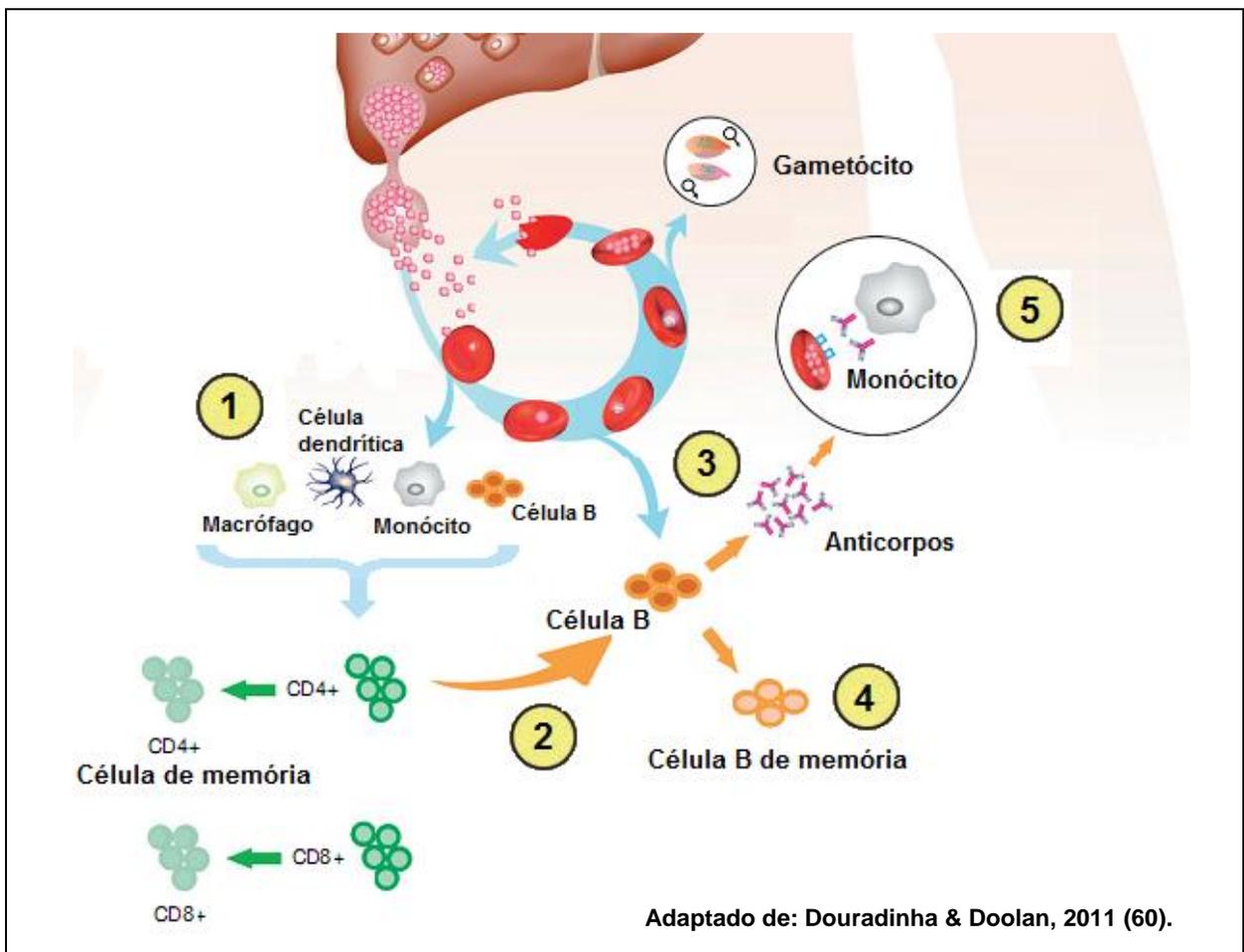


Figura 1.4: Resposta imune na fase eritrocítica. 1) diferentes tipos celulares apresentam antígenos para as células T CD4. 2) células T CD4 auxiliam células B a produzirem anticorpos. 3) produção de anticorpos independente de células T. 4) células B se diferenciam em uma população de memória. 5) anticorpos reconhecem antígenos parasitários na superfície de merozoítos ou de eritrócitos infectados e inibem o parasito através de opsonização ou inibição celular dependente de células (ADCI).

1.4 O Modelo Murino no Estudo da Malária

A malária murina ocorre naturalmente em roedores silvestres africanos e foi adaptada para animais de laboratório logo após a sua descoberta. A primeira espécie de plasmódio de roedores foi descrita por Vinckey em 1946 enquanto estudava o conteúdo estomacal de *An. durenii*. Dois anos mais tarde, o mesmo parasito foi encontrado no sangue de roedores silvestres da espécie *Grammomys surdaster* coletados no Congo, África. O sangue destes animais foi, então, transferido para ratos brancos e se tornou a cepa K173 de *P. berghei*. Depois da adaptação bem sucedida do parasito ao rato branco, outros roedores e anofelinos foram testados e se mostraram suscetíveis a infecção, o que tornou possível a manutenção do ciclo em laboratório (61). Nos anos subsequentes 3 outras espécies foram descobertas e adaptadas para estudo em laboratório: *P. vinckei* (1952), *P. chabaudi* (1965) e *P. yoelii* (1965) (62-66).

Modelos murinos (Tabela 1.1) oferecem a oportunidade de desvendar mecanismos imunológicos que podem estar envolvidos na doença, uma vez que há similaridades entre a resposta imune e características patológicas da infecção em humanos e camundongos (56, 67, 68). Diferentes táxons de plasmódios murinos causam em camundongos infecções com diferentes graus de patogenicidade. Além disso, dentro de uma mesma espécie/cepa de plasmódio, a patogenicidade varia de acordo com a cepa e a linhagem de camundongo utilizada. Em relação à virulência, alguns parasitos causam infecção letal em todas as linhagens de camundongos; outros são letais apenas para determinadas linhagens; e há ainda aqueles que não são letais em nenhuma linhagem de camundongo, desde que o animal seja imunologicamente competente (62). As infecções não-letais geralmente são utilizadas em estudos que tem como objetivo desvendar a dinâmica da patogênese e dos mecanismos imunes e sua regulação. As espécies mais utilizadas com essa finalidade são *P. yoelii* e *P. chabaudi* (66, 69).

De maneira geral, nas infecções não letais os animais apresentam doença transitória com anemia, emagrecimento, hipotermia, hipoglicemia e hepatoesplenomegalia (62). Essas manifestações estão possivelmente relacionadas com o grau de parasitemia e a produção de citocinas pela resposta imune do hospedeiro (62). As infecções letais, ao contrário, cursam com um aumento rápido da parasitemia e morte do animal devido a uma resposta imune inadequada, incapaz

de controlar a replicação do parasito (70). Contudo, cabe ressaltar que, há diferenças entre a malária humana e murina. Nos camundongos, a parasitemia é muito maior do que aquela encontrada em seres humanos, mesmo nas infecções humanas mais graves; a temperatura corporal tende a diminuir (hipotermia) ao invés de aumentar; fígado, pulmão e tecido adiposo, além do cérebro, são locais importantes de sequestro de hemácias parasitadas e/ou leucócitos (68). Além disso, a infecção do animal é realizada, em sua grande maioria, por via intraperitoneal ou intravenosa, não ocorrendo a fase exoeritrocítica da infecção. Entretanto, cabe ressaltar que nenhuma manifestação patológica é atribuída a essa fase no hospedeiro vertebrado (5).

Tabela 1.1: Infecção por plasmódios murinos em diferentes linhagens de camundongos.

Parasito	Cepa	Linhagem do camundongo	Letalidade	Estudo experimental
<i>P. berghei</i>	ANKA	BALB/c C57BL/6 CBA	Letal	Patogênese Malária Cerebral Experimental (MCE) Sequestro
	K173	CBA BALB/c DBA C57BL/6	Letal	Controle para MCE Patogênese
<i>P. yoelii</i>	17XL	CBA BALB/c C57BL/6 DBA Suíço	Letal	Mecanismo Imune Patogênese Sequestro MCE
	YM	CBA BALB/c C57BL/6 DBA	Letal	Vacina Patogênese Hipoglicemia
	17XNL	CBA BALB/c C57BL/6 DBA	Não Letal	Resposta Imune Patogênese Vacina
<i>P. vinckei vinckei</i>		BALB/c	Letal	Quimioterapia Mecanismo imune Patogênese Sinais Clínicos Sequestro
<i>P. vinckei petteri</i>	CR	C57BL/6 BALB/c	Não Letal	Mecanismo imune
<i>P. chabaudi chabaudi</i>	AS	CBA C57BL/6 BALB/c	Não Letal	Mecanismo imune Sinais Clínicos Sequestro
		129sv A/J DBA/2J	Letal	Patogênese Quimioterapia Resistência e Suscetibilidade Mecanismo imune
	CB	CBA C57BL/6	Letal	Mecanismo imune
<i>P. chabaudi adami</i>		BALB/c C57BL/6	Não Letal	Mecanismo imune

Adaptado de Li et al., 2001 (67) & Li Jian et al., 2011 (71).

1.4.1 Aspectos da Resposta Imune da Malária Murina na Fase Eritrocítica

A maior parte dos avanços no entendimento da resposta imune a malária foram provenientes de estudos realizados em modelo murino. Avaliando as respostas celulares envolvidas na resistência e na suscetibilidade as infecções em camundongos, pode-se perceber a função de dois subconjuntos de células T CD4⁺ auxiliaadoras, Th1 e Th2, durante a fase eritrocítica da malária (70). As células Th1 são produtoras de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , citocinas essenciais para a ativação de células efetoras como os macrófagos, que atuam mediando a eliminação de parasitos, enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que induzem a diferenciação de células B para a produção de anticorpos específicos e inibem o desenvolvimento das células Th1(72). O equilíbrio das citocinas produzidas por essas células é importante na determinação do espectro clínico observado na malária. É interessante observar que as células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, conhecidas como reguladoras (Tregs), secretoras de IL-10 e TGF β , mostram-se capazes de modular/inibir ativação de células CD4⁺ e CD8⁺ efetoras assim como das células apresentadoras de antígenos (73-75), auxiliando no equilíbrio entre proteção e a progressão da malária murina.

Assim, em infecções experimentais de camundongos, a parasitemia é aparentemente controlada primeiramente por mecanismos não dependentes de anticorpos e depois por mecanismos dependentes de anticorpos, refletindo a mudança de resposta de perfil Th1 para Th2 (72). Como exemplo, podemos citar as infecções com diferentes cepas de *P.yoelii*. Quando é utilizada a cepa 17XNL, não letal, as respostas Th1 e Th2 são ativadas sucessivamente, ocorrendo um pico de parasitemia entre o 10^o e 15^o dia de infecção com uma resolução da infecção em torno do 20^o dia. No entanto, quando são realizadas infecções com a cepa letal 17XL a resposta Th2 é ativada predominantemente na fase inicial da infecção e as parasitemias se tornam tão altas que o animal morre por volta do 8^o dia de infecção (72).

Trabalhos em diferentes modelos murinos vêm demonstrando que o controle da infecção requer uma resposta inicial de IFN- γ (Th1) seguida de IL-10 (Th2) (76-79). Assim, a dinâmica da produção de citocinas no camundongo determina a suscetibilidade ou resistência do animal a determinados plasmódios. Nos estágios iniciais das infecções não-letais ocorre uma intensa produção de IFN- γ (75-77). Esta citocina pode ser detectada no soro nos dias que antecedem o pico da parasitemia,

mas seus níveis declinam em seguida. A produção do IFN- γ é regulada pela secreção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas que entraram em contato com o parasito. IL-12 é a citocina que suporta a diferenciação de células T CD4⁺ virgens para o perfil Th1. O IFN- γ é uma molécula pró-inflamatória que atua diretamente sobre macrófagos, levando-os a produzir radicais livres de oxigênio e NO, que são moléculas capazes de inibir a proliferação do parasito. Os macrófagos ativados pelo IFN- γ começam a produzir uma segunda citocina pró-inflamatória que está associada ao controle da infecção, o TNF- α . A rápida produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α controla a replicação exponencial do parasito durante o início da fase sanguínea até que a resposta imune adaptativa seja formada (79-81).

O reconhecimento de antígenos pelas células B induz a produção de IL-4 e a polarização para o perfil Th2 (82). Nesse momento, que coincide com o início da queda da parasitemia, começam a ser detectados os primeiros anticorpos IgM e IgG2a. As infecções não-letais são marcadas por aumento significativo de IgG2a seguido pelo aumento de IgG1. Já as infecções letais são caracterizadas pela pequena produção de IgG2a e morte do animal antes mesmo da produção de IgG1 (83). A mudança de classe de anticorpos citofílicos (IgG2a) para não-citofílicos (IgG1) é um processo dependente de IL-4, IL-5 e IL-6 produzidas por células Th2 e por isso ocorre mais tardiamente (84, 85).

A resposta imune desencadeada durante a infecção malárica é regulada por duas citocinas, IL-10 e TGF- β . A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por células Th1, Th2, Tregs, Tr1 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) e macrófagos, que atua principalmente sobre macrófagos ativados inibindo a secreção de mediadores inflamatórios e a apresentação de antígeno. Desta forma, ela inibe tanto a proliferação quanto a síntese de citocinas nas células T CD4⁺, incluindo a produção de IL-2 e IFN- γ pelas células Th1 e IL-4 e IL-5 pelas células Th2 (86). A concentração elevada de IL-10 no início da infecção está associada à inibição da resposta pró-inflamatória que resulta em aumento da parasitemia, anemia, replicação incontrolada do parasito e morte do animal. Isso é o que acontece, por exemplo, em infecções com a cepa letal de *P. yoelii* (17XL). Contudo, a depleção total de IL-10 é prejudicial para o hospedeiro, pois a resposta inflamatória excessiva aumenta o risco de agravamento da doença. Em infecções com a cepa não letal de *P. yoelii* (17XNL), IL-10 é produzida na fase final da doença e passa a apresentar um papel protetor já que não interfere na resposta inflamatória inicial que controla a

replicação do parasito e evita que os danos teciduais por inflamação excessiva ocorram (79, 86, 87). O TGF- β é uma citocina produzida por macrófagos, células NK, células T e células B, que também tem propriedades anti-inflamatórias. Quando em alta concentração essa citocina é capaz de inibir as funções efetoras de células T e macrófagos e bloquear a diferenciação dos subconjuntos Th1 e Th2 (88). Assim como acontece com a IL-10, concentrações muito altas no início da infecção levam ao aumento da parasitemia e morte do animal, enquanto concentrações muito baixas estão relacionadas ao desenvolvimento de imunopatologias (89-91).

1.5 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. O gênero é subdividido em 2 subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* que compreendem várias espécies distribuídas em diferentes regiões do Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e do Novo Mundo (Américas, do Sul dos Estados Unidos a Argentina). Estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas sob risco de infecção e que 2 milhões de casos de leishmaniose ocorram anualmente. A doença é encontrada em 98 países ou territórios, sendo a maior parte dos casos registrados em países em desenvolvimento como o Brasil. A leishmaniose é a segunda causa de morte entre as doenças parasitárias, perdendo apenas para a malária, e é responsável por cerca de 50 mil mortes por ano (92).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos através da picada de dípteros da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Apenas dois gêneros são importantes na transmissão da doença: *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Os flebotomíneos são insetos que apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados sob diversas condições climáticas e altitudes. Seus hábitos são crepusculares e pós-crepusculares e, durante o dia, costumam ser encontrados em tocas de animais e em locais úmidos e com pouca luminosidade (92, 93). A leishmaniose visceral também pode ser transmitida pelo compartilhamento de seringas entre usuários de drogas, por transfusão sanguínea, da mãe para o bebê durante a gestação ou pela relação sexual, porém essas formas de transmissão são bem menos comuns (94-96).

As leishmânias podem infectar o homem e/ou outros animais domésticos e silvestres, sendo o ciclo de transmissão de caráter zoonótico ou antroponótico. No ciclo zoonótico, os animais domésticos e silvestres são considerados reservatórios da doença e são responsáveis pela manutenção e disseminação do parasito. Esse padrão de transmissão é encontrado tanto na América Latina como no Velho Mundo e os fatores de risco para a doença, nesse caso, são urbanização, devastação de florestas e migrações da área rural para áreas urbanas. Já no ciclo antroponótico, o ser humano é considerado a única fonte de infecção para o vetor flebotomíneo. Este padrão está restrito ao Velho Mundo onde as migrações de áreas rurais para áreas urbanas e entre países fronteiriços são os principais fatores de risco para a transmissão da doença (97).

Sob a denominação de leishmaniose encontramos doenças com um amplo espectro clínico que, dependendo da espécie do parasita e da resposta imune do hospedeiro, podem ser classificadas como: tegumentares, que causam lesões na pele ou mucosas, e viscerais, potencialmente fatais e caracterizadas pelo parasitismo de órgãos internos ricos em fagócitos mononucleares. A leishmaniose visceral (ou calazar) é a forma mais grave da doença, sendo causada por espécies de leishmânias que possuem tropismo por fagócitos mononucleares localizados no baço, fígado, medula óssea e linfonodos. Os principais sintomas são febre irregular e prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia e, na fase terminal, caquexia (98). Devido às diferenças de distribuição geográfica, epidemiologia e apresentação clínica, as leishmanioses tegumentares ou cutâneas (LC) são classificadas em Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (99). A forma tegumentar no velho mundo, causada principalmente pela *Leishmania major*, consiste em uma infecção geralmente benigna, na qual a doença humana cursa com o desenvolvimento de uma lesão cutânea única, frequentemente de cura espontânea, levando geralmente ao desenvolvimento de uma imunidade protetora de longa duração. Já a LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde lesões cutâneas pequenas, ulceradas ou não, autolimitadas e com tendência a cura espontânea (leishmaniose cutânea localizada, LCL) até quadros de lesões graves, crônicas e desfigurantes, que caracterizam a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose mucosa (LM) que são formas clínicas graves e de difícil tratamento (Tabela 1.2) (100-102).

A maioria dos casos clínicos de LTA envolve a forma cutânea localizada da doença. A lesão típica, e mais comumente encontrada, é uma úlcera cutânea com borda elevada em moldura, fundo avermelhado e com granulações grosseiras, podendo ou não ser acompanhada de linfadenopatia regional ou linfangite patente (102). Essa lesão surge no local onde ocorreu a picada do flebotômico infectado e evolui da seguinte maneira: primeiro, se forma uma pápula eritematosa que se torna firme e que, em seguida, sofre ulceração. Os pacientes com essa forma clínica respondem bem ao tratamento específico, porém, quando não tratados, apresentam tendência à cura espontânea após meses de evolução (102). A LC Disseminada é uma forma mais rara da doença e é caracterizada pelo aparecimento de várias lesões papulosas, ulceradas ou acneiformes distribuídas pelo corpo. Ela se inicia com uma ou várias lesões localizadas com as características clássicas de úlceras com fundo granulomatoso e bordas elevadas. Pouco tempo depois, ocorre disseminação do parasito por via linfática ou pela circulação sanguínea para outras regiões do corpo. Começam, então, a aparecer úlceras em locais distantes e não relacionados com o local da picada do vetor (102). Essa forma clínica ocorre frequentemente em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e está relacionada a determinadas espécies de leishmânia (103, 104).

Uma proporção relativamente pequena de pacientes desenvolve a LM, enquanto alguns raros pacientes desenvolvem a LCD (105). Estas duas últimas formas representam o grande desafio clínico e terapêutico da LTA. A LM geralmente ocasionada pela infecção com *Leishmania braziliensis* tem como característica principal lesões destrutivas localizadas na mucosa das vias áreas superiores. Essas lesões associadas à intensa resposta inflamatória têm como consequência mais grave a deformação e a mutilação da face. Normalmente as lesões se localizam na mucosa do nariz (90% dos casos), mas lábio, palato, boca, faringe e laringe também podem ser afetados, assim como as orelhas (101). A maioria dos casos de LM são secundários à lesão cutânea. Acredita-se que a disseminação da pele para as mucosas ocorra através da circulação sanguínea ou pelo sistema linfático e, menos frequentemente, pelo contato entre a lesão cutânea e a mucosa quando essas estão em proximidade. Outra possibilidade é que a LM ocorra de forma primária quando a picada do inseto vetor se dá diretamente na mucosa afetada (102). Essa forma clínica de LTA é causada pela *Leishmania amazonensis* e geralmente se inicia com lesão única que não responde ao tratamento e que depois evolui para a formação de placas e nódulos não ulcerados que se espalham por todo o corpo (102, 106).

Tabela 1.2: Principais espécies de *Leishmania* causadoras de doença humana.

Localização	Subgênero	Espécie	Apresentação Clínica	
Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	Leishmaniose visceral	
		<i>L. infantum</i>		
		<i>L. major</i>	Leishmaniose cutânea	
		<i>L. tropica</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. aethiopica</i>	Leishmaniose cutânea difusa	
Novo Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. infantum</i>	Leishmaniose visceral	
		<i>L. infantum</i>	Leishmaniose cutânea	
		<i>L. mexicana</i>		
		<i>L. pifanoi</i>		
		<i>L. amazonensis</i>		
		<i>L. mexicana</i>	Leishmaniose cutânea difusa	
	<i>Viannia</i>	<i>Leishmania</i>	<i>L. amazonensis</i>	
			<i>L. mexicana</i>	Leishmaniose cutânea difusa
			<i>L. amazonensis</i>	
			<i>L. mexicana</i>	Leishmaniose cutânea disseminada
			<i>L. amazonensis</i>	
			<i>L. amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea disseminada
	<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea	
		<i>L. guyanensis</i>		
		<i>L. panamensis</i>		
		<i>L. peruviana</i>		
		<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea disseminada	
		<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniose mucosa	
		<i>L. panamensis</i>		

Adaptado de Kaye & Scott, 2011 (100) e Bañuls et al., 2011(101).

1.5.1 Leishmaniose Tegumentar no Velho Mundo

A apresentação clínica das leishmanioses tegumentares do Velho Mundo varia entre e dentro das regiões, refletindo as diferenças entre as espécies dos parasitos e o ciclo de transmissão envolvido. A leishmaniose tegumentar do Velho Mundo é causada por três espécies de *Leishmania*: *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*. A forma localizada de LC com cura espontânea após meses ou anos é a forma clínica mais comum. Contudo, qualquer uma das três espécies pode causar LM. Infecções com *L. major* e *L. tropica* podem causar lesões mucosas na boca e laringe em pessoas idosas ou com alguma forma de imunossupressão menor. A LCD é causada por *L. aethiopica* e é caracterizada pela presença de lesões não-ulceradas espalhadas pelo corpo que não curam espontaneamente. A forma difusa também pode ser causada pelas outras espécies de *Leishmania* quando o indivíduo

apresenta imunossupressão significativa como, por exemplo, em pacientes coinfectados com HIV ou transplantados (92, 107).

1.5.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

Nas Américas é encontrada uma variedade maior de apresentações clínicas da leishmaniose tegumentar devido ao maior número de espécies presentes no continente. Ao todo, já foram identificadas 11 espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadoras de doenças no ser humano. As manifestações clínicas incluem as formas localizadas, disseminadas, difusas e atípicas de LC e LM, além da forma assintomática. A forma localizada de LC é causada por várias espécies dos dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, e a prevalência da doença varia de região para região das Américas. O envolvimento linfático com linfadenopatia e linfangite geralmente está relacionado às espécies do subgênero *Viannia*. As lesões causadas por *L. mexicana* costumam curar espontaneamente após 3-4 meses, enquanto as lesões causadas por *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* curam após 6 meses na ausência de tratamento específico. A LCD está associada às espécies *L. mexicana* e *L. amazonensis*, havendo um foco importante na República Dominicana. Finalmente, A LC disseminada é determinada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Já a LM é causada por apenas duas espécies, *L. braziliensis* e *L. panamensis*, sendo a maioria dos casos registrados no Brasil, Bolívia e Peru (92).

1.5.3 Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil

No Brasil, sete espécies foram identificadas como agentes etiológicos das leishmanioses tegumentares: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg* e *L. shawi*, sendo as três primeiras as mais prevalentes. *L. braziliensis* é encontrada em todos os estados do território brasileiro e foi a primeira espécie descrita e incriminada como agente etiológico da LTA. A principal complicação a ela atribuída é a forma mucosa da doença. *L. amazonensis* é encontrada em florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal e em alguns estados da região Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul. Normalmente, essa espécie causa úlceras cutâneas localizadas, mas ocasionalmente, alguns indivíduos

podem desenvolver a forma difusa da doença. *L. guyanensis* está distribuída em alguns estados da região Norte, sendo encontrada, principalmente, em áreas de floresta que não alagam no período de chuvas. As lesões são localizadas e raramente há comprometimento de mucosas. As espécies *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg* e *L. shawi* foram identificadas mais recentemente em estados do Norte e Nordeste e tem menor importância epidemiológica (Figura 1.7) (102).

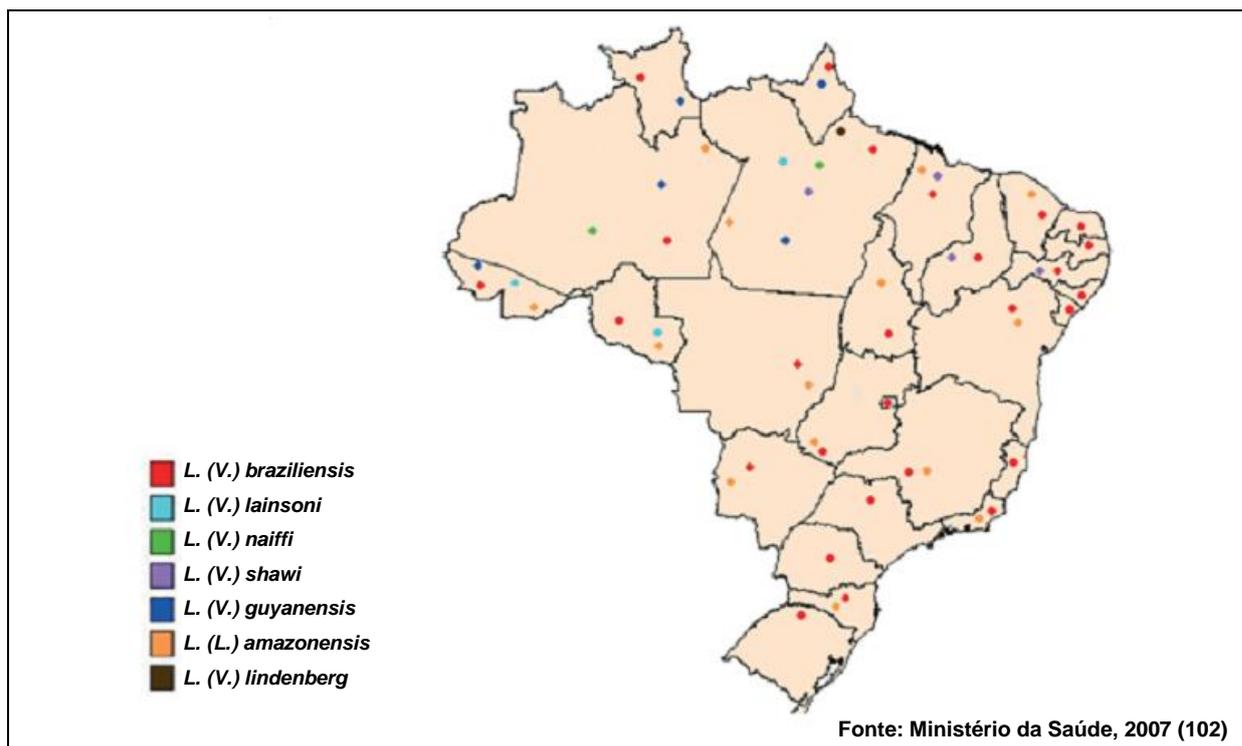


Figura 1.5: Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão de LTA no Brasil.

O Brasil é um dos países que concentram o maior número de casos de LC e LM no mundo (108). Em 2010, foram registrados 23.493 casos e no ano de 2009, 23.318 casos (109). Nas últimas décadas, foi observada uma expansão geográfica das áreas endêmicas para leishmaniose e urbanização da doença. Foram identificados três padrões epidemiológicos da doença no Brasil: silvestre, ocupacional/lazer e rural/periurbano. No primeiro, a transmissão ocorre em área de vegetação primária quando o homem adentra áreas de floresta onde o ciclo é mantido em animais silvestres. O padrão ocupacional ou de lazer está associado à exploração desordenada da floresta com finalidades econômicas como extração de madeira, construção de usinas hidrelétricas, empreendimentos agropecuários ou

ecoturismo. O último padrão, rural ou periurbano, ocorre quando as populações se instalam próximas as matas secundárias ou residuais em áreas de colonização recente onde houve adaptação do inseto vetor ao peridomicílio (102).

1.6 Ciclo Evolutivo das Leishmânias

O ciclo biológico das leishmânias é heteroxeno e relativamente simples. O parasito se apresenta sob duas formas evolutivas: a forma flagelada denominada promastigota encontrada no inseto vetor e a forma amastigota desprovida de flagelo e encontrada no interior de células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado.

O ciclo se inicia quando flebotomíneos fêmeas infectados regurgitam as formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. A peça bucal do inseto dilacera o tecido e os vasos superficiais da pele do hospedeiro, formando um pequeno hematoma onde as promastigotas são introduzidas. Na pele, o parasito entra em contato com as células residentes, isto é, macrófagos, queratinócitos e células de Langerhans. As promastigotas que entram em contato com o sangue ativam a cascata do complemento e são recobertas pela proteína do complemento 3 (C3). Os parasitos são, então, imediatamente fagocitados por macrófagos através de um mecanismo dependente dos receptores de complemento (CR) 1 e 3 que se ligam as frações C3b e C3bi, respectivamente (110). Esse mecanismo de entrada é importante porque não ativa o mecanismo denominado de explosão respiratória no qual são produzidas espécies reativas do oxigênio e nitrogênio que são nocivas para o parasito (111). Outros receptores presentes na membrana do macrófago também participam do processo de internalização do parasito como, por exemplo, o receptor de manose-fucose, os receptores de fração Fc dos anticorpos, os receptores de fibronectina, entre outros (111, 112).

As leishmânias são internalizadas em fagossomos que em seguida se fundem com lisossomos e endossomos e dão origem aos fagolisossomos ou vacúolos parasitóforos. Esses vacúolos apresentam morfologia diferente de acordo com a espécie de leishmânia envolvida na infecção. Alguns são grandes e possuem vários parasitos como os de *L. amazonensis* e os de *L. mexicana*, outros são pequenos e contêm um único parasito como os de *L. major* e *L. donovani*. Apesar disso, os

vacúolos parasitóforos possuem características em comum. Todos são compartimentos ácidos que contém enzimas lisossomais e são envolvidos por uma membrana rica em proteínas lisossomais/endossomais tardias - rab7p, macrosialina, proteína associada à membrana do lisossomo 1 (LAMP-1), LAMP-2 e H⁺ ATPase vacuolar - e moléculas apresentadoras de antígenos (MHC de classe II e H-2M). É nesse local que o parasito se instala e se transforma em amastigota (113). As formas amastigotas se multiplicam no interior do vacúolo parasitóforo até que a célula se rompa. Os parasitos liberados são, em seguida, fagocitados por outros macrófagos dando continuidade a infecção.

Os flebotomíneos, ao se alimentarem do sangue de hospedeiros vertebrados infectados, ingerem macrófagos e monócitos contendo amastigotas. As amastigotas são liberadas no intestino do vetor e se desenvolvem primeiramente em promastigotas procíclicas, que são formas que apresentam um pequeno flagelo e que são capazes de se dividir. As promastigotas procíclicas se transformam em nectomonadas, que são formas maiores do parasito capazes de escapar da matriz peritrófica e se aderirem nas células epiteliais do intestino médio através do flagelo. As formas nectomônadas se transformam em formas leptomônadas que iniciam o segundo ciclo de replicação do parasito. Na válvula do intestino anterior, mais duas formas de promastigotas são encontradas: as haptomônadas e as metacíclicas. As formas haptomônadas são parasitos em forma de folha que possuem flagelos curtos e que funcionam como ponte para outros parasitos e a válvula do intestino anterior ou estomodeu. As promastigotas metacíclicas são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado e se desenvolvem a partir das leptomônadas. Essas formas são menores e mais delgadas que as demais e possuem flagelo longo que permite que o parasito tenha grande mobilidade. A obstrução e a destruição da válvula do estomodeu pelos parasitos faz com que o sangue ingerido pelo flebotomíneo seja regurgitado, carregando as formas promastigotas metacíclicas para um novo hospedeiro vertebrado (114-116).

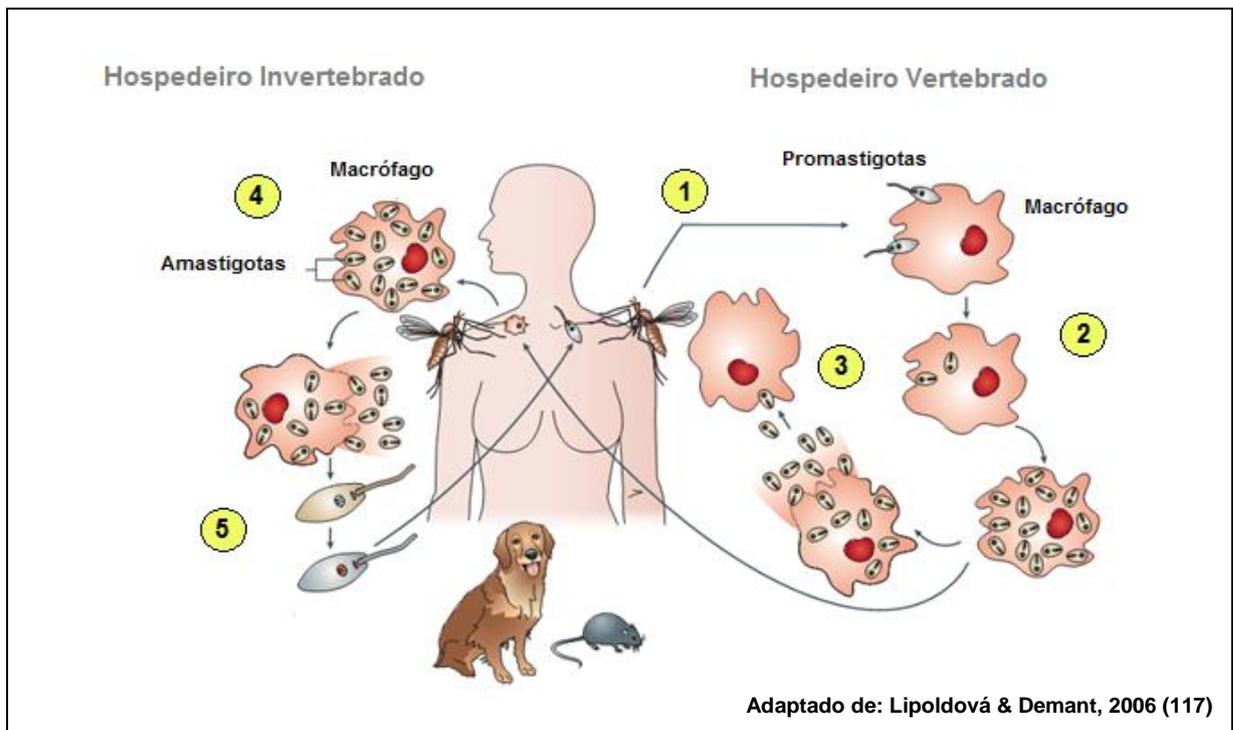


Figura 1.6: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. 1) flebotomíneos infectados transmitem as formas promastigotas para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. 2) as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, se transformam em amastigotas e começam a se multiplicar no interior do vacúolo parasitóforo. 3) os macrófagos parasitados se rompem e as amastigotas liberadas infectam outras células. 4) flebotomíneos fêmeas ingerem macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo. 5) as amastigotas são liberadas no intestino do inseto e se desenvolvem até promastigota metacíclica, a forma infectante para o homem, animais domésticos e animais silvestres.

1.7 Resposta Imune na Leishmaniose

O estabelecimento de uma infecção primária e o desenvolvimento de manifestações clínicas na leishmaniose é dependente de fatores do parasito, do hospedeiro, do vetor, da dose, da forma de inoculação e da manutenção de um estado não reativo nos macrófagos. No que diz respeito ao hospedeiro, uma resposta imune adequada que envolva mecanismos da imunidade inata e adaptativa é fundamental para o controle da doença.

Logo após a inoculação dos parasitos pelo inseto vetor, as promastigotas metacíclicas precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro. Os parasitos entram em contato, primeiramente, com as proteínas do sistema complemento do sangue do hospedeiro e são rapidamente fagocitadas por macrófagos encontrados na derme através de CR1 e CR3 (110). Os macrófagos

infectados têm seus mecanismos de destruição de patógenos intracelulares subvertidos pelas leishmânias e são incapazes de eliminar os parasitos. Além disso, macrófagos infectados por leishmânia não produzem IL-12 que é um estímulo importante para a diferenciação da população de células Th1 (118, 119). No entanto, continuam sendo capazes de produzir outras citocinas inflamatórias que não a IL-12 (119). Essas citocinas promovem o recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos para o local da infecção, onde se instala uma resposta inflamatória que resulta no aparecimento da lesão (120). O dano tecidual e a saliva do inseto vetor também são fatores que promovem a migração de leucócitos para a região afetada (121).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local de infecção. Eles atuam na eliminação do parasito por meio da fagocitose, liberação de redes fibrosas que se aderem ao parasito e por cooperação com macrófagos (121). Apesar dos neutrófilos serem células especializadas na destruição de micro-organismos, estudos recentes mostraram que as leishmânias são capazes de sobreviver em seu interior. Quando os neutrófilos infectados entram em apoptose eles são fagocitados por macrófagos, sem que haja ativação deste último, fazendo com que as leishmânias sejam transferidas para suas células alvo de forma silenciosa (122). Além disso, o parasito também é capaz de deixar o neutrófilo momentos antes da fagocitose e, em seguida, infectar macrófagos não-ativados envolvidos na remoção dos corpos apoptóticos (123). A infecção de macrófagos por parasitos viáveis através de neutrófilos apoptóticos parece ser um mecanismo importante para a manutenção da infecção num primeiro momento, contudo a depleção de neutrófilos mostra-se prejudicial para o hospedeiro e ressalta a importância dessas células no controle da infecção (124).

No decorrer dos dias é observada a migração mais intensa de monócitos para o local da infecção. Na pele, eles se diferenciam em células dendríticas da derme e podem eventualmente fagocitar amastigotas liberadas pela lise dos macrófagos (125). As amastigotas também podem ser fagocitadas pelas células de Langerhans presentes na pele do hospedeiro. Depois da fagocitose, os dois tipos celulares migram para os linfonodos de drenagem. Até pouco tempo, acreditava-se que as células de Langerhans eram as responsáveis pela apresentação de antígenos a linfócitos T nos linfonodos. Contudo, trabalhos mais recentes mostraram que as células dendríticas dérmicas, é que exercem essa função. As células de Langerhans

infectadas teriam função regulatória e estariam envolvidas na persistência do parasito (126, 127).

As células dendríticas que chegam aos linfonodos de drenagem têm papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune celular. Elas são capazes de iniciar a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ e de conferir a polarização para a resposta Th1 ou Th2 (120). Esta habilidade de induzir um ou outro tipo de resposta irá depender do ambiente encontrado na periferia no momento que a célula esteve em contato com o antígeno (128). Em estudos com diferentes linhagens de camundongos infectados com *L. major*, foi observado que a resposta do tipo Th1 leva a cura enquanto a resposta do tipo Th2 contribui para a progressão da doença (129). A polarização e a manutenção do perfil Th1 é determinado pela produção de IL-12 por células dendríticas ativadas que migram até os linfonodos (130-132). As células T CD4⁺ do tipo 1 são produtoras de IFN- γ e TNF- α . Estas citocinas são classificadas como protetoras porque contribuem para a eliminação do parasito através da ativação de macrófagos. Além das células Th1, outra fonte importante de IFN- γ para a ativação dos macrófagos são as células NK (133). O interessante é que a produção de IFN- γ nessas células é parcialmente dependente do estímulo de IL-12 secretada pelas células dendríticas e de IL-2 produzida pelas células T CD4⁺, demonstrando que há uma interação entre a resposta imune inata e adaptativa na leishmaniose (134). Quando ocorre polarização para o perfil Th2, as células T CD4⁺ secretam IL-4. Esta citocina induz regulação negativa da expressão do receptor para IL-12 em células Th1, levando a redução na produção de IFN- γ e um padrão de resposta Th2. Outras citocinas como IL-10, IL-13 e TGF- β também contribuem para a progressão da infecção (135-137). Deve ser destacado, no entanto, que a resposta imune celular é complexa e que células com fenótipo Th1 e Th2 podem ser encontradas simultaneamente (138). O que determina, portanto, a caracterização de um perfil Th1 ou Th2 é a predominância de um tipo celular em relação ao outro.

Outra população de células T CD4⁺ que está relacionada com suscetibilidade a infecção são as células Tregs. Essas células são encontradas com uma frequência relativamente alta na pele em condições normais e têm a função de limitar a resposta imune que ocorre neste tecido que é constantemente exposto a diferentes antígenos (139, 140). Elas são importantes durante a fase efetora da resposta a leishmaniose prevenindo o dano tecidual excessivo, mas também contribuem indiretamente para a sobrevivência do parasito. A atividade supressora das células

Tregs é atribuída à secreção de IL-10. A principal função desta citocina é limitar a resposta imune através da inativação de macrófagos e células dendríticas com consequente inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (141). A inibição da secreção de IL-12, por exemplo, limita o desenvolvimento da resposta Th1 que é importante para a eliminação dos parasitos. De fato, as células Tregs são encontradas com maior frequência em pacientes que apresentam lesões crônicas ou as formas mais graves da doença (142, 143).

Estudos em camundongos identificaram um terceiro subconjunto de células T CD4⁺ efectoras, as células Th17. Elas são células T auxiliaadoras pró-inflamatórias que produzem a citocina IL-17. Esta citocina é responsável pelo recrutamento, migração e ativação de neutrófilos. Acredita-se que a IL-17 participe de mecanismos de proteção de epitélios contra bactérias extracelulares e fungos, mas que também esteja envolvida com dano tecidual em doenças inflamatórias imunomediadas (144). Na leishmaniose experimental, as células Th17 foram associadas à destruição tecidual, pois camundongos deficientes para a citocina apresentam lesões menores e com menos neutrófilos em comparação às lesões de camundongos normais. Adicionalmente, níveis elevados de IL-17 não conferiram diminuição da carga parasitária (145). O papel das células Th17 e dos neutrófilos no dano tecidual também vem sendo demonstrado na leishmaniose tegumentar humana, na qual essas células foram associadas à patogênese da forma mucosa da doença (146, 147).

O papel dos linfócitos T CD8⁺ no controle da leishmaniose ainda não está bem definido, mas estudos em humanos e camundongos mostraram que essas células são importantes no controle da infecção (148-151). Acredita-se que elas atuem através da produção de citocinas ou por atividade citotóxica. Em estudos *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico de humanos que foram expostas ao parasito foi demonstrada a produção de IFN- γ por células T CD8⁺, favorecendo uma resposta protetora com perfil Th1 (152). Também foi observada uma pequena produção de IL-10 que aparentemente regula os efeitos pró-inflamatórios do IFN- γ (153). A citotoxicidade, ao contrário, seria um mecanismo que atuaria diretamente sobre os macrófagos infectados levando-os a lise, mas que poderia causar algum grau de dano tecidual que contribui para o aparecimento e evolução das lesões (154-157).

1.8 Modelo Murino no Estudo da Leishmaniose

A utilização de modelos murinos no estudo da leishmaniose é de fundamental importância, pois permite que diferentes aspectos do ciclo biológico, do processo de infecção e da interação parasito-vetor sejam observados sob condições controladas. A maioria dos casos de leishmaniose tem origem zoonótica e, muitas vezes, os reservatórios naturais da doença são roedores encontrados em desertos, savanas ou florestas. Este fato tornou a adaptação de roedores de laboratórios como modelos experimentais para o estudo da leishmaniose algo relativamente fácil para a maioria das espécies de *Leishmania*. Mesmo as espécies antroponóticas (como *L. donovani* e *L. tropica*) ou aquelas em que os animais reservatórios não são roedores (*L. infantum* e *L. chagasi*) puderam ser empregadas em estudos com animais de laboratório, desde que altas doses ou inóculos sistêmicos do parasito fossem utilizados (158).

O modelo murino reproduz muitos aspectos das leishmanioses encontradas no Velho e no Novo Mundo. Os padrões produzidos durante a infecção experimental dependem da linhagem de camundongo, da espécie de leishmânia, do número de parasitos e da via de inoculação (Tabela 1.3) (129, 159). Assim, os animais podem ser resistentes ou suscetíveis à infecção dependendo das condições experimentais, o que os torna excelentes modelos para o estudo das diversas manifestações clínicas que ocorrem nas doenças humanas. Apesar dos benefícios, os modelos murinos para estudo das leishmanioses humanas têm algumas limitações. A primeira delas é a variação genética existente na população humana que não é reproduzida nas linhagens de camundongos isogênicas. Também não existem modelos murinos para a leishmaniose mucosa e os modelos existentes para leishmaniose visceral não reproduzem todos os aspectos da infecção natural, visto que os parasitos são inoculados em grande número por via subcutânea ou intravenosa e a infecção determinada pela picada do flebotomíneo ocorre inicialmente na pele (160).

Tabela 1.3: Infecção experimental com *Leishmania* sp. em diferentes linhagens de camundongos.

Espécie	Via de infecção	Linhagem de camundongo	Evolução
<i>L. major</i>	Subcutânea	BALB/c	Progressiva
		DBA/1	Crônica
		DBA/2	
		CBA	Cura
		C3H	
<i>L. mexicana</i>	Subcutânea	A/J	
		C57BL	
		BALB/c	Progressiva
		DBA/2	Sem lesão
		C3H	Crônica
<i>L. amazonensis</i>	Subcutânea	C57BL	
		A/J	Cura
		BALB/c	Crônica
<i>L. braziliensis</i>	Subcutânea	C57BL/10	
	Intradérmica	BALB/c	Sem lesão
		BALB/c	Cura

Adaptado de Sacks DL *et.al.*, 2001 (158).

No estudo da leishmaniose cutânea, três modelos de infecção podem ser utilizados de acordo com o local em que é realizado o inóculo: pata, base da cauda ou orelha (Figura 1.9). Os modelos de infecção na pata traseira e na base da cauda foram os primeiros a serem utilizados. Neles, o número de parasitos inoculados varia de 10^5 a 10^7 e a via é subcutânea. O modelo de infecção na orelha é mais recente e tem como vantagem o fato de reproduzir melhor a infecção natural pelo inseto vetor porque são utilizadas doses menores do parasito (10^3 a 10^5) e a via é intradérmica (161, 162). A resistência à infecção nesses modelos é avaliada pela capacidade do animal controlar o crescimento da lesão, controlar o número de parasitos e montar uma resposta imune protetora.



Figura 1.7: Leishmaniose cutânea experimental em camundongos. (A) Infecção na pata; (B) Infecção na base da cauda; e (C) Infecção na orelha.

A infecção subcutânea com *L. major* em camundongos é o modelo de infecção mais bem estudado. Nele, são empregadas altas doses de parasito e o inóculo é realizado na pata ou na base da cauda. Determinadas linhagens de camundongos, como BALB/c e SWR/J, não são capazes de controlar a infecção e desenvolvem lesões progressivas e doença sistêmica. Esses camundongos são utilizados como modelos de infecções humanas que não curam, como o calazar e a forma difusa de leishmaniose tegumentar, e que estão associadas a outras espécies de *Leishmania* (163). A maioria das linhagens de camundongos (C57BL/6, C57BL/10, B10.D2, C3H, A/J, DBA/1, AKR, CBA e NZB), no entanto, apresentam lesões cutâneas localizadas que curam espontaneamente (163, 164). Além disso, esses animais não desenvolvem novas lesões quando são inoculados pela segunda vez com o mesmo parasito (164).

Modelos experimentais com inoculação subcutânea de *L. braziliensis* também foram desenvolvidos. Em camundongos a infecção subcutânea não resulta em infecção ou apresenta apenas em pequenos inchaços que logo em seguida desaparecem (129). Essa dificuldade também ocorre com outras espécies do subgênero *Viannia* (*L. panamensis* e *L. guyanensis*) e, por esse motivo, outro roedor de laboratório mais suscetível é utilizado como modelo experimental para esses parasitos. O hamster da espécie *Mesocricetus auratus* quando infectado com *Leishmania* (*Viannia*) spp. apresenta lesões com evolução rápida que, sob determinadas condições experimentais, podem se disseminar. Essa característica de evolução rápida das lesões faz com que esses animais sejam utilizados com frequência no isolamento de leishmânias a partir de amostras de campo (129). Uma alternativa ao uso de hamsters é a utilização do modelo de infecção intradérmica na

orelha. Camundongos da linhagem BALB/c, ao serem infectados por essa via, desenvolvem lesões ulceradas que curam espontaneamente. A importância deste modelo no estudo da leishmaniose humana está no fato do desfecho clínico nos animais ser semelhante ao observado nos seres humanos, principalmente em relação ao aparecimento de úlceras na lesão, persistência do parasito e resposta imune (162).

1.8.1 Aspectos da Resposta Imune a Leishmaniose no Modelo Murino

O modelo murino de infecção com *L. major* foi o primeiro a demonstrar de forma direta a relevância do balanço entre a resposta do tipo Th1 e Th2 na evolução da doença. A predisposição genética à suscetibilidade ou resistência em camundongos está relacionada com a produção de IL-4, que induz a resposta Th2 prejudicial ao hospedeiro, ou a produção de IL-12 e IFN- γ da resposta Th1, que determina o controle do número de parasitos e a cura (163).

Em camundongos BALB/c infectados com *L. major* foi observada uma maior frequência de resposta inicial de células T CD4⁺ secretoras de IL-4 em função da ligação ao antígeno de *Leishmania* homólogo à receptores de quinase C ativada (LACK) (165-168). Para verificar se a produção inicial de IL-4 era a responsável pela suscetibilidade desses animais foram realizados experimentos com camundongos de *backgrounds* de resistência transgênicos que expressavam constitutivamente essa citocina. Foi então observado que esses animais eram capazes de desenvolver uma resposta Th1 mesmo na presença de IL-4, mas não eram capazes de controlar a infecção (169, 170) provavelmente porque as citocinas Th2 inibem a ativação dos macrófagos e predominam sobre os efeitos da resposta Th1 (163). Portanto, a habilidade de redirecionar a resposta Th2 inicial para a resposta Th1 é que parece estar mais envolvida com resistência à infecção. De fato, a produção de IL-12 ocorre mais tardiamente nos animais resistentes e camundongos BALB/c apresentam deficiências na produção/atividade desta citocina (163).

A resposta Th2 sustentada pelo antígeno LACK no modelo de infecção por *L. major* em camundongo BALB/c parece ser responsável pela suscetibilidade desses animais. Contudo, IL-4 não é o único fator envolvido no direcionamento para uma resposta deletéria, já que animais deficientes para essa citocina continuam sendo

suscetíveis (171). As citocinas IL-13, IL-10 e TGF- β também são importantes nesse processo à medida que sustentam a inibição do desenvolvimento da resposta Th1 (163).

Camundongos resistentes à infecção com *L. major* apresentam resposta imune específica mediada por células Th1. O desenvolvimento da resposta Th1 é mediado e mantido pela secreção de IL-12 (132, 172). Aparentemente a produção continuada dessa citocina é importante para a prevenção da diferenciação de células precursoras não-comprometidas (Th0) em células Th2, porque as condições que promovem a resposta inicial Th2 no momento da infecção podem ser re-estabelecidas a qualquer momento em que haja depleção de IL-12 (173). A produção de IL-12 é sustentada por células dendríticas (120), já que macrófagos infectados com *Leishmania* sp. são incapazes de produzir a citocina (118, 119).

As células NK são componentes adicionais no desenvolvimento da resposta Th1. Essas células do sistema imune inato são produtoras de IFN- γ que, por sua vez, otimiza a produção de IL-12 pelas células dendríticas e a expressão de receptores de IL-12 nas células T ativadas (163). A elevada produção de IFN- γ é característica da resposta Th1, sendo essencial para o controle da infecção por *L. major* nos camundongos resistentes (174). O IFN- γ é a principal citocina efetora da morte de amastigotas intracelulares de acordo com observações *in vivo* e *in vitro* (175, 176). Macrófagos ativados por essa citocina mostram aumento da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) com produção de NO e radicais reativos do oxigênio que levam a morte do parasito. Além do IFN- γ , TNF- α , que é outra citocina da resposta Th1, atua na eliminação dos parasitos. Foi verificado que IFN- γ e TNF- α possuem ação sinérgica e são as duas citocinas responsáveis pelo controle e eliminação das amastigotas intracelulares, pois doses subótimas de cada uma em associação levaram à produção de NO e morte dos parasitos (177).

Os estudos com infecção experimental por *L. braziliensis* são mais escassos devido às dificuldades de cultivo *in vitro* do parasito e a resistência da maioria das linhagens de camundongo à infecção. No modelo de infecção subcutânea, as linhagens C3H/HeJ, C57BL/6 e CBA/CaJ não mostraram nenhuma evidência de infecção enquanto as linhagens AKR/J e CBA/J apresentaram um edema pequeno e de curta duração quando os parasitos foram injetados no focinho dos animais. Já as linhagens SWR/J, C57L/J, A/J, A/HeJ e DBA/1J, desenvolveram pequenos nódulos

que curaram espontaneamente. A linhagem de camundongos BALB/c foi considerada a mais suscetível à infecção apesar dos animais não desenvolverem lesões graves e de longa duração (178).

O controle da infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c no modelo de infecção subcutânea se mostrou dependente da produção de IFN- γ . Também foi verificada uma produção menor de IL-4 por células do linfonodo desses animais em comparação com as células de camundongos infectados com *L. major* (179). Mais recentemente, foi verificado que a cura das lesões também está relacionada à maior expressão de IL-12 e TNF e à menor expressão de IL-10 e IL-13 no linfonodo (180), demonstrando que o balanço entre as respostas Th1 e Th2 é essencial para que a infecção curse para a cura espontânea. No modelo de infecção intradérmica na orelha algo semelhante foi encontrado. Ao analisar as citocinas produzidas por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ desses animais foi observada uma intensa produção de IFN- γ . A potente resposta imune celular Th1 induzida está relacionada ao controle da replicação do parasito na lesão. Em contrapartida, os efeitos do IFN- γ são contrabalanceados com a presença de IL-4, IL-5 e IL-10. Como resultado do equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, as lesões curam espontaneamente e os parasitos são eliminados do local de infecção, mas não dos linfonodos (162).

A infecção experimental com *L. amazonensis* cursa de forma diferente dependendo da linhagem de camundongo utilizada. Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/10 são considerados mais suscetíveis à infecção e desenvolvem lesões crônicas (181, 182), enquanto camundongos das linhagens C3H, DBA, CBA e C57BL/6 apresentam resistência parcial à infecção com desenvolvimento mais demorado das lesões (183). Como não existe nenhuma linhagem de camundongo realmente resistente a infecção por *L. amazonensis*, a caracterização de uma resposta imune protetora e o papel da dicotomia de Th1 e Th2 não é bem definido neste modelo. De maneira geral, acredita-se que a resposta Th1 esteja relacionada à resistência e a resposta Th2 à suscetibilidade, sendo a combinação das duas responsável pelo desfecho da infecção. A suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* pode ser, portanto, resultado de uma série de fatores como a ausência da resposta Th1 (178), a prevalência da resposta Th2 sobre a resposta Th1 (184), ou a presença das duas respostas de maneira ineficiente (185). Mesmo a polarização para a resposta do tipo Th1 não confere necessariamente o fenótipo de resistência aos animais (186, 187). Tudo isso indica que outros mecanismos estão atuando na

modulação da resposta imune durante a infecção com *L. amazonensis*. Com efeito, foi demonstrado que há regulação da expressão de IL-12, de maneira independente de IL-4, induzida pelo patógeno que limita a resposta do tipo Th1 nas infecções com *L. amazonensis* (188). Foi verificado, então, que a deficiência na resposta a IL-12 em camundongos infectados com *L. amazonensis* estava associada com um defeito específico na cadeia beta 2 do receptor de IL-12 que leva a uma diminuição da expressão do receptor funcional dessa citocina (188).

1.9 Coinfecção

A coinfecção humana por múltiplas espécies de parasitos na natureza é comumente observada e recentemente estudos epidemiológicos indicam que essa complexa interação representa um desafio na ecologia de parasitos e na saúde humana. O estudo das coinfeções ganhou força com o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) quando doenças oportunistas começaram a causar mortes nos indivíduos portadores do HIV.

No homem, têm sido descritas associações da infecção por plasmódio com salmonela, helmintos, HIV e tuberculose (189-195), a maioria em populações africanas. Recentemente um caso de coinfecção por *P. vivax* e uma espécie de leishmânia do Complexo donovani (leishmaniose visceral) foi descrito na Malásia demonstrando a ocorrência das duas doenças simultaneamente e ressaltando as dificuldades no diagnóstico e tratamento de indivíduos coinfectados (196).

Atualmente, os dados existentes sobre coinfecção são controversos, alguns mostrando ora maior, ora menor susceptibilidade, ou nenhuma influência na evolução da malária clínica grave ou com acometimento cerebral (197, 198). A coinfecção por *Leishmania* spp. e HIV já é bem documentada no Brasil e alguns trabalhos mostram que a LTA pode modificar a progressão da doença pelo HIV e a imunodepressão causada por esse vírus facilita a progressão da LTA (199-201). Também foi verificado que as coinfeções por *L. braziliensis* e helmintos em humanos alteram tanto o curso clínico da leishmaniose cutânea quanto à resposta imune à infecção, ocorrendo aumento no tempo de cura das lesões e mudança de perfil de resposta Th1 para Th2 (202, 203).

No modelo murino, há evidências de que animais infectados concomitantemente por *P. yoelii* e *Mycobacterium tuberculosis* apresentam uma mudança significativa no curso da tuberculose com aumento na morbidade (204, 205), em contraste a vacinação dos animais com *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) protege camundongos contra a infecção pelas espécies *P. vinkei*, *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. chabaudi* (206, 207). Mais recentemente foi observado que o metabolismo do heme na infecção malárica altera os mecanismos de explosão oxidativa dos granulócitos e que isso contribui para a suscetibilidade à infecção por salmonela (208, 209).

Em 1980, Coleman e colaboradores estudaram interações entre *L. amazonensis* e *P. yoelii* no modelo murino e demonstraram um aumento na severidade e susceptibilidade da infecção durante a coinfeção (210). Marques e colaboradores mostraram que a regulação da resposta imune pelas células T CD4 e a produção de citocinas podem ser essenciais no curso clínico da infecção tanto por *P. chabaudi* quanto por *L. infantum* (211). No entanto, a avaliação dos efeitos decorrentes da coinfeção por plasmódios é limitada a poucos trabalhos. A infecção concomitante por *P. yoelii* e *L. amazonensis*, em camundongos resistentes a leishmaniose mostrou um aumento de parasitemia do *P. yoelii* quando *L. amazonensis* foi inoculada semanas antes do inóculo com *P. yoelii* (210). As lesões devido a *L. amazonensis* também se mostraram aumentadas nos camundongos concomitantemente infectados por *P. yoelii* em comparação com camundongos infectados apenas por *L. amazonensis* (210).

No Brasil, e em outras regiões do mundo, malária e leishmaniose são doenças endêmicas. Na Amazônia, malária e LTA apresentam alta prevalência e a superposição das áreas de distribuição aumenta as chances de ocorrência das duas doenças simultaneamente (14, 98). Embora *L. braziliensis* seja a espécie mais frequente entre as causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil e esteja presente em áreas endêmicas de malária, não existem dados de prevalência da coinfeção humana dessas endemias e nem estudos no modelo murino. O mesmo é observado para *L. amazonensis*, para a qual também não existem dados sobre a prevalência da coinfeção humana e apenas dois trabalhos em modelo experimental realizados no ano de 1988 (210, 212). Considerando que no Brasil a população está exposta a diferentes patógenos, é de extrema importância estudar a interação desses parasitas e as alterações que podem causar no equilíbrio entre a resposta imune e a evolução clínica da doença.

O modelo experimental utilizando roedores é bem aceito no meio científico e a grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção por diferentes espécies de *Plasmodium* e de *Leishmania* tem contribuído para elucidar aspectos envolvidos na patogênese dessas doenças. Desta forma, o modelo murino de coinfeção além de complementar os estudos serve de base para responder questões que não podem ser respondidas em humanos. Dentre elas qual a influência que as infecções com perfil de resposta imunológica Th2 (que pode ser transitório) exerce na modulação das infecções que apresentam perfil de resposta Th1. Ou o contrário, qual a influência que as infecções indutoras de perfil Th1 (que pode ser transitório), principalmente com alta produção de IFN- γ , tem na evolução clínica das infecções com perfil de resposta imunológica Th2. Com efeito, o entendimento dos mecanismos imunopatogênicos e das alterações na resposta imune de indivíduos poli-infectados é um pré-requisito necessário para o desenvolvimento tanto de vacinas quanto de terapias eficazes para populações expostas a diferentes patógenos.

3.1 Objetivo Geral

Estudar no modelo murino as coinfeções por *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis*, as alterações na resposta imune e o impacto de uma infecção sobre a evolução clínica da outra.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a evolução das mono e coinfeções por *P. yoelii* 17XNL e por *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* em camundongos BALB/c;
- Estudar o perfil imunológico celular dos animais mono e coinfectados através da quantificação “*ex vivo*” de células T CD4⁺, CD8⁺ e Tregs e o perfil de resposta do tipo Th1 ou Th2 através das citocinas IFN- γ e IL-4 ou IL-10;
- Analisar a cinética dos níveis séricos de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-4, IL-17 e IL-10) dos camundongos mono e coinfectados;
- Verificar as possíveis influências das coinfeções por *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* no perfil imunológico e na evolução da malária e das leishmanioses nos camundongos BALB/c.

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas da linhagem BALB/c, livres de patógenos específicos (SPF, *specific pathogen free*), com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) do IOC/FIOCRUZ. Durante a fase experimental os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Pavilhão Leônidas Deane do IOC, sob temperatura de 18°C, umidade relativa de 50% (+/- 5%) e recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram manipulados de acordo com o protocolo de estudo aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA-FIOCRUZ), sob a licença LW-17/11(Anexo 1).

4.2 Parasitos

4.2.1 *Plasmodium yoelii* 17XNL (não letal)

O plasmódio murino, *P. yoelii* 17XNL, foi gentilmente cedido pelo Dr. Fábio Costa da Universidade de Campinas-SP e vem sendo mantido em nosso Laboratório desde 2006, criopreservado a -196°C em solução de *Alserver*.

4.2.2 *Leishmania braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*

As espécies de leishmânias, *Leishmania braziliensis* (MCAN/BR/98/R619), *Leishmania major* (LV39-MRHO/SU/59/P) e *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), previamente caracterizadas através de três diferentes técnicas moleculares (análise do perfil de restrição do DNA do cinetoplasto, eletroforese de isoenzimas e radioimunoensaio usando anticorpos monoclonais específicos), são provenientes do Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz e mantidas criopreservadas a -196 °C, em meio Schneider contendo 30% de Soro Bovino Fetal (SBF, Hyclone - EUA) inativado e 8% de glicerol.

4.3 Infecção Experimental

4.3.1 *Plasmodium yoelii* 17XNL (não letal)

Para a infecção, alíquotas de sangue de camundongos, contendo 2×10^8 hemácias parasitadas (HP)/200 μ L, foram descongeladas à temperatura de 36°C e inoculadas em camundongos BALB/c por via intraperitoneal (Ip). Esses camundongos foram fontes de parasitos para infecção dos animais do experimento. Após 7 dias do inóculo, o sangue destes animais foi coletado (em heparina, 500UI). Em seguida, a parasitemia (em geral, em torno de 30%) e a hematimetria foram determinadas para o ajuste da concentração de parasitos a serem inoculados nos camundongos do experimento, segundo a Tabela 4.1.

4.3.2 *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*

As leishmânias, *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*, foram mantidas em cultura no meio Schneider Drosophila (Sigma) com 10% de SBF, 100 UI de penicilina, 100 μ g de estreptomicina e 1.5mM de glutamina (todos reagentes da Sigma). As formas promastigotas até a quinta passagem em cultura foram mantidas em estufa para Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) à 25°C até que atingissem a fase estacionária. Os parasitos foram, então, centrifugados por 10 minutos a 1000 X g e ressuspensos em salina tamponada com fosfatos (PBS 0,15 M, pH 7,2). Neste momento foi realizada a contagem em câmara de Neubauer e o ajuste da concentração dos parasitos para a realização dos inóculos segundo a Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Infecção experimental de camundongos BALB/c com *P. yoelii* 17XNL e *Leishmania* sp.

Parasitos	Via de Inóculo	Inóculo/Animal
<i>P. yoelii</i> 17XNL	Ip	1×10^6 HP / 200 μ L de NaCl 0,9%*
<i>L. braziliensis</i>	Id – orelhas	1×10^5 parasitos /10 μ L de PBS*
<i>L. major</i>	Id – orelhas	1×10^4 parasitos / 10 μ L de PBS*
<i>L. amazonensis</i>	Id – orelhas	1×10^4 parasitos / 10 μ L de PBS*

HP = hemácias parasitadas; Ip = Intraperitoneal; Id = Intradérmica. * estéril

4.4 Desenho Experimental

4.4.1 Grupos de Animais

Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais, segundo a Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Grupos de animais.

Grupos (G)	Inóculos	Número de animais/Grupo
Controle		
1-	NaCl 0,9% estéril	20 (10 por experimento)
Mono infectados		
2 -	<i>P. yoelii</i>	25 (10 e 15 por experimento)
3 -	<i>L. braziliensis</i>	25 (10 e 15 por experimento)
4 -	<i>L. major</i>	25 (10 e 15 por experimento)
5 -	<i>L. amazonensis</i>	20 (10 por experimento)
Coinfectados		
6 -	<i>L. braziliensis</i> e <i>P. yoelii</i>	25 (10 e 15 por experimento)
7 -	<i>L. major</i> e <i>P. yoelii</i>	25 (10 e 15 por experimento)
8 -	<i>L. amazonensis</i> e <i>P. yoelii</i>	25 (10 e 15 por experimento)

Como ilustrado na figura 4.1, os camundongos foram primeiramente infectados com uma das três espécies de *Leishmania* três dias antes (-D3) da infecção com o *P. yoelii* definido como dia zero do experimento (D0), segundo as Tabela 4.1 e Tabela 4.2. Nos dias 5, 10, 17, 25 e 77 (11 semanas) do experimento, 2 camundongos por grupo foram submetidos à eutanásia e amostras de baço, orelhas e alíquotas de sangue foram coletadas, processadas e/ou armazenadas para as análises imunológicas e parasitológicas. Os experimentos foram repetidos por duas vezes. Cabe ressaltar que experimentos preliminares foram realizados para definição das doses, vias de infecção e pontos de avaliação imunológica. Os camundongos foram acompanhados ao longo de 11 semanas para avaliação da evolução das lesões e da variação de peso.

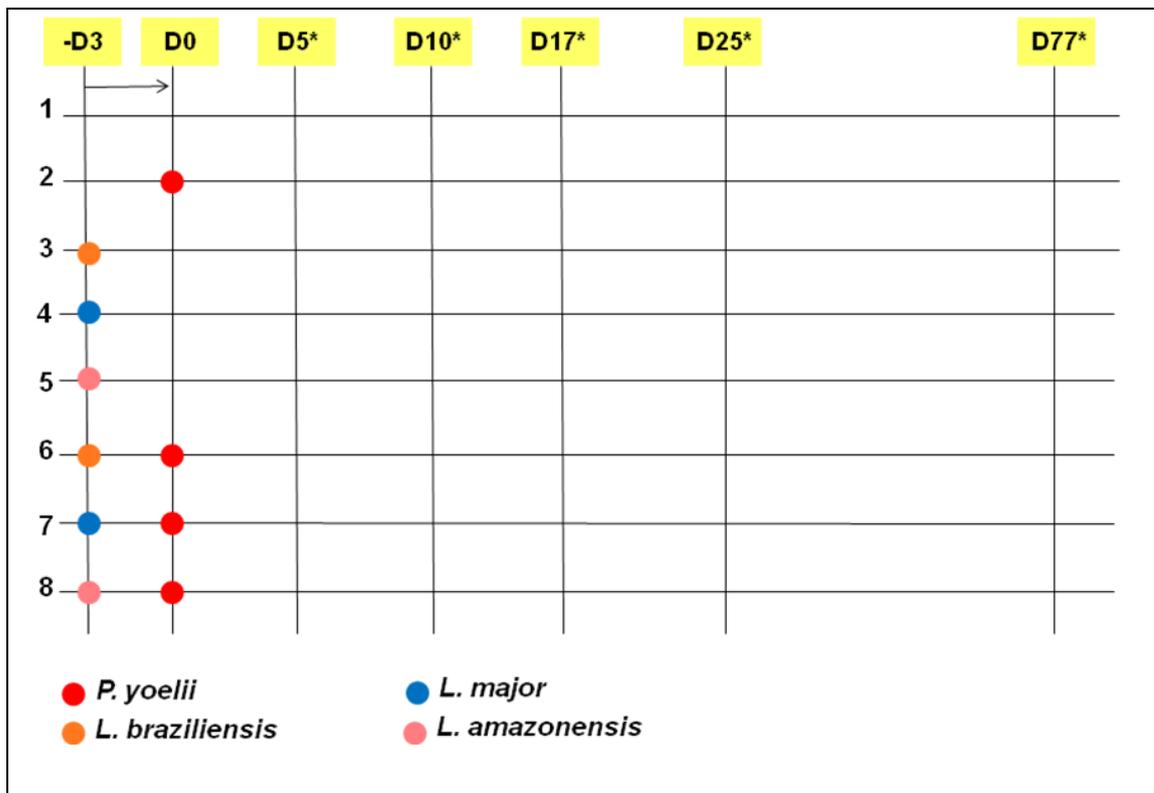


Figura 4.1: Cronograma de infecção. D= dia; 1= controle; 2= *P. yoelii*; 3= *L. braziliensis*; 4= *L. major*; 5= *L. amazonensis*; 6= *L. braziliensis* e *P. yoelii*; 7= *L. major* e *P. yoelii*; 8= *L. amazonensis* e *P. yoelii*; *= avaliações imunológicas e parasitológicas.

4.5 Acompanhamento da infecção

4.5.1 *P. yoelii*

- **Determinação da parasitemia, temperatura e peso**

Para a avaliação da infecção por *P. yoelii* 17XNL foram confeccionadas distensões sanguíneas em dias alternados, a partir do terceiro dia de infecção até o final do experimento. As distensões sanguíneas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. As leituras foram realizadas em microscópio óptico com lente de imersão (1000 X). A parasitemia foi estimada pela contabilização do número de células parasitadas em um total de 1000 hemácias.

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de hemácias parasitadas} \times 100}{1000 \text{ hemácias}}$$

Paralelamente à avaliação da parasitemia, foi aferida a temperatura corporal e o peso dos animais. A temperatura corporal foi determinada utilizando um termômetro clínico digital (G-Tech, modelo TH 300 K) introduzido no reto dos animais por cerca de dois minutos e a verificação semanal do peso dos animais foi feita utilizando uma balança de precisão (Shimadzu BL 320H). A verificação da temperatura corporal foi realizada a partir do 5º dia (D5) de infecção dos animais infectados com o *P. yoelii* 17XNL até o 25º dia, em dias alternados. O peso dos animais foi aferido semanalmente durante as 11 semanas do estudo. Ao final do experimento foi construída uma curva da sobrevivência dos animais, descontando aqueles que foram selecionados para as avaliações imunológicas e parasitológicas.

4.5.2 *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*

- **Determinação do Aparecimento, Tamanho de Lesões e do Número de Úlceras**

A evolução da infecção por *Leishmania* sp. foi acompanhada semanalmente pela medição do tamanho das lesões nas orelhas utilizando o paquímetro digital Mitutoyo *Absolute Digimatic* (Figura 4.2). Simultaneamente, foi verificado o momento do aparecimento e o número de úlceras nas lesões durante os 77 dias (11 semanas) que os animais foram acompanhados.

Foto: Rodrigo Méxas, 2011



Figura 4.2: Paquímetro utilizado para medir o tamanho das lesões por *Leishmania* sp.

4.6 Avaliação da Carga Parasitária de *Leishmania* sp. nas Lesões

A carga parasitária das lesões foi quantificada pelo método de diluição limitante nas orelhas infectadas dos animais do estudo. Com este objetivo, foram selecionados dois camundongos de cada grupo mono infectado ou co infectado com *Leishmania* sp. nos dias 5, 10, 17, 25 e 77 (11semanas). Sendo, portanto, analisadas 4 orelhas por grupo de estudo.

As orelhas foram retiradas de forma asséptica após a eutanásia dos animais e colocadas em tubos de 50mL com 10mL de etanol (álcool etílico) a 70% por 10 a 15 minutos. Decorrido este tempo, as orelhas foram retiradas dos tubos e colocadas sobre papel de filtro estéril até que o álcool evaporasse por completo. Com o auxílio de pinças, separou-se a parte dorsal da parte ventral das orelhas, expondo a derme da mesma. Feito isto, as orelhas foram colocadas com a parte interna voltada para baixo em placas de 24 poços (Nunc) com 0,5mL de meio Schneider com antibiótico e Liberase (0,05mg/mL, Roche). Após duas horas de incubação a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, as orelhas foram cortadas em pequeníssimos pedaços com tesoura curva e homogeneizadas com *Pestle* em um volume de 2mL de meio Schneider. Em seguida, foi realizada a diluição limitante com o *pool* das orelhas de cada grupo em placas de 96 poços (Nunc). No primeiro poço foi feita uma diluição de 1:5 e nos poços seguinte a diluição seriada de fator 3 até completar 16 poços. As placas foram, então, incubadas em estufa BOD por 7 dias a 26°C. Nos dias 5 e 7 os poços foram observados em microscópio invertido e o último poço que apresentava parasito no dia 7 foi marcado. Neste poço, considerou-se que apenas 1 parasito foi depositado inicialmente. A partir do valor de diluição do último poço positivo e o volume inicial de macerado da orelha, o número de parasitos por lesão é calculado.

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitos na lesão} = \frac{5 \text{ (primeira diluição)} \times 3^a \times 50}{\text{número de orelhas}}$$

a= número do último poço com diluição 1:3 positivo

4.7 Obtenção e Armazenamento de Esplenócitos de Camundongos

Para obtenção de esplenócitos, camundongos (n=2, por grupo) foram submetidos à eutanásia nos dias 5, 10, 17, 25 e 77 (11 semanas) do experimento. Os baços foram retirados de forma asséptica e colocados em placas de *Petri* contendo 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco). Em seguida, os órgãos foram macerados com o auxílio de uma peneira de nylon (BD Falcon *Cell Strainer*) e um pistilo. O material foi recolhido em tubos tipo *Falcon* de 50mL e após completar o volume para 15mL com RPMI 1640 foi centrifugado (400 X g, 10 minutos, 10°C). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi desprezado e as células foram submetidas a mais 2 lavagens com 15mL de meio RPMI 1640 como descrito anteriormente. Após retirar o sobrenadante da última lavagem, as células foram ressuspensas em 4mL de SBF inativado (Hyclone) contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Este volume foi distribuído igualmente em quatro tubos de criopreservação de 1,8mL (Nunc) que foram acondicionados em criobox (Nalgene) contendo álcool isopropílico. Os containers criobox foram imediatamente acondicionados em freezer com temperatura de -70°C, onde permaneceram por 24h. Posteriormente, as alíquotas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento em que foram descongeladas para serem utilizadas nas imunofenotipagens.

4.8 Descongelamento de Esplenócitos Obtidos de Camundongos

As alíquotas de esplenócitos murinos foram descongeladas no dia da imunofenotipagem. Para isso, os tubos foram retirados do nitrogênio líquido e levados rapidamente ao banho-maria a 37 °C. Antes do descongelamento completo a solução contida no criotubo foi transferido para um tubo cônico estéril de 15mL. Em seguida, a solução de descongelamento composta por 90% de meio RPMI 1640 (GIBCO, EUA) e 10% SBF inativado (Hyclone, EUA) foi acrescentada aos tubos em volumes crescentes (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mL) em intervalos de 1 minuto entre cada adição.

Após a adição de 4mL solução de descongelamento os tubos foram centrifugados a 350 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de uma lavagem com 10mL RPMI 1640. As células foram então ressuspensas em 2mL de meio RPMI 1640 para verificação de viabilidade celular utilizando corante vital de

Tripan (0,1% em PBS) e determinação do número de esplenócitos recuperados (fórmula abaixo). Após a leitura na câmara de Neubauer, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 na concentração final de 1×10^7 células viáveis/mL.

$$\text{n}^\circ \text{ de esplenócitos por mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em 4 quadrantes} \times \text{diluição} \times 10^4}{4}$$

Todos os ensaios de imunofenotipagem celular dos esplenócitos foram realizados com células congeladas, visto que não observamos nenhuma diferença na imunofenotipagem dessas células quando comparadas com células frescas.

4.9 Imunofenotipagem e Padrão de Citocinas Citoplasmáticas de Esplenócitos Murinos

Após o descongelamento e lavagem, 100 μ L de meio contendo 1×10^6 células foram colocados em poços de placa estéril de 96 poços para realização da imunofenotipagem. A placa foi centrifugada por 5 minutos a 350 X g e, em seguida, as células foram ressuspensas em 50 μ L de tampão de bloqueio – solução de PBS com 0,1% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma) e 5% de leite desnatado (Molico, Nestle) – contendo 10 μ g/mL de anticorpo 2.4G2 (anti-CD16/CD32). Após incubação de 5 minutos à 20°C, foram adicionados 50 μ L de tampão de bloqueio contendo os anticorpos de superfície nas concentrações indicadas na Tabela 4.3. Foi realizada uma incubação de 25 minutos a 4°C e depois duas lavagens com 150 μ L e depois 200 μ L de PBS/ 0,1% de BSA por centrifugação a 350 X g durante 5 minutos a 4°C. Feito isso, as células foram fixadas com 100 μ L de solução fixadora composta por PBS e 4% de paraformaldeído (PFA, Sigma), por 10 minutos a 20°C.

Terminada a fixação, as células foram lavadas novamente com 200 μ L da solução PBS/ 0,1% BSA por poço através de centrifugação a 350 X g durante 5 minutos a 20°C. Mais duas lavagens foram realizadas por centrifugação, desta vez, utilizando 200 μ L por poço de solução tampão PBS/ 0,1% de BSA/ 0,1% de saponina. Para efetuar a marcação intracelular, as células foram ressuspendidas em

tampão de permeabilização/bloqueio (PBS/ 0,1% de BSA/ 0,1% de Saponina-A/ 5% de leite desnatado) e mantidas nesta solução por 1 hora a 4°C. Subsequentemente a permeabilização, os anticorpos para marcação intracelular (Tabela 4.3) foram adicionados aos poços em 20µL de tampão de permeabilização/bloqueio e incubados por 30 minutos a 4°C. Decorrido esse tempo, os poços foram lavados mais 2 vezes por centrifugação (350xg durante 5 minutos a 20°C). Na primeira lavagem foram utilizados 150µL de solução PBS/ 0,1% de BSA/ 0,1% de Saponina-A e, na segunda, 150µL de solução PBS/ 0,1% de BSA sem Saponina. Terminadas as lavagens, as células foram ressuspensas em 200µL de solução PBS/ 0,1% de BSA e transferidas para tubos próprios para leitura em citômetro de fluxo. As leituras foram realizadas em até 24 h após a marcação em um citômetro de fluxo Cyan (Dako) disponibilizado na Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). Os dados obtidos foram analisados no programa *FlowJo* (TreeStar, Estados Unidos) da maneira ilustrada na Figura 4.3.

Tabela 4.3: Relação dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem de esplenócitos murinos.

Monoclonal	Fluorocromo	Fabricante	Extracelular/ Intracelular	Concentração/ Nº de Células
CD4	PE Cy5	e-Bioscience	Extracelular	0,3 µg/10 ⁶ células
CD8	APC Cy7	BD Pharmingen	Extracelular	0,3 µg/10 ⁶ células
CD14	FITC	e-Bioscience	Extracelular	1,0 µg/10 ⁶ células
IFN-γ	PE	BD Pharmingen	Intracelular	0,3 µg/10 ⁶ células
IL-4	PE Cy7	BD Pharmingen	Intracelular	0,5 µg/10 ⁶ células
IL-10	APC	BD Pharmingen	Intracelular	0,3 µg/10 ⁶ células

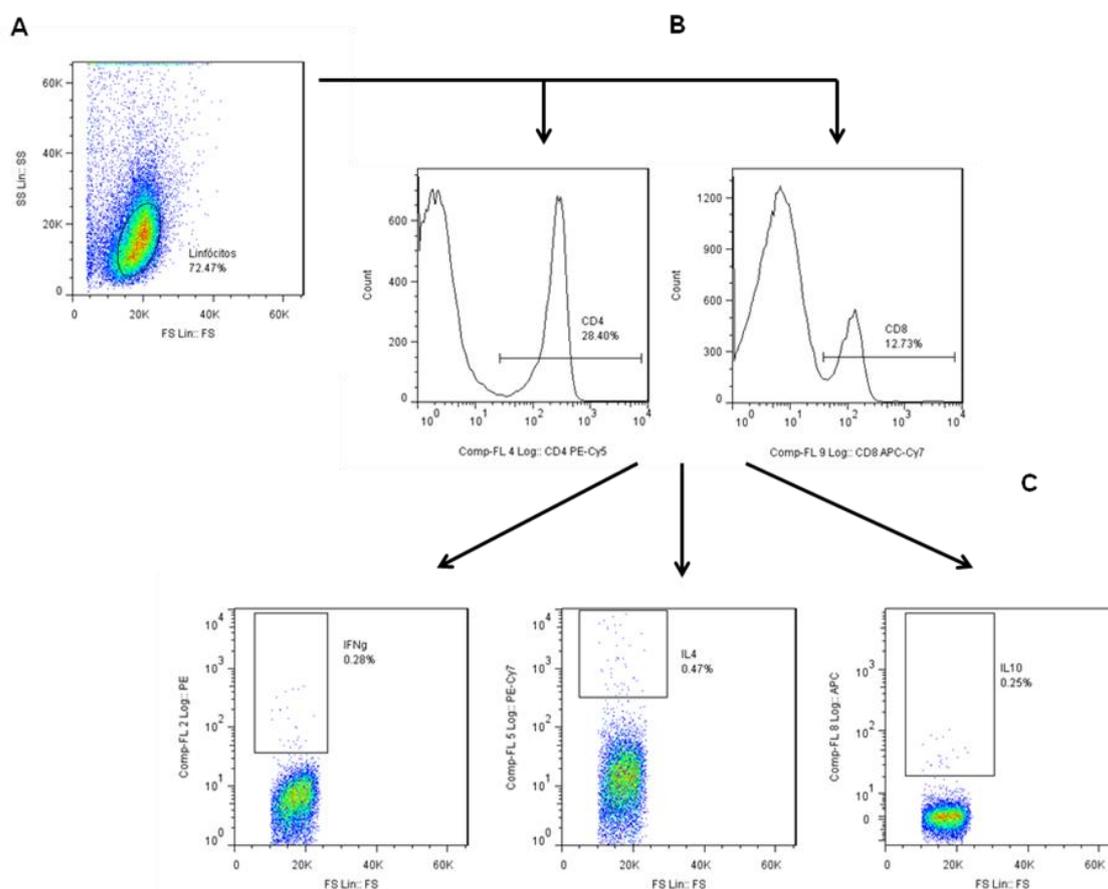


Figura 4.3: Análise dos dados de citometria referentes ao perfil de células CD4⁺, CD8⁺ e produção de citocinas por esplenócitos murinos no programa *FlowJo*. A) Delimitação da região de linfócitos; B) Seleção de células CD4⁺ e CD8⁺; C) Análise da produção de citocinas por células CD4⁺ ou CD8⁺.

4.10 Imunofenotipagem de Células T Reguladoras (Tregs) de Esplenócitos Murinos

Para a imunofenotipagem das células Tregs foi utilizado o kit comercial *Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #3* (e-Bioscience, Estados Unidos) segundo as recomendações do fabricante.

As células descongeladas e com concentração ajustada (10^6 células em 100 μ L) foram colocadas em placas de 96 poços. Após centrifugação a 350 x g por 5 minutos, foram adicionados 100 μ L do bloqueio de permeabilização com 0,5 μ g de bloqueio de fração Fc (anti-CD16/32). As células foram, então, incubadas por 15 minutos a 4°C. Em seguida foram adicionados os anticorpos de marcação de superfície (Tabela 4.4) em um volume final de 100 μ L de tampão de marcação de citometria. Após 30 minutos de incubação a 4°C, foi realizada uma lavagem com o

tampão de citometria de fluxo por centrifugação (350 X g durante 5 minutos a 20°C). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200µL de solução de fixação/permeabilização diluído (conforme orientação do fabricante) e foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro. Após essa incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização através de centrifugação (350xg durante 5 minutos a 20°C) e logo depois foram adicionados os anticorpos para marcação intracelular (Tabela 4.4) em 100µL de tampão de permeabilização 1x. As células foram incubadas por mais 1 hora a 4°C no escuro. Em seguida, foram lavadas duas vezes com 200µL de tampão de permeabilização, novamente por centrifugação (350 X g durante 5 minutos à 20°C). Terminadas as lavagens, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de citometria de fluxo. As leituras foram realizadas em até 24 h após a marcação em um citômetro de fluxo Cyan (Dako) disponibilizado na Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). Os dados obtidos foram avaliados no programa *FlowJo* (TreeStar, Estados Unidos) da maneira indicada na Figura 4.4.

Tabela 4.4: Relação dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem de células Tregs de esplenócitos murinos.

Monoclonal	Fluorocromo	Extracelular/ Intracelular	Volume/Nº de Células
CD4	FITC	Extracelular	0,06 µg/10 ⁶ células
CD25	PE	Extracelular	0,03 µg/10 ⁶ células
Foxp3	PE Cy5	Intracelular	0,25 µg/10 ⁶ células

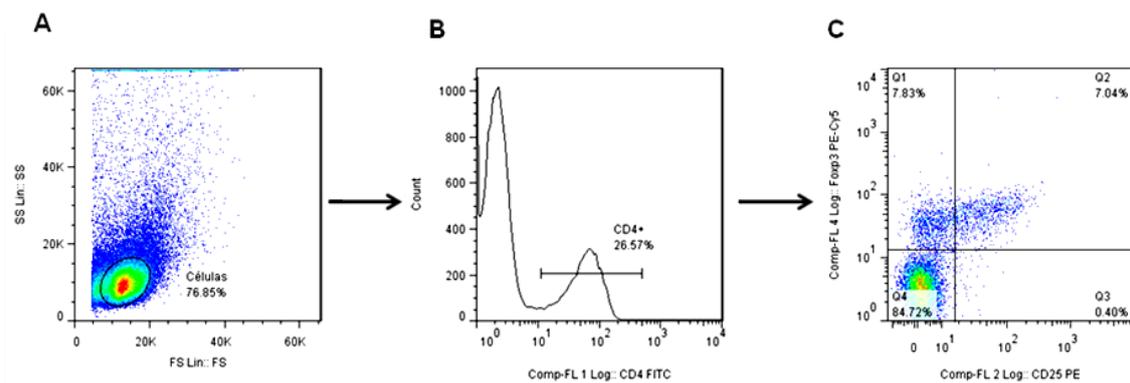


Figura 4.4: Análise dos dados de citometria referentes à imunofenotipagem de células Tregs no programa *FlowJo*. A) Delimitação da região de linfócitos; B) Seleção de células CD4⁺; C) Determinação do percentual de células CD4⁺Foxp3⁺ (Q1), CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ (células Tregs, Q2) e CD4⁺ CD25⁺ (Q3).

4.11 Dosagem de Citocinas no Soro de Camundongos por Citometria de Fluxo

Para avaliação das citocinas presentes no soro dos camundongos, o sangue de 2 animais de cada grupo de estudo foi coletado em tubos de 1,5mL sem anticoagulante nos dias 5, 10, 17, 25 e 77 (11semanas). Decorridos 30 minutos do momento da coleta, o sangue foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos. Em seguida, o soro foi recolhido e congelado à -20°C para posterior utilização.

A dosagem de citocinas no soro foi realizada utilizando o kit comercial *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences) segundo as instruções do fabricante. Os limites de detecção do kit são apresentados na Tabela 4.5. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e os dados obtidos foram analisados no programa *WinMDI* (desenvolvido por Joe Trotter) (Figura 4.5). A partir das intensidades médias de fluorescência de concentrações conhecidas foram construídas curvas-padrões para cada citocina. As concentrações séricas de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 e IL-10 das amostras foram determinadas utilizando a equação da curva padrão e os valores médios de intensidade de fluorescência obtidos.

Tabela 4.5: Limite de detecção do kit comercial *Cytometric Bead Array* (CBA) *Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences).

Citocina	Limite de Detecção (pg/mL)
IFN- γ	0,5
TNF	0,9
IL-2	0,1
IL-4	0,03
IL-6	1,4
IL-17	0,8
IL-10	16,8

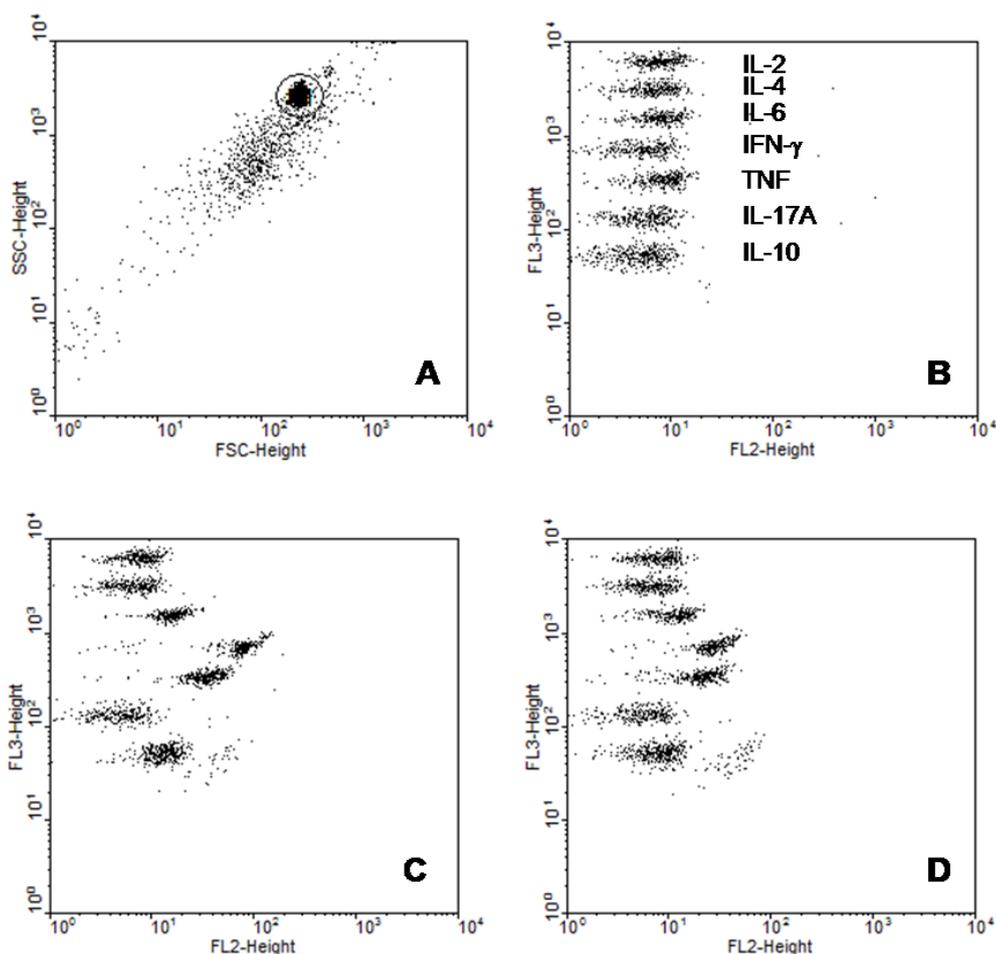


Figura 4.5: Análises dos níveis de citocinas séricas no programa *WinMDI*. A) Determinação da região de *beads*; B) Amostra do grupo controle; C) Amostra do grupo monoinfectado com *P. yoelii*; D) Amostra do grupo monoinfectado com *L. major*.

4.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através de teste T não-pareado no programa *GraphPad Prism* versão 5.0. Para avaliação da curvas de sobrevida foram aplicados os testes de Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon. O teste não paramétrico de Spearman foi utilizado na avaliação das associações entre duas variáveis sendo a correlação calculada pelo coeficiente de Spearman (R^2). Para a análise estatística do dado aparecimento de úlceras na lesão foi utilizado o Teste Exato de Fisher em tabelas de contingência construídas no formato 2X2 para cada semana do experimento. Em todos os casos foram considerados estatisticamente significativos os dados que apresentavam $P < 0,05$.

5.1 Influência da Coinfecção por *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL

5.1.1 Alterações Parasitológicas na Infecção por *P. yoelii* 17XNL

- Parasitemia

A análise da parasitemia realizada pelo monitoramento de distensões sanguíneas demonstrou que a coinfecção não alterou o período pré-patente, período entre o inóculo do *P. yoelii* 17XNL no camundongo e sua detecção nas hemácias. As formas sanguíneas do parasito foram detectadas a partir do terceiro dia após infecção atingindo o pico máximo em torno do dia 13 em ambos os grupos. Entretanto, os animais coinfectados apresentaram parasitemias mais baixas, no dia 3 e entre os dias 11 e 17 de infecção ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente). Além disso, houve redução do período patente nos camundongos coinfectados em relação aos monoinfectados (Figura 5.1).

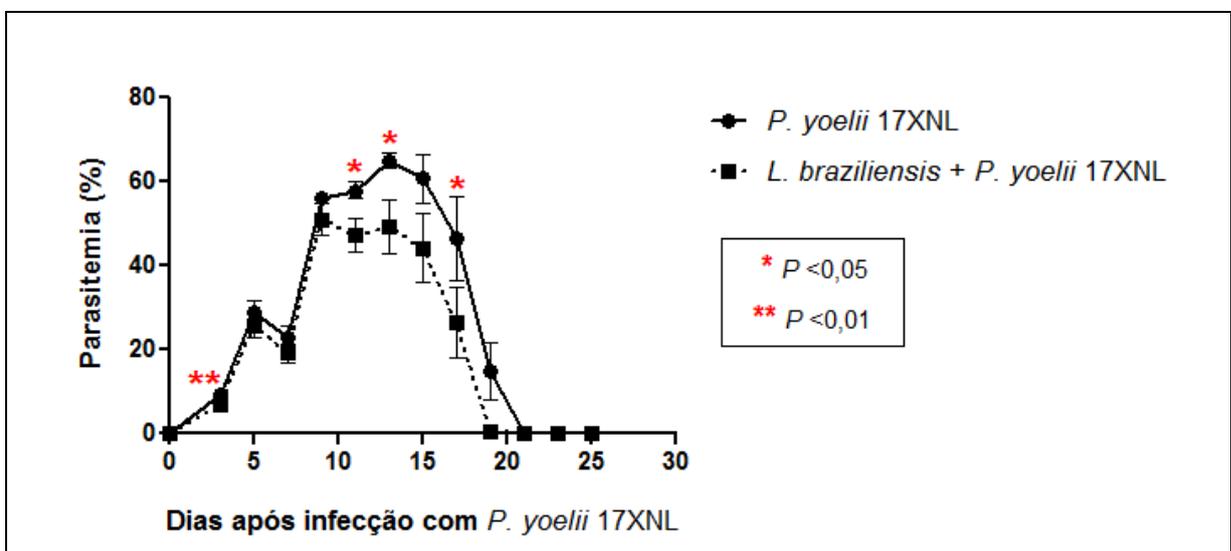


Figura 5.1: Comparação entre as parasitemias dos animais monoinfectados e coinfectados com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL ao longo do tempo. Os asteriscos assinalam os dias em que houve diferença significativa entre os grupos monoinfectado ($n=15$) com *P. yoelii* 17XNL e coinfectado ($n=15$) pelo teste t de Student. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

5.1.2 Alterações Parasitológicas na Infecção por *L. braziliensis*

- **Avaliação do Aparecimento, do Tamanho e da Evolução das Lesões e Úlceras**

No curso da infecção com *L. braziliensis* as lesões começaram a aparecer por volta do 10º dia e apresentaram aumento progressivo ao longo do tempo em que foram acompanhadas. Nos animais coinfectados com *P. yoelii* 17 XNL as lesões apareceram mais tardiamente, por volta dos dias 17 e 25 (Figura 5.11) e apresentaram tamanho menor ao longo do primeiro mês de infecção, principalmente nos dias 17 e 34 em comparação aos mono infectados com *L. braziliensis*. Nas semanas seguintes, o tamanho das lesões se equiparou a dos animais mono infectados com *L. braziliensis*. Em relação às úlceras, não houve diferença entre os grupos dos mono e coinfectados. Em ambos, as lesões começaram a apresentar úlceras entre os dias 41 e 48 de infecção e no dia 77 todas as lesões apresentavam úlceras (Figura 5.2). A Prancha 1 (Anexo 2) ilustra o aspecto das lesões no final do período de estudo.

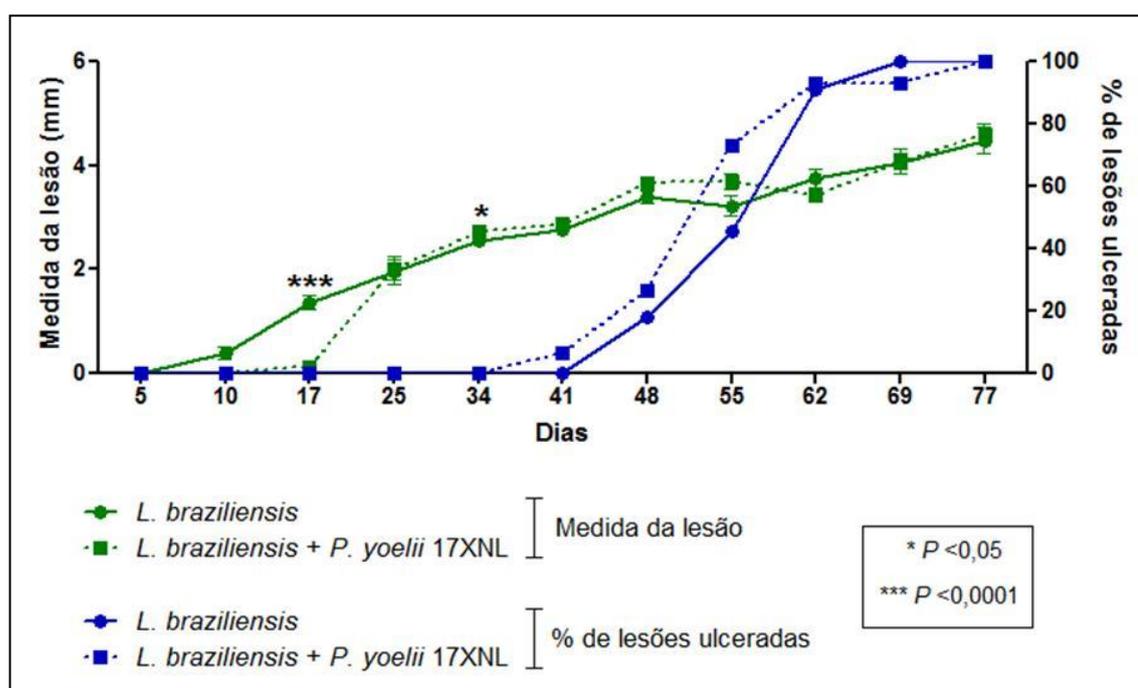


Figura 5.2: Medida de lesão e porcentagem de lesões úlceras ao longo do tempo em animais mono infectados e coinfectados com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL. Os valores da medida da lesão (em verde) estão representados no eixo à esquerda do gráfico e a porcentagem de lesões ulceradas (em azul) à direita. Os asteriscos assinalam os dias em que houve diferença significativa entre os grupos mono infectado (n=15) e coinfectado (n=15) pelo teste *t* de Student. As barras representam as médias ± erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

- **Determinação da Carga Parasitária nas Lesões das Orelhas**

No curso da infecção o número de parasitos encontrados por lesão foi semelhante nos grupos monoinfectados com *L. braziliensis* e coinfectados com *P. yoelii* 17XNL. Nos dois grupos o número de parasitos por lesão também aumentou com o tempo de infecção (Figura 5.3). No grupo monoinfectado com *L. braziliensis*, a carga parasitária das lesões tende a ser mais alta nos dias 10 e 77.

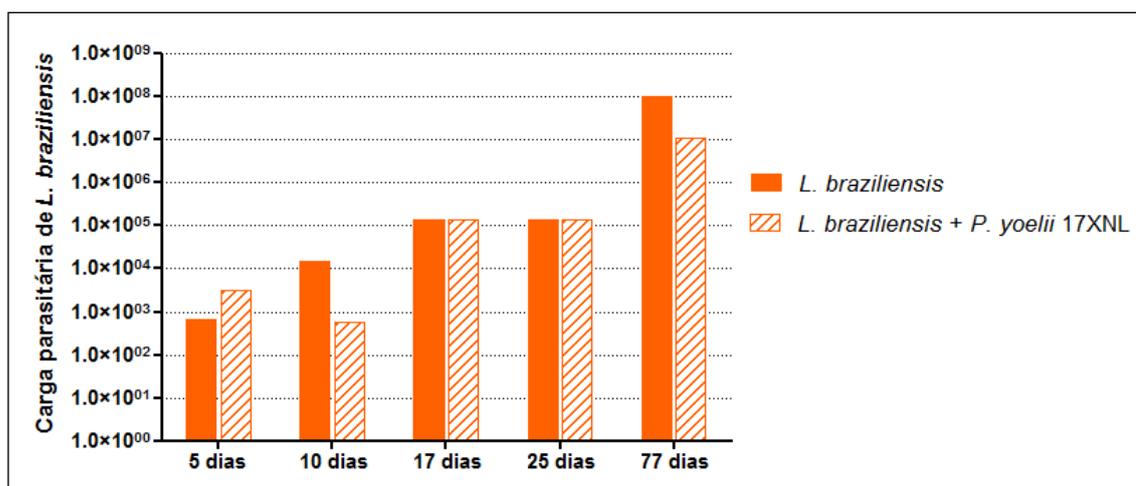


Figura 5.3: Comparação entre a carga parasitária das lesões dos grupos monoinfectado com *L. braziliensis* e coinfectado com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL.

5.1.3 Sinais Clínicos

- **Temperatura**

O monitoramento da temperatura corporal demonstrou que tanto os animais monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL como os coinfectados apresentavam uma queda da temperatura corporal (hipotermia) no curso da infecção malárica quando comparados aos camundongos controles (média= $35,2^\circ\text{C} \pm 0,46$). Entretanto, a hipotermia foi mais acentuada nos camundongos monoinfectados principalmente nos dias 9 e 17 (média= $35,2^\circ\text{C} \pm 0,21$ e $35,3^\circ\text{C} \pm 0,18$; $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente) (Figura 5.4). Além disso, nesses camundongos foi observada uma correlação negativa entre temperatura e parasitemia ($R^2 = -0,6241$, $P = 0,0440$), indicando que valores de parasitemia mais altos estão relacionados com o grau de hipotermia dos animais. Nos animais coinfectados, entretanto, essa correlação não foi significativa. Já os animais monoinfectados com *L. braziliensis* apresentaram

temperaturas similares as dos controles (média= 35,2°C ± 0,58) no decorrer da infecção. A temperatura corporal dos camundongos coinfectados foi, em geral, mais baixa durante a fase aguda da malária quando comparado ao grupo mono infectado com *L. braziliensis*, principalmente no dia 5 (Figura 5.4).

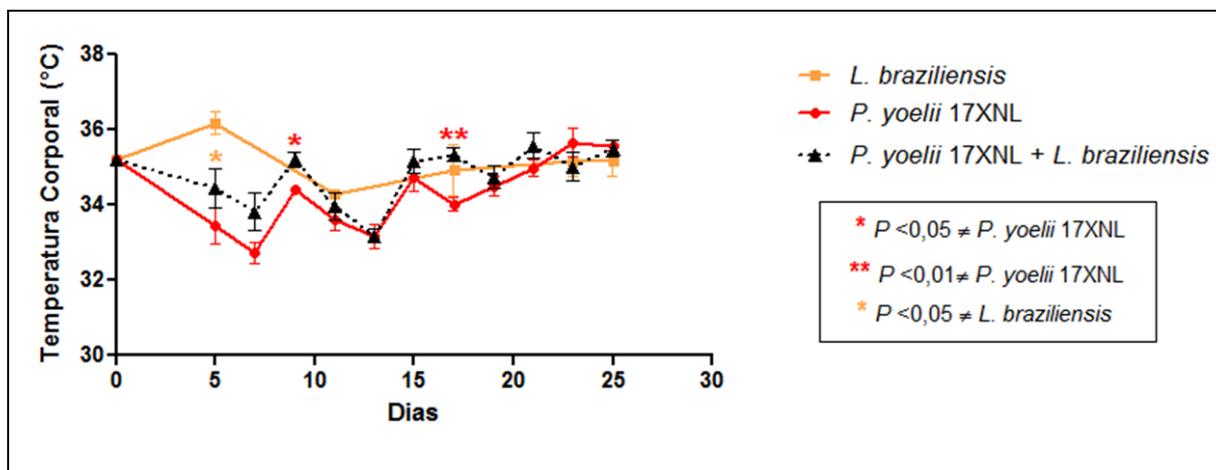


Figura 5.4: Comparação entre as médias de temperatura corporal dos animais mono infectados e coinfectados com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL ao longo do tempo. Os asteriscos assinalam os dias em que houve diferença significativa entre os grupos mono infectado com *P. yoelii* 17XNL (vermelho, n=15) ou *L. braziliensis* (laranja, n=15) e coinfectado pelo teste *t* de Student. As barras representam as médias ± erro padrão da média (EPM).

• Massa Corporal

A variação de massa corporal dos animais mono infectados com *P. yoelii* 17XNL e coinfectados foi comparada com a dos animais controles ao longo do tempo (Figura 5.5). Em ambas as infecções, os animais apresentaram uma acentuada perda de massa corporal, compatíveis com a elevação da parasitemia ($R^2 = -0,7583$, $P = 0,007$ - *P. yoelii* 17XNL e $R^2 = -0,7444$, $P = 0,0009$ - *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis*). Na segunda semana, por volta do dia 10 de infecção malárica, a perda de massa corporal foi mais expressiva tanto no grupo de animais mono infectados (média= 19,27 ± 0,21; $P = 0,0002$) quanto no de coinfectados (média= 20,03 ± 0,73; $P = 0,005$), coincidindo com o pico de parasitemia. No grupo dos animais coinfectados foi observado uma recuperação de massa corporal mais rápida, e já no dia 17 de infecção malárica eles apresentavam massa corporal (23,40 ± 1,63) semelhante ao dos camundongos controles (23,58 ± 1,81) ($P > 0,05$) e

significativamente mais elevada que a dos camundongos mono infectados por *P. yoelii* 17XNL ($20,83 \pm 3,24$) ($P=0,0453$).

Os animais mono infectados com *L. braziliensis* não apresentaram variação significativa de massa corporal quando comparados ao grupo controle. Em relação ao grupo dos co infectados, os animais mono infectados com *L. braziliensis* apresentaram massa corporal inferior, sendo as diferenças significativas nos dias 34, 41, 48, 55, 62, 69 e 77 (Figura 5.5).

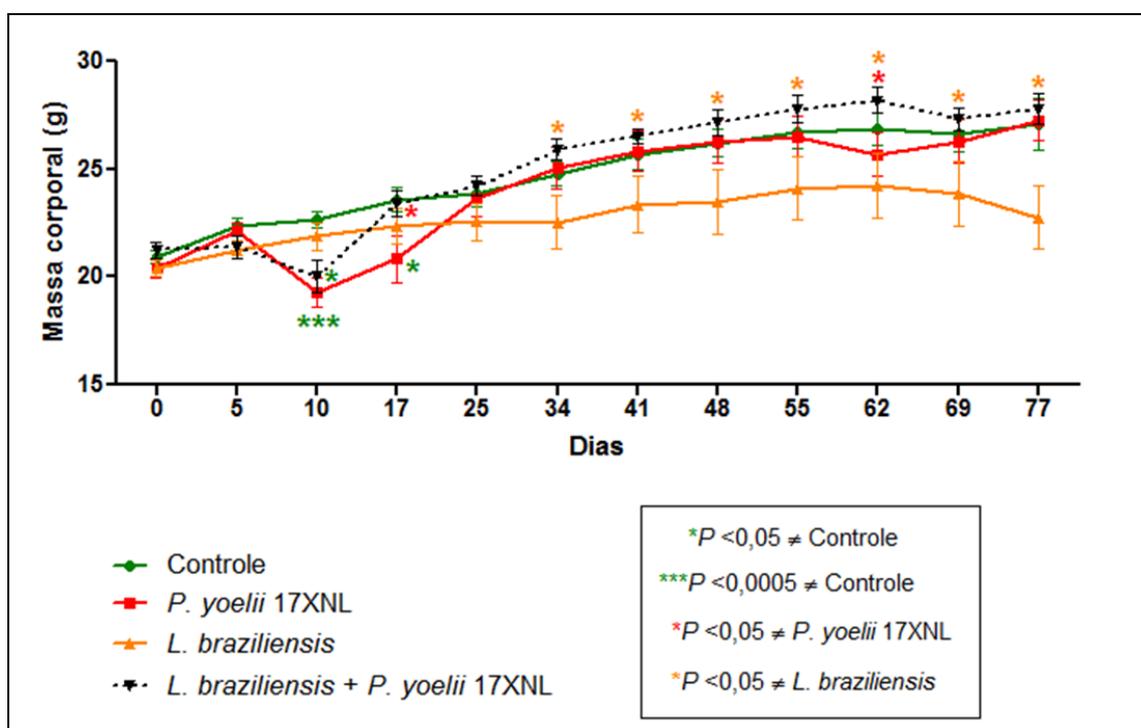


Figura 5.5: Variação de peso em animais co infectados com *L. braziliensis* e *P. yoelii* em comparação com os animais controle e mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis*. Os asteriscos assinalam os dias em que foram encontradas diferenças significativas entre o peso do grupo co infectado ($n=15$) e o grupo controle (verde, $n=10$) ou mono infectado com *P. yoelii* 17XNL (vermelho, $n=15$) ou *L. braziliensis* (laranja, $n=15$). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

- **Mortalidade**

A co infecção por *L. braziliensis* e *P. yoelii* não provocou morte dos animais do estudo assim como a infecção exclusiva por *L. braziliensis* ou *P. yoelii* 17XNL.

Resumo:

Os resultados obtidos sugerem que a coinfeção com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL tem um efeito benéfico* a malária, já que os níveis de parasitemias são mais baixos e o período patente é menor, determinando uma recuperação clínica mais rápida dos animais. Em relação à leishmaniose, pudemos perceber que a coinfeção não confere efeito benéfico**.

*Estabelecemos, para esse trabalho, que a coinfeção com *Leishmania* teria um **efeito benéfico** à malária se fosse observado uma redução de pelo menos dois dos três parâmetros avaliados (níveis de parasitemia, período patente e taxa de sobrevivência).

Estabelecemos, para esse trabalho, que a coinfeção com *P. yoelii* teria um **efeito benéfico na leishmaniose se fosse observado uma redução de pelo menos dois dos três parâmetros parasitológicos ou de evolução da doença avaliados (carga parasitária, tamanho e ulceração das lesões).

5.1.4 Alterações Imunológicas

- **Células CD4⁺**

Na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectados quanto nos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL foi observada uma redução no percentual de células CD4⁺ no baço nos dias 5, 10 e 17. Entretanto, nos animais monoinfectados com *L. braziliensis* não foi observado variação significativa no percentual de células CD4⁺ no decorrer da infecção, indicando que a infecção malárica é responsável por esse decréscimo. Notou-se também, em ambas as infecções, que a redução do percentual de células CD4⁺ está inversamente relacionada com a parasitemia ($R^2 = -0,9747$ e $P = 0,0167$; para ambas). No dia 77, o percentual de células CD4⁺ tende a ser maior no grupo monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL. Nos dias 25 e 77, o percentual dessas células tende a ser maior no grupo coinfectado quando comparados aos grupos controle e monoinfectado com *L. braziliensis* (Figura 5.6).

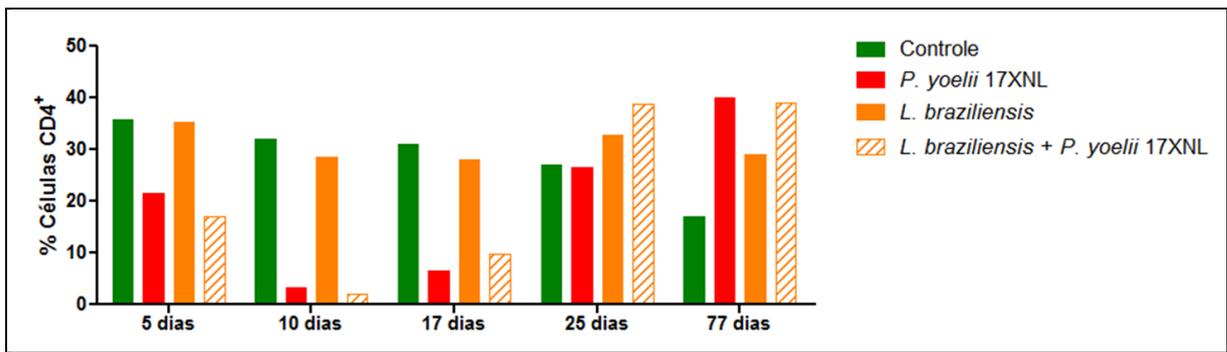


Figura 5.6: Comparação entre o percentual de células CD4⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis* e co infectados com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD4⁺ Produtoras de Citocinas (INF- γ , IL-4 e IL-10)**

Em relação à produção de citocinas pelas células CD4⁺ do baço, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos co infectados quanto nos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento expressivo na maioria dos percentuais de células produtoras de IFN- γ e IL-4 nos dias 5, 10, 17 e 25 em relação ao grupo controle (Figura 5.7A e 5.7B) apesar da diminuição do percentual de células CD4⁺ no baço (Figura 5.6). No grupo co infectado, é observado um percentual de células CD4⁺IL-10⁺ consideravelmente maior do que nos grupos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis* nos dias 5, 10 e 17 (Figura 5.7C). Entretanto, houve um decréscimo nos percentuais de células CD4⁺INF- γ ⁺, CD4⁺IL-4⁺ e CD4⁺IL-10⁺ após a fase aguda da infecção malárica. Foi encontrada correlação positiva entre o percentual de células CD4⁺INF- γ ⁺ e parasitemia nos grupos mono infectado com plasmódio murino e co infectado ($R^2=0,9747$ e $P=0,0167$, nos dois grupos) e entre o percentual de células CD4⁺IL-4⁺ e a parasitemia no grupo co infectado ($R^2=0,9747$ e $P=0,0167$). O percentual de células CD4⁺IL-10⁺ estava substancialmente mais elevado nos baços dos camundongos co infectados quando comparado aos do grupo dos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis* nos dias 5, 10 e 17 (Figura 5.7C). Os animais mono infectados com *L. braziliensis* não apresentaram variação significativa nos percentuais de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-10 no curso da infecção (Figura 5.7A e 5.7B). Já os percentuais de células CD4⁺IL-4⁺ apresentaram discreto aumento no período avaliado (Figura 5.7B).

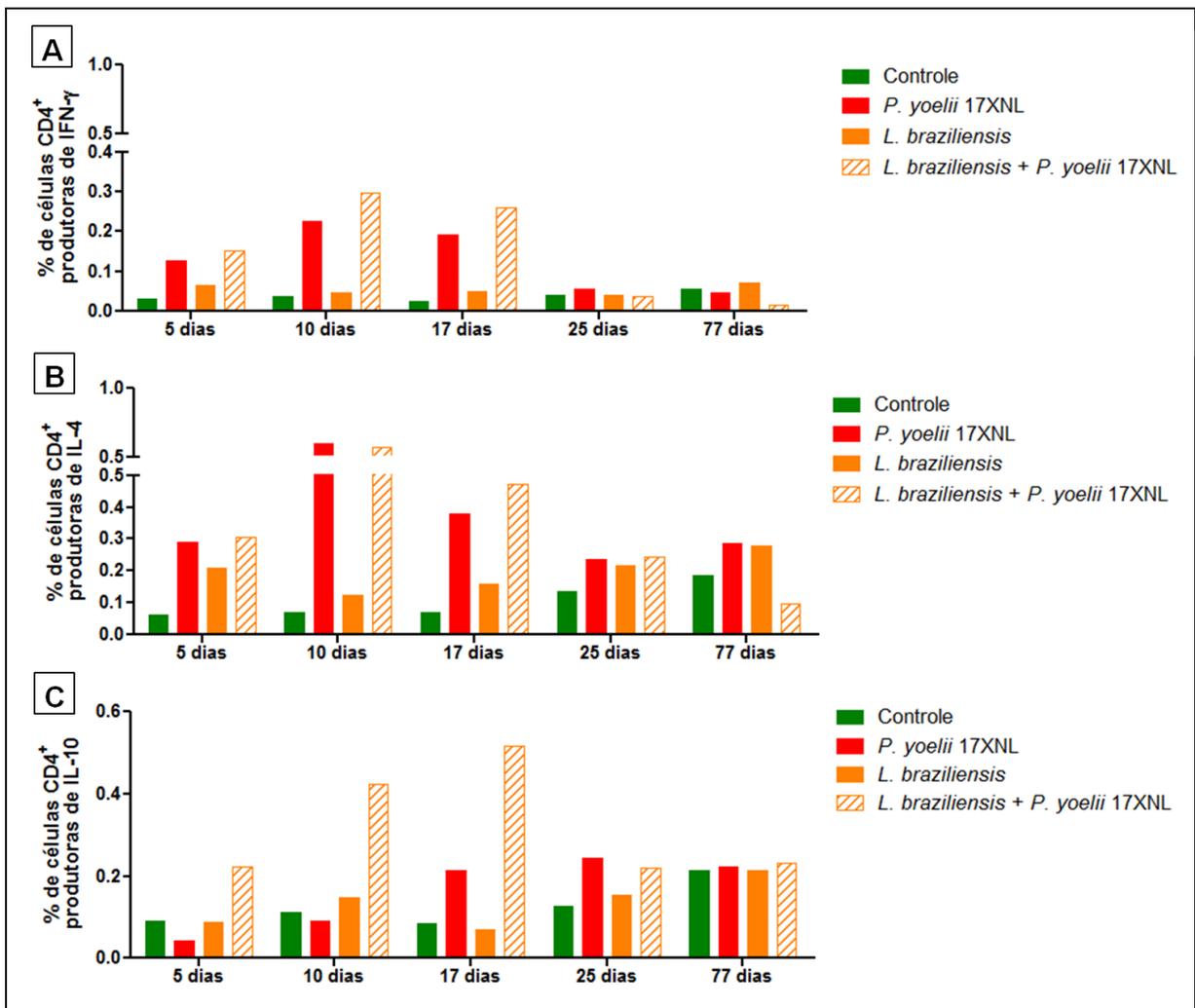


Figura 5.7: Comparação entre o percentual de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis* e co infectado com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD4⁺CD25⁺**

Ao avaliarmos o percentual de células CD4⁺CD25⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto no grupo dos camundongos co infectados quanto no grupo dos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento expressivo nos percentuais dessas células nos dias 5, 10 e 17, em relação ao grupo controle. Esse aumento parece estar associado à infecção malárica, pois o percentual de células CD4⁺CD25⁺ no baço dos camundongos mono infectados com *L. braziliensis* não apresentou variação significativa em relação ao grupo controle, sendo alto apenas no dia 5. No grupo dos co infectados observamos um decréscimo nos percentuais dessas células após o pico de parasitemia (dia 10) enquanto no grupo

dos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL esses percentuais aumentaram até o 17º dia (Figura 5.8). Além disso, foi verificado que o aumento do percentual das células CD4⁺CD25⁺ estava correlacionado positivamente com a parasitemia no grupo co infectado ($R^2= 0,9747$ e $P= 0,0167$).

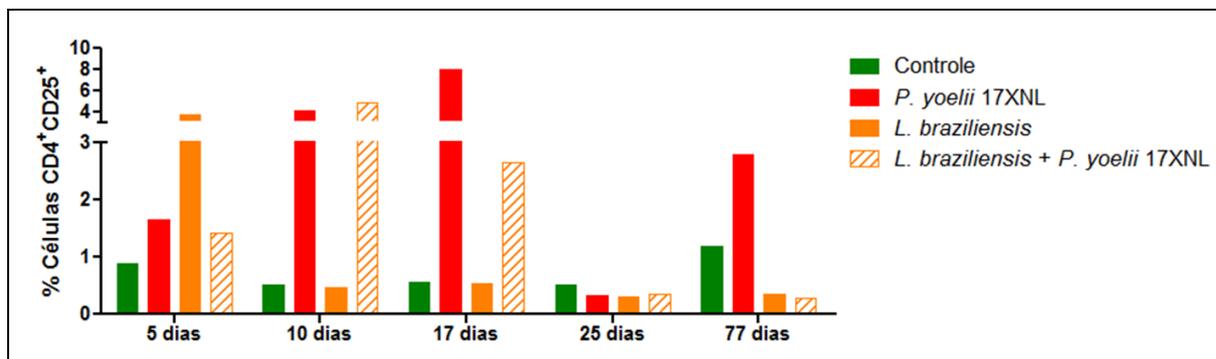


Figura 5.8: Comparação entre o percentual de células CD4⁺CD25⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com *P. yoelii* 17XNL e co infectado com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células T Reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)**

Na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos co infectados quanto nos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL foi observado um aumento no percentual de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no baço nos dias 5, 10 e 17, indicando que a infecção malárica é responsável por esse aumento (Figura 5.9). O percentual dessa população de células declinou quando plasmódios não foram mais detectados na corrente sanguínea, alcançando valores semelhantes aos dos controles, em ambas as infecções. No grupo dos mono infectados com *L. braziliensis* foi observado um aumento percentual dessas células apenas no dia 5 em comparação aos animais controle (Figura 5.9).

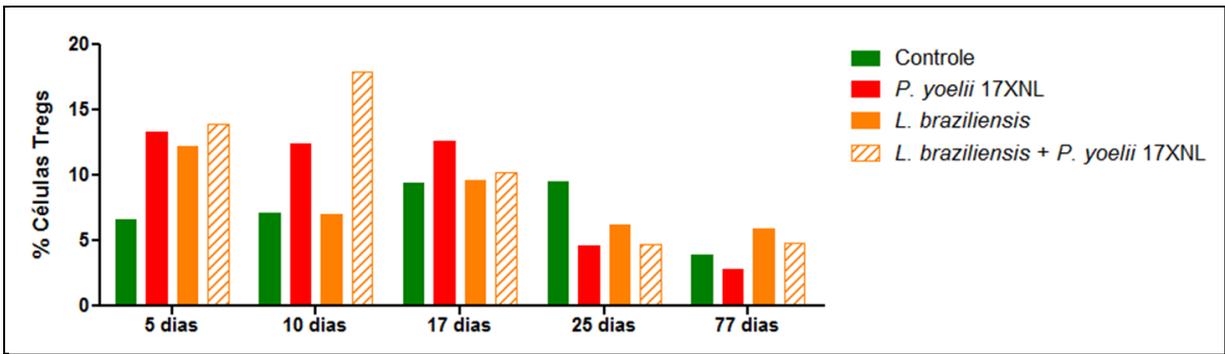


Figura 5.9: Comparação entre o percentual de células Tregs no baço de camundongos do grupo controle, monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis* e coinfectado com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

O percentual de células CD4⁺ diminuiu apenas nos grupos coinfectados e monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL na fase aguda da infecção malárica, indicando que não há interferência da infecção por *L. braziliensis* na frequência dessas células no baço. Apesar disso, o percentual de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-4⁺ nos grupos coinfectados e monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL é maior do que os percentuais dos grupos controle e monoinfectado com *L. braziliensis*. É interessante ressaltar que o aumento de células CD4⁺IL-10⁺ só é observado na coinfecção, isto é, não ocorre aumento na frequência dessas células nem na infecção exclusiva por *P. yoelii* 17XNL e nem na infecção apenas com *L. braziliensis*.

Em relação às células CD4⁺CD25⁺, foi observado que o percentual dessas células durante a infecção malárica nos grupos monoinfectados com plasmódio e coinfectados é maior do que os percentuais do grupo controle. Contudo, nos animais coinfectados a diminuição da frequência de células CD4⁺CD25⁺ foi mais precoce.

Também foi observado um incremento percentual de células Tregs nos grupos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL e coinfectados, indicando que a infecção pelo plasmódio contribui para o aumento da frequência dessas células no baço em ambos os casos. Há um aumento inicial no percentual dessas células no grupo monoinfectado com *L. braziliensis*.

- **Células CD8⁺**

Ao avaliarmos o percentual de células CD8⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto os camundongos coinfectedos quanto os mono infectados com *P. yoelii* 17XNL apresentaram uma redução no percentual dessas células no baço, principalmente nos dias 10 e 17, em relação ao grupo controle. Não foi encontrada correlação entre parasitemia e percentual de células CD8⁺ em ambos os grupos. Os animais mono infectados com *L. braziliensis* não apresentaram variação significativa nos percentuais dessas células no curso da infecção. Na décima primeira semana (77 dias) o percentual de células CD8⁺ nos camundongos coinfectedos apresentava-se discretamente mais elevado do que nos grupos controle e mono infectados (Figura 5.10).

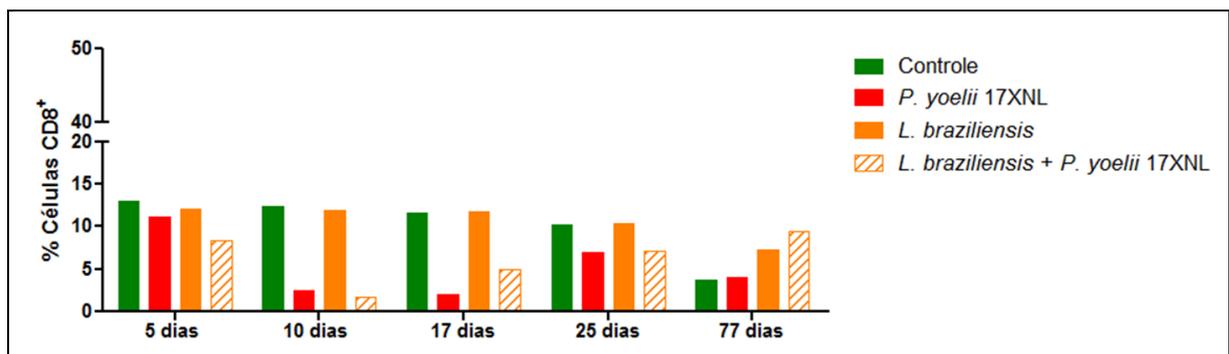


Figura 5.10: Comparação entre o percentual de células CD8⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis* e coinfectedo com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD8⁺ Produtoras de Citocinas**

Em relação à produção de citocinas pelas células CD8⁺ do baço observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectedos quanto nos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento expressivo nos percentuais de células produtoras de IFN- γ e IL-4 nos dias 5, 10 e 17, em relação ao grupo controle (Figura 5.11A e 5.11B), apesar do decréscimo do percentual das células CD8⁺ no baço (Figura 5.10). Os animais mono infectados com *L. braziliensis* não apresentaram grandes variações nos percentuais de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ , IL-4 ou IL-10 no curso da infecção.

A cinética do percentual de células CD8⁺ produtoras das diferentes citocinas variou no decorrer da infecção malárica. Foi observado um aumento substancial do percentual de células CD8⁺IFN γ ⁺ no início da fase aguda (5^o dia), tanto na monoinfecção com o plasmódio quanto na coinfeção, seguido de um decréscimo do percentual dessas células. Entretanto, nos dias 10 e 17 o percentual de células CD8⁺IFN γ ⁺ apresentava-se mais elevado no grupo dos coinfectados em comparação ao grupo dos monoinfectados (Figura 5.11A). Já o percentual de células CD8⁺IL-4⁺ apresentava-se mais elevado no grupo dos camundongos coinfectados quando comparado com os monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL, nos dias 5, 10 e 17 (Figura 5.11B). Além disso, o percentual dessas células estava positivamente correlacionado com a parasitemia somente no grupo dos coinfectados ($R^2= 0,9747$; $P = 0,016$). Em relação ao percentual das células CD8⁺IL-10⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica, somente no grupo dos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento transitório dessas células, no dia 10 (Figura 5.11C). Entre os grupos dos mono e coinfectados, observamos que no dia 10 o percentual das células CD8⁺IL-10⁺ estava mais elevado no grupo dos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL e no dia 77 esse percentual estava substancialmente aumentado apenas no grupo dos coinfectados (Figura 5.11C).

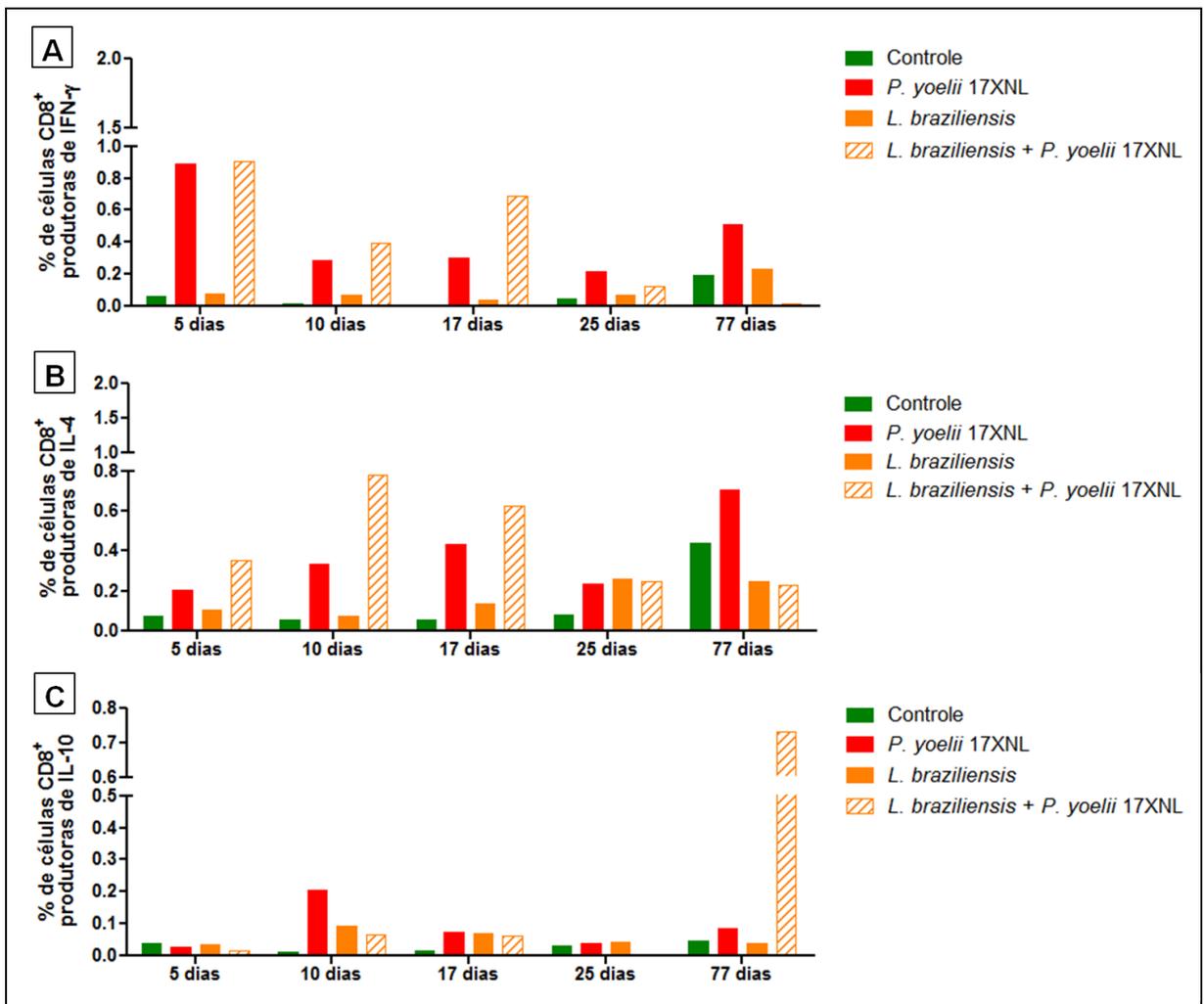


Figura 5.11: Comparação entre o percentual de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis* e coinfestado com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

O percentual de células CD8⁺ é menor nos grupos coinfestado e monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL na fase aguda da infecção malárica, sugerindo que não há interferência da infecção por *L. braziliensis* na frequência dessas células no baço. O percentual de células produtoras de IFN- γ e IL-4, entretanto, aumenta nesse período e é maior no grupo coinfestado em relação ao controle e aos grupos monoinfectados com *L. braziliensis* ou com *P. yoelii* 17XNL. O aumento percentual de células CD8⁺IL-10⁺ foi transitório no grupo monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL durante a infecção malárica enquanto no grupo coinfestado foi observado um aumento expressivo no percentual dessas células no dia 77.

Resumo (continuação):

É interessante ressaltar que o aumento de células CD8⁺IL-10⁺ no dia 77 só é observado no grupo coinfectado, isto é, não ocorre aumento na frequência dessas células nem na infecção exclusiva por *P. yoelii* 17XNL e nem na infecção apenas com *L. braziliensis*.

- **Células CD14⁺IL-10⁺**

A avaliação de células CD14⁺IL-10⁺ no baço de camundongos demonstrou que os animais monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL não apresentaram variação significativa no percentual dessas células no curso da infecção. Os animais monoinfectados com *L. braziliensis* apresentaram um pequeno aumento percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no baço no dia 77. Já os coinfectados apresentaram um aumento substancial no percentual dessas células nos dias 25 e 77, quando não são mais detectadas formas sanguíneas de *P. yoelii* 17XNL (Figura 5.12). Esse aumento foi mais importante no dia 77 sugerindo que a coinfecção influencie na frequência dessas células no baço mais tardiamente.

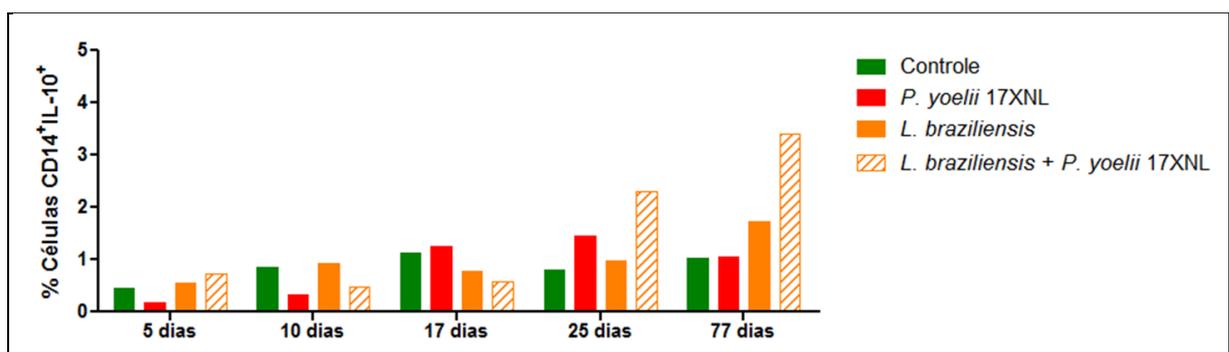


Figura 5.12: Comparação entre o percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no baço de camundongos do grupo controle, monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. braziliensis* e coinfectado com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

Em relação às células CD14⁺IL-10⁺, foi observado um aumento percentual importante quando não eram mais detectadas formas sanguíneas do plasmódio no grupo coinfestado (dias 25 e 77). No grupo monoinfestado com *L. braziliensis* houve um aumento discreto no percentual dessas células em relação ao controle apenas no dia 77. Juntos, esses resultados sugerem que a coinfeção influencie na frequência de células CD14⁺IL-10⁺ no baço, elevando o percentual dessas células mais tardiamente.

- **Citocinas**

A quantificação de citocinas séricas demonstrou aumento dos níveis de citocinas dos tipos Th1 (IFN- γ e TNF), Th2 (IL-6) e reguladora (IL-10) na fase aguda da infecção (dias 5, 10 e 17) tanto no grupo dos camundongos monoinfestados com *P. yoelii* 17XNL quanto no grupo dos coinfestados, quando comparados aos controles (Tabela 5.1). Entretanto, no grupo dos coinfestados os níveis séricos dessas citocinas eram mais baixos comparados aos dos monoinfestados com plasmódio (Tabela 5.1). Em ambos os grupos, coinfestados e monoinfestados com plasmódio, foi observado um aumento substancial dos níveis de IFN- γ no início da fase aguda (5º dia) seguido de um decréscimo desses níveis. O aumento dos níveis séricos de IL-4 só foi detectado no dia 77. Já a concentração de IL-17 foi maior próximo ao pico de parasitemia e após a cura da infecção (no dia 77) tanto no grupo dos monoinfestados com *P. yoelii* 17XNL quanto no grupo dos coinfestados, quando comparados ao controle. Cabe lembrar que a negatificação da parasitemia ocorreu entre o 18º e o 22º dia de infecção. Entretanto, no dia 10 a concentração de IL-17 estava menor no grupo dos coinfestados quando comparado ao grupo dos infectados só com *P. yoelii* 17XNL. Não foram observadas diferenças consideráveis entre os grupos controle e monoinfestado com *L. braziliensis*.

A Tabela 5.1 resume as alterações nos níveis séricos das citocinas Th1, Th2, Th17 e reguladora nos grupos monoinfestados em relação ao grupo controle e entre o grupo coinfestado e os grupos controle e monoinfestados. As concentrações

séricas das citocinas de cada grupo nos diferentes dias avaliados são apresentadas no Anexo 3.

Tabela 5.1: Alterações nos níveis séricos de citocinas observadas nos animais monoinfectados (em comparação com o grupo controle) e coinfectados (em comparação com os grupos controle e monoinfectados).

Citocinas	<i>P. yoelii</i> VS Controle					<i>L. braziliensis</i> VS Controle					<i>L. braziliensis + P. yoelii</i> VS Controle					<i>L. braziliensis + P. yoelii</i> VS <i>P. yoelii</i>					<i>L. braziliensis + P. yoelii</i> VS <i>L. braziliensis</i>						
	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77		
Th1	IFN- γ	30,82 x	2,79 x	2,18 x		2,94 x						14,78 x	3,06 x				4,63 x	2,08 x					14,78 x	4,16 x	2,08 x	2,67 x	3,77 x
	TNF	7,72 x	3,41 x	4,90 x								3,75 x		3,01 x				2,06 x					4,71 x		3,11 x		
	IL-2																										
Th2	IL-4					2,34 x																				2,25 x	3,62 x
	IL-6	5,51 x	2,91 x	8,07 x	2,29 x	10,19 x						2,35 x	3,53 x	2,18 x			13,39 x	2,35 x		3,71 x			2,59 x	3,77 x	2,18 x	2,36 x	8,28 x
Th17	IL-17		2,28 x	3,97 x		4,24 x								2,61 x	2,79 x	7,97 x		2,05 x					3,52 x	3,49 x	2,96 x		3,83 x
Reg	IL-10	3,73 x	2,9 x	3,41 x	2,1 x							3,31 x	2,95 x	2,58 x		2,42 x									2,61 x	3,88 x	5,67 x

Inalterado	Maior	Menor
------------	-------	-------

*Na tabela foram assinaladas as diferenças iguais ou superiores a 2x a concentração de citocina encontrada.

Resumo:

Durante a fase aguda da malária foi observado um aumento nos níveis séricos de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF), Th2 (IL-6) e reguladora (IL-10) indicando que os dois tipos de respostas são induzidas e reguladas na infecção por *P. yoelii* 17XNL. No grupo coinfestado, no entanto, os níveis de IFN- γ , TNF e IL-6 no início da infecção foram mais baixos do que no grupo monoinfectado por *P. yoelii* 17XNL sugerindo que a infecção por *L. braziliensis* contribui tanto para a redução dos níveis de parasitemia quanto dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Também foi observado um aumento de IL-17, uma citocina da resposta Th17 que está relacionada com a migração de neutrófilos, durante a infecção malárica nos grupos mono e coinfestados. Contudo, novamente no grupo coinfestado o nível dessa citocina é mais baixo do que no monoinfectado por *P. yoelii* 17XNL.

A elevação da concentração sérica de IFN- γ ocorre no momento em que também é observado aumento no percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ , ou seja, durante a fase aguda da infecção malárica. Nesse período, as manifestações clínicas da malária murina (emagrecimento e hipotermia) são evidenciadas nos dois grupos, porém com menos intensidade no grupo coinfestado.

O aumento de IL-10 no soro concorda com o aumento percentual de células CD4⁺IL-10⁺ nos grupos mono e coinfestado que ocorre durante a infecção malárica. Já o aumento do nível sérico de IL-10 observado no dia 77 apenas no grupo coinfestado, pode estar relacionado ao aumento percentual de células CD8⁺IL-10⁺ e CD14⁺IL-10⁺ que são encontradas nesse grupo, provavelmente por influencia da infecção coinfecção.

Não foram observadas alterações nos níveis séricos de citocinas nos animais monoinfectados com *L. braziliensis* em relação ao controle.

5.2 Influência da Coinfecção por *L. major* e *P. yoelii* 17XNL

5.2.1 Alterações Parasitológicas na Infecção por *P. yoelii* 17XNL

- Parasitemia

A análise da parasitemia realizada pelo monitoramento de distensões sanguíneas demonstrou que a coinfecção não alterou o período pré-patente. As formas sanguíneas do parasito foram detectadas a partir do terceiro dia após infecção atingindo o pico máximo no dia 11 no grupo coinfectado e no dia 13 no mono infectado. Os animais coinfectados apresentaram parasitemia mais baixa no dia 13 de infecção ($P=0,0127$) (Fig. 5.13).

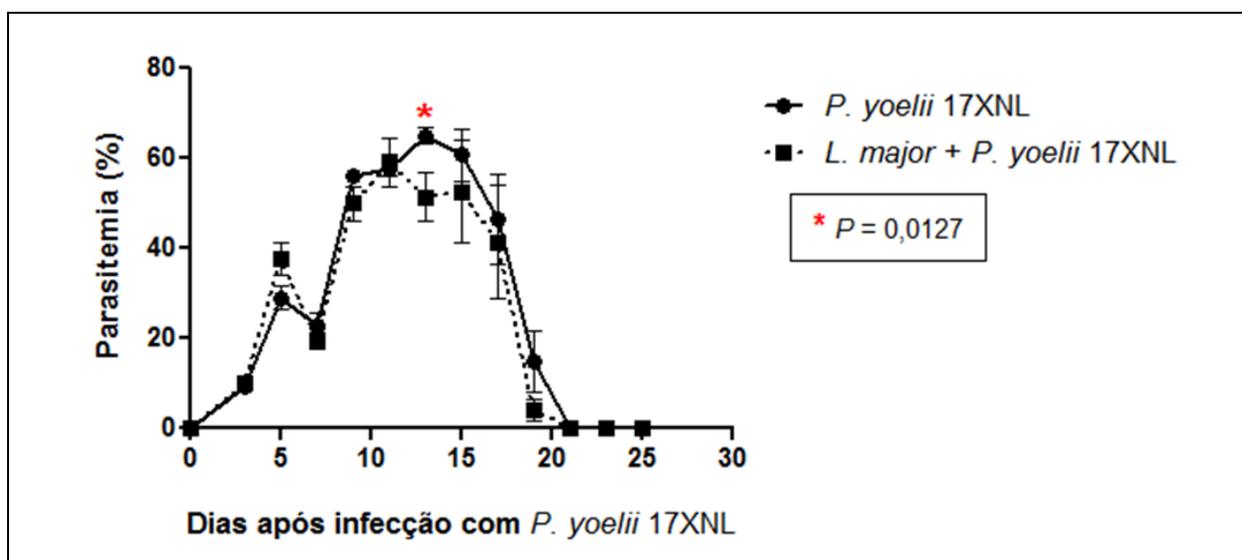


Figura 5.13: Comparação entre as parasitemias dos animais mono infectados e coinfectados com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL ao longo do tempo. O asterisco assinala o dia em que houve diferença significativa entre os grupos mono infectado com *P. yoelii* 17XNL (n=15) e coinfectado (n=15) pelo teste *t* de Student. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

5.2.2 Alterações Parasitológicas na Infecção por *L. major*

- Avaliação do Aparecimento, do Tamanho e da Evolução das Lesões e Úlceras

No curso da infecção com *L. major* as lesões começaram a aparecer por volta do 17º dia e apresentaram aumento progressivo ao longo do tempo em que foram

acompanhadas. Nos animais coinfectedos as lesões apareceram mais tardiamente, entre os dias 25 e 34 (Figura 5.14) e apresentaram tamanho médio significativamente menor do que as lesões dos animais mono infectados com *L. major* (dia 25, $P= 0,0173$). Além disso, as lesões dos animais coinfectedos ulceraram mais tardiamente do que as lesões dos animais mono infectados, com 69 e 49 dias, respectivamente (Figura 5.14). No final do experimento, essa diferença no tempo de aparecimento das úlceras pôde ser evidenciada pela proporção de lesões com úlceras de cada grupo: 50% nos camundongos coinfectedos e 100% nos camundongos infectados apenas com *L. major*. A diferença entre a proporção de úlceras encontradas nesses dois grupos foi significativa no Teste Exato de Fisher nos dias 62 e 69 ($P= 0,0147$ e $P= 0,0194$) (Figura 5.14). A Prancha 2 (Anexo 2) ilustra o aspecto das lesões no final do período de estudo.

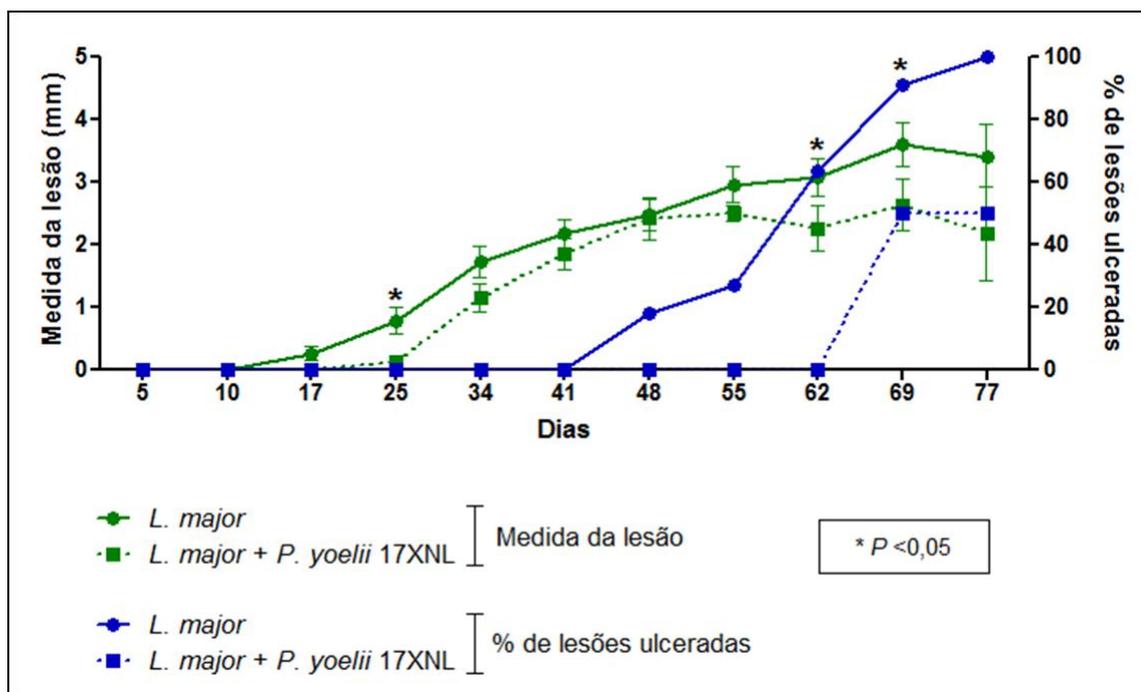


Figura 5.14: Medida de lesão e porcentagem de lesões úlceras ao longo do tempo em animais mono infectados e coinfectedos com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL. Os valores da medida da lesão (em verde) estão representados no eixo à esquerda do gráfico e a porcentagem de lesões ulceradas (em azul) à direita. Os asteriscos assinalam os dias em que houve diferença significativa entre os grupos mono infectado ($n=15$) e coinfectedo ($n=15$) pelo teste t de Student. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

- **Determinação da Carga Parasitária**

No curso da infecção o número de parasitos encontrados por lesão foi semelhante nos grupos infectados com *L. major* e coinfectados. Nos dois grupos o número de parasitos por lesão tendeu a aumentar com o tempo de infecção (Figura 5.15). No grupo monoinfectado, a carga parasitária das lesões tende a ser mais alta no dia 17.

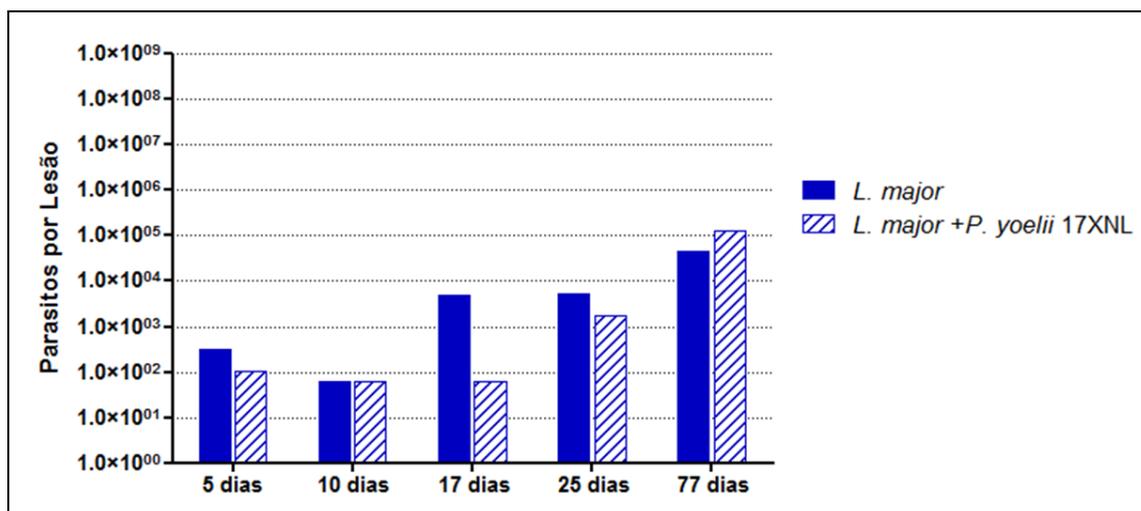


Figura 5.15: Comparação entre a carga parasitária das lesões dos grupos monoinfectado com *L. major* e coinfectado com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL.

5.2.3 Sinais Clínicos

- **Temperatura**

O monitoramento da temperatura corporal demonstrou que tanto os animais monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL como os coinfectados apresentavam uma queda da temperatura corporal (hipotermia) no curso da infecção malárica quando comparados aos camundongos controles (média= 35,2°C ± 0,46). No dia 13 de infecção, quando a parasitemia do grupo coinfectado é significativamente menor do que a do monoinfectado com plasmódio (Figura 5.16), observa-se aumento da temperatura corporal (média= 34,96°C ± 0,51) em comparação ao grupo monoinfectado (média= 33,16°C ± 0,31) ($P= 0,0161$) (Figura 5.16). Além disso, uma correlação negativa entre temperatura e parasitemia foi observada tanto no grupo dos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL ($R^2= -0,6241$, $P= 0,0440$) quanto no dos coinfectados ($R^2= -0,6422$, $P= 0,0368$), indicando que valores de parasitemia mais

altos estão relacionados com o grau de hipotermia dos animais. Já os animais monoinfectados com *L. major* apresentaram temperaturas similares as dos controles (média= 35,2°C ± 0,58) no decorrer da infecção. A temperatura corporal dos camundongos coinfectados foi mais baixa durante a fase aguda da malária quando comparados aos infectados apenas com *L. major*, principalmente nos dias 5 e 17 ($P \leq 0,0001$ para ambos) (Figura 5.16).

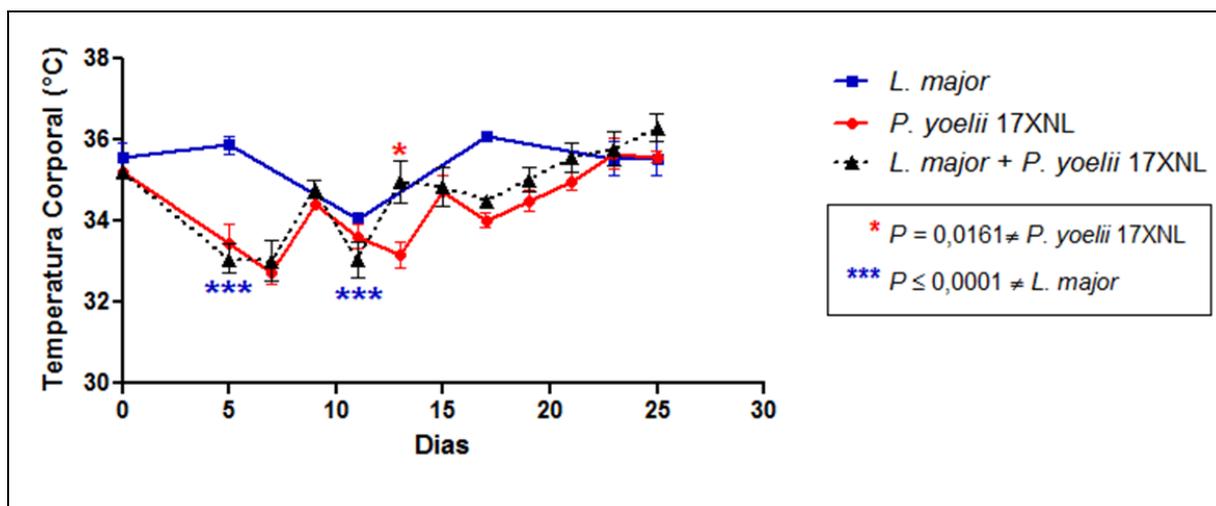


Figura 5.16: Comparação entre as médias de temperatura corporal dos animais monoinfectados e coinfectados com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL ao longo do tempo. O asterisco assinala o dia em que houve diferença significativa entre os grupos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL (vermelho) ou *L. major* (azul) e coinfectado pelo teste *t* de Student. As barras representam as médias ± erro padrão da média (EPM).

- **Massa Corporal**

A variação de massa corporal dos animais monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL e coinfectados foi comparada com a dos animais controles ao longo do tempo (Figura 5.17). Em ambas as infecções, os animais apresentaram uma acentuada perda de massa corporal, compatível com a elevação da parasitemia ($R^2 = -0,7583$, $P = 0,0007$ - *P. yoelii* 17XNL e $R^2 = -0,5056$ e $P = 0,0457$ - *P. yoelii* 17XNL e *L. major*). Por volta do 10º dia da infecção malárica a perda de massa corporal foi expressiva tanto no grupo de animais monoinfectados (média=19,27 ± 0,65; $P = 0,0002$) quanto nos coinfectados (média=19,98 ± 0,81; $P = 0,0041$), coincidindo com o pico de parasitemia.

Os animais monoinfectados com *L. major* apresentaram variação significativa de massa corporal quando comparados ao grupo controle ($P = 0,0024$),

principalmente nos dias 10, 17, 34, 41, 48, 55, 62 e 69. Em relação ao grupo dos coinfectados, os camundongos monoinfectados com *L. major* apresentaram massa corporal inferior a partir do dia 25, sendo as diferenças significativas nos dias 25, 34, 41, 48 e 55 ($P < 0,05$, para todos) (Figura 5.17).

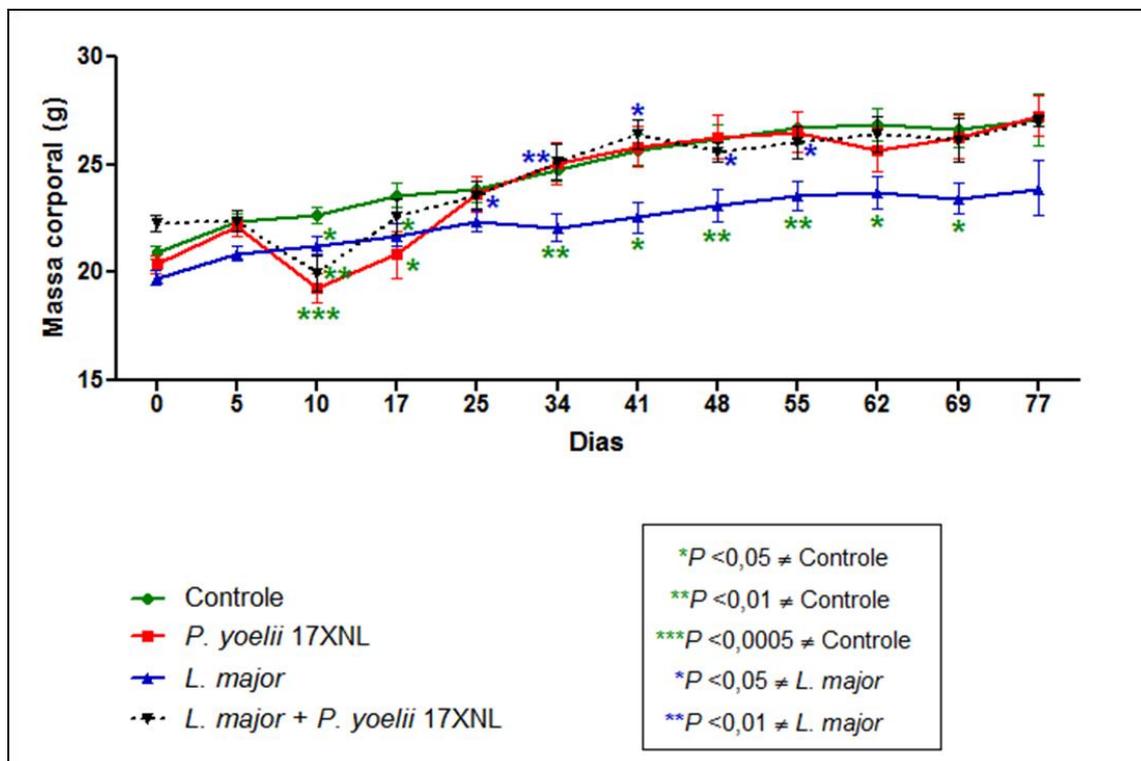


Figura 5.17: Variação de peso em animais coinfectados com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL em comparação aos animais controle e monoinfectados com *L. major* ou *P. yoelii* 17XNL. Os asteriscos assinalam os dias em que foram encontradas diferenças significativas entre o peso do grupo coinfectado ($n=15$) e o grupo controle (verde, $n=10$) ou monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL (vermelho, $n=15$) ou *L. major* (azul, $n=15$). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

- **Mortalidade**

A mortalidade, expressa como percentagem de sobrevivência, apresentou perfil diferente entre a monoinfecção com *P. yoelii* 17XNL e a coinfecção ($P= 0,0408$ e $P= 0,0412$, de acordo com os testes utilizados). Também houve diferença significativa entre a porcentagem de sobrevivência do grupo monoinfectado com *L. major* e do grupo coinfectado ($P= 0,0491$ e $P= 0,497$, de acordo com os testes utilizados). Em resumo, no grupo coinfectado com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL 28,6% dos animais morreram entre os dias 7 e 9 de infecção (Figura 5.18).

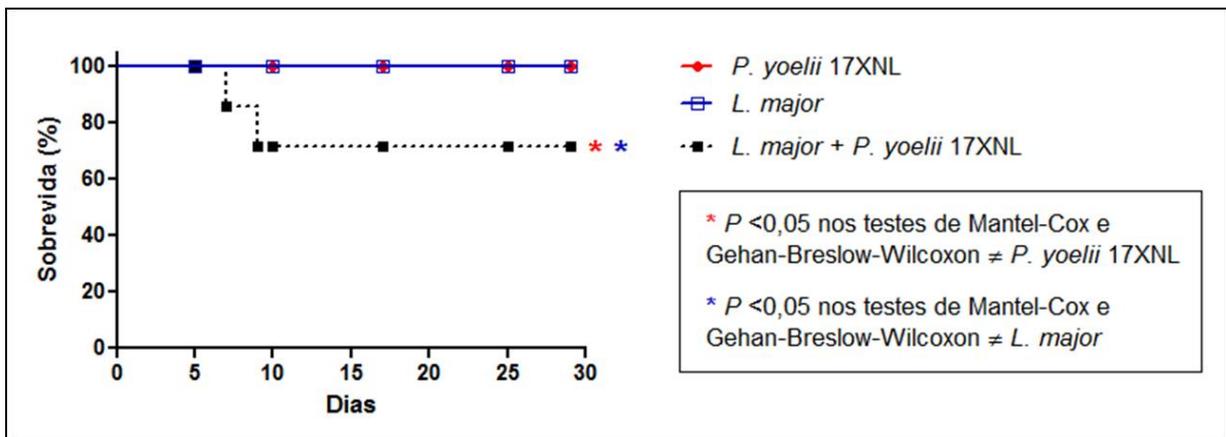


Figura 5.18: Curva de sobrevivência de camundongos coinfetados com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL em comparação com a curva de camundongos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major*.

Resumo:

Nossos resultados sugerem que a coinfecção por *L. major* e *P. yoelii* 17XNL não tem efeito benéfico* a malária e nem contribui na recuperação clínica mais rápida desses animais como foi observado na coinfecção por *L. braziliensis*. Ao contrário, a taxa de mortalidade é maior do que no grupo mono infectado com plasmódio, sugerindo que a infecção por *L. major* possa estar agravando a malária na fase inicial da doença.

Em relação à leishmaniose, pudemos perceber que a coinfecção tem efeito benéfico**, já que dois dos três parâmetros parasitológicos avaliados apresentavam-se reduzidos (tamanho e ulceração das lesões).

* Estabelecemos, para esse trabalho, que a coinfecção com *Leishmania* teria um **efeito benéfico** à malária se fosse observado uma redução de pelo menos dois dos três parâmetros avaliados (níveis de parasitemia, período patente e taxa de sobrevivência).

Estabelecemos, para esse trabalho, que a coinfecção com *P. yoelii* teria um **efeito benéfico na leishmaniose se fosse observado uma redução de pelo menos dois dos três parâmetros parasitológicos ou de evolução da doença avaliados (carga parasitária, tamanho e ulceração das lesões).

5.2.4 Alterações Imunológicas

- **Células CD4⁺**

Na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectedos quanto nos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL foi observada uma redução no percentual de células CD4⁺ no baço nos dias 10 e 17. Entretanto, nos animais monoinfectados com *L. major* não foi observado variação significativa no percentual de células CD4⁺ no decorrer da infecção, indicando que a infecção malárica é responsável por esse decréscimo. Notou-se também que a redução do percentual de células CD4⁺ está inversamente relacionada com a parasitemia ($R^2 = -0,9747$ e $P = 0,0167$) apenas no grupo monoinfectado com plasmódio. No dia 77, o percentual de células CD4⁺ tende a ser maior nos grupos dos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL e coinfectedos do que o percentual dos grupos controle e monoinfectado com *L. major* (Figura 5.19).

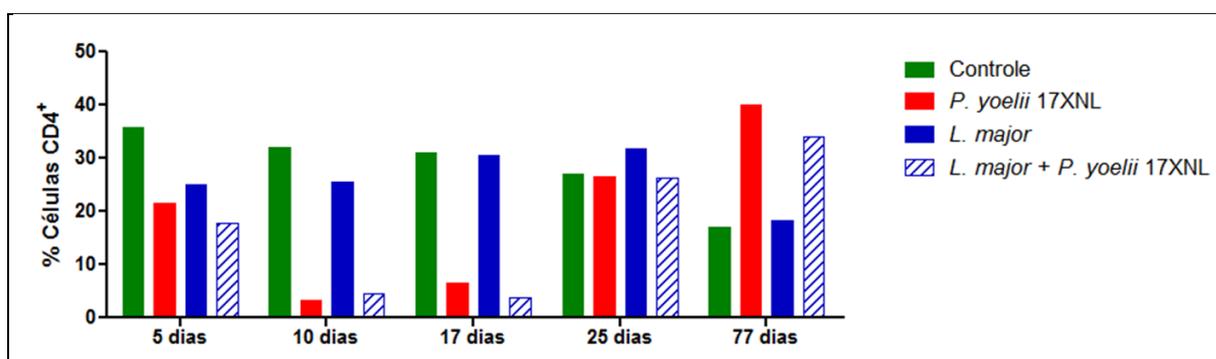


Figura 5.19: Comparação entre o percentual de células CD4⁺ no baço de camundongos do grupo controle, monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major* e coinfectedos com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD4⁺ Produtoras de Citocinas (INF- γ , IL-4 e IL-10)**

Em relação à produção de citocinas pelas células CD4⁺ do baço, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectedos quanto nos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento nos percentuais de células produtoras de INF- γ e IL-4 nos dias 5, 10 e 17, em relação ao grupo controle (Figura 5.20A e 5.20B) apesar da diminuição percentual de células CD4⁺ no baço (Figura 5.19). Ao compararmos o percentual de células CD4⁺

produtoras de IFN- γ e IL-4 entre os grupos co- e monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL observamos que o perfil de células CD4⁺IFN- γ ⁺ foi semelhante entre os grupos, porém o percentual de células CD4⁺IL-4⁺ foi substancialmente menor nos coinfectados. Após o pico de parasitemia, ocorreu um decréscimo nos percentuais das células CD4⁺INF- γ ⁺ e CD4⁺IL-4⁺, em ambos os grupos, atingindo percentuais semelhantes aos do controle. Foi encontrada correlação positiva entre o percentual de células CD4⁺INF- γ ⁺ e parasitemia nos grupos mono e coinfectados ($R^2= 0,9747$ e $P= 0,0167$, em ambos). Já os percentuais das células CD4⁺IL-10⁺ apresentavam-se substancialmente aumentados no grupo coinfectado durante a fase aguda da malária, principalmente nos dias 5 e 17, quando comparados aos dos grupos controle e monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major* (Figura 5.20C). Os animais monoinfectados com *L. major* não apresentaram variação significativa nos percentuais de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-10 no curso da infecção, porém foi observado um aumento do percentual de células CD4⁺IL-4⁺ em relação ao controle. A proporção de células CD4⁺IFN- γ ⁺, IL-4⁺ e IL-10⁺ apresentam níveis semelhantes aos dos controles no dia 77 em todos os grupos (Figura 5.20A, 5.20B e 5.20C).

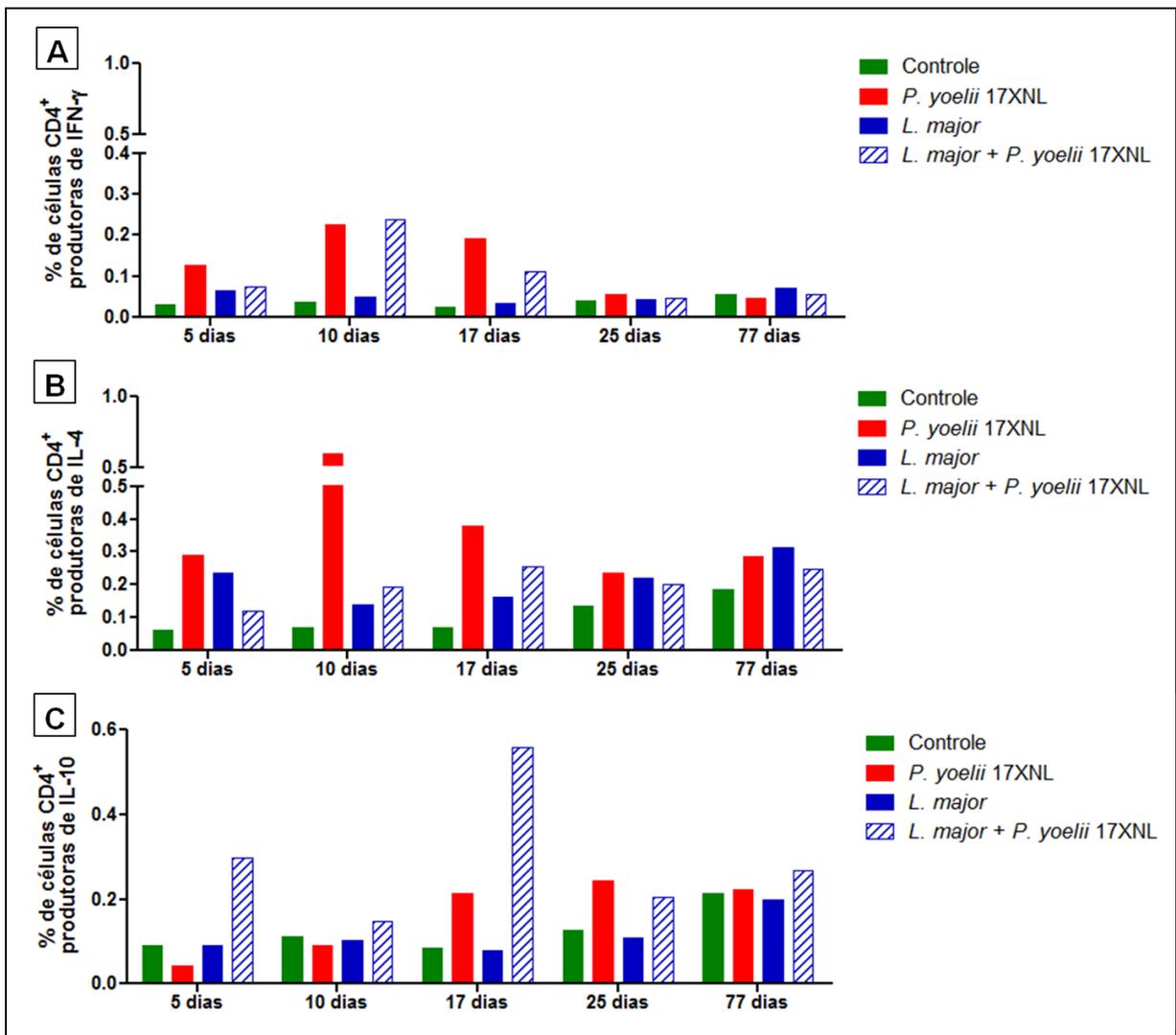


Figura 5.20: Comparação entre o percentual de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major* e co infectado com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD4⁺CD25⁺**

Ao avaliarmos o percentual de células CD4⁺CD25⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto no grupo dos camundongos co infectados quanto no grupo dos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento expressivo nos percentuais dessas células nos dias 10 e 17, em relação ao grupo controle. Entretanto, no grupo dos co infectados observamos um decréscimo nos percentuais dessas células após o pico de parasitemia enquanto no grupo dos mono infectados com plasmódio esses percentuais aumentaram até o 17^o dia (Figura 5.21). Além disso, foi verificado que o aumento do percentual das células CD4⁺CD25⁺ estava correlacionado positivamente com a parasitemia no grupo co infectado ($R^2 = 0,9747$ e

$P= 0,0167$). O percentual de células $CD4^+CD25^+$ no baço dos camundongos monoinfectados com *L. major* é semelhante ao do grupo controle no decorrer da infecção (Figura 5.21).

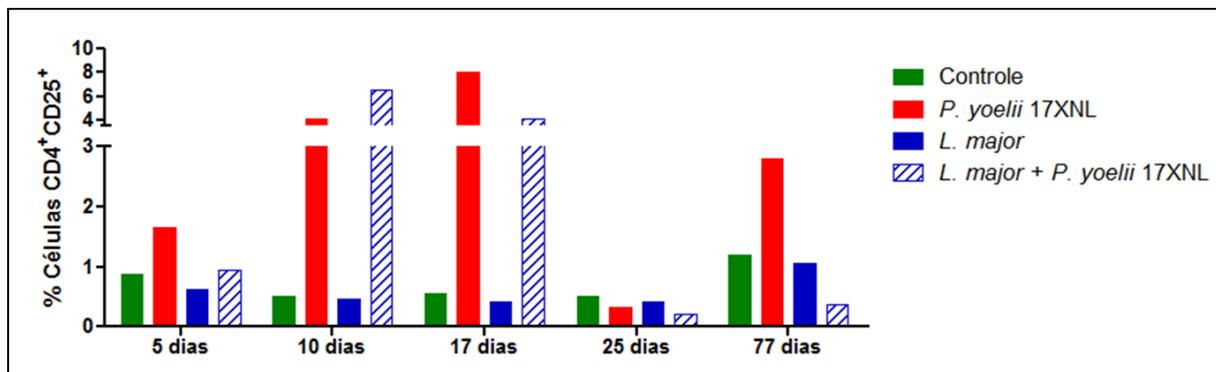


Figura 5.21: Comparação entre o percentual de células $CD4^+CD25^+$ no baço de camundongos do grupo controle, monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major* e coinfectedo com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células T Reguladoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)**

Na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectedos quanto nos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL foi observado um aumento no percentual de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no baço nos dias 5, 10 e 17, indicando que a infecção malárica é responsável por esse aumento (Figura 5.22). O percentual dessa população de células declinou quando plasmódios não foram mais detectados na corrente sanguínea, alcançando valores semelhantes aos dos controles, em ambas as infecções. Foi encontrada correlação positiva entre o percentual de células Tregs e parasitemia no grupo coinfectedo ($R^2= 0,9747$ e $P= 0,0167$). No grupo monoinfectado com *L. major* o percentual de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no baço foi semelhante ao do grupo controle no decorrer da infecção (Figura 5.22).

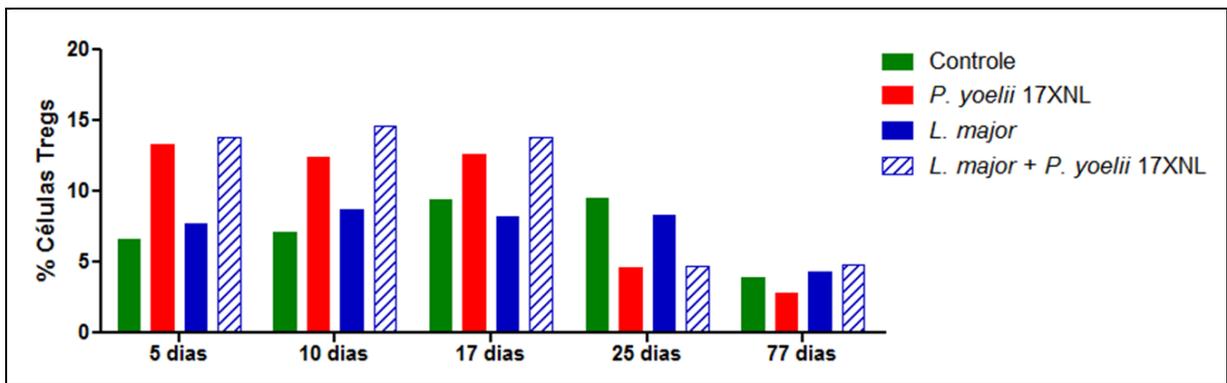


Figura 5.22: Comparação entre o percentual de células Tregs no baço de camundongos do grupo controle, monoinfetado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major* e coinfetado com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

O percentual de células CD4⁺ diminuiu apenas nos grupos coinfetado e monoinfetado com *P. yoelii* 17XNL na fase aguda da infecção malárica, indicando que não há interferência da infecção por *L. major* (assim como por *L. braziliensis*) na frequência dessas células no baço. Apesar disso, ocorreu aumento do percentual de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-4⁺ nos grupos coinfetado e monoinfetado com *P. yoelii* 17XNL em relação aos controles e aos monoinfetados com *L. major*. Em relação às células CD4⁺IL4⁺, o aumento do seu percentual foi menor do que o observado na coinfecção por *L. braziliensis* na fase aguda da infecção malárica. Já o percentual de células CD4⁺IL-10⁺ foi consideravelmente maior no grupo dos coinfetados durante a fase aguda da malária. Esse aumento também foi observado na coinfecção com *L. braziliensis*. É interessante observar que a cinética do percentual de células CD4⁺IFN- γ ⁺ nesse período é inversamente proporcional ao das células CD4⁺IL-10⁺ na coinfecção por *L. major*.

Cabe ainda ressaltar que o aumento do percentual das células CD4⁺IL-10⁺ só foi observado nas coinfecções, tanto por *L. major* e *P. yoelii* 17XNL quanto por *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL. Isto é, o aumento do percentual dessas células não ocorreu nas monoinfecções seja por *P. yoelii* 17XNL, *L. major* ou *L. braziliensis*.

Resumo (continuação):

O aumento do percentual de células CD4⁺CD25⁺ durante a infecção pelo plasmódio é encontrada tanto no baço dos camundongos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL quanto no baço dos animais coinfectados. O mesmo foi observado na coinfeção com *L. braziliensis*.

Em relação às células Tregs, seu percentual estava aumentado na fase aguda da infecção malárica nos grupos dos monoinfectados com *P. yoelii* 17 XNL e dos coinfectados com *L. major* ou *L. braziliensis*. Esses dados sugerem que o incremento percentual de células Tregs está relacionado à infecção pelo plasmódio, uma vez que a infecção exclusiva por *L. major* ou *L. braziliensis* não é capaz de provocar aumento expressivo no percentual dessas células.

- **Células CD8⁺**

Ao avaliarmos o percentual de células CD8⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto os camundongos coinfectados quanto os monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL apresentaram uma redução no percentual dessas células no baço, principalmente nos dias 10 e 17, em relação ao grupo controle. Na décima primeira semana (77 dias) o percentual de células CD8⁺ nos camundongos coinfectados se apresenta mais elevado em relação aos grupos controle e monoinfectado com plasmódio ou *L. major* (Figura 5.23). Não foi encontrada correlação entre parasitemia e percentual de células CD8⁺ em ambos os grupos. Os animais monoinfectados com *L. major* não apresentaram variação significativa nos percentuais de células CD8⁺ no curso da infecção (Figura 5.23).

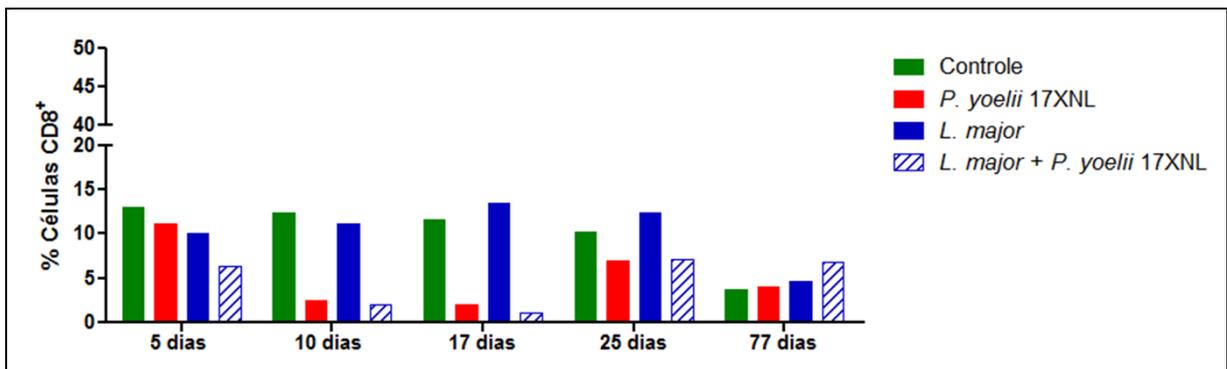


Figura 5.23: Comparação entre o percentual de células CD8⁺ no baço de camundongos do grupo controle, monoinfetado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major* e coinfetado com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD8⁺ Produtoras de Citocinas (INF- γ , IL-4 e IL-10)**

Em relação à produção de citocinas pelas células CD8⁺ do baço observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfetados quanto nos monoinfetados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento expressivo nos percentuais de células produtoras de IFN- γ e IL-4 nos dias 5, 10 e 17, em relação ao grupo controle (Figura 5.24A e 5.24B), apesar do decréscimo do percentual das células CD8⁺ no baço (Figura 5.23). A cinética do percentual de células CD8⁺ produtoras das diferentes citocinas variou no decorrer da infecção malárica. Foi observado um aumento substancial do percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ no início da fase aguda (5^o dia) em ambas as infecções, seguido de um decréscimo do percentual dessas células nos camundongos monoinfetados com *P. yoelii* 17XNL. Nos dias 10 e 17, no entanto, o percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ apresentava-se mais elevado no grupo dos coinfetados em comparação ao grupo dos monoinfetados com *P. yoelii* 17XNL (Figura 5.24A). Já o percentual de células CD8⁺IL-4⁺ apresentava-se mais elevado no grupo dos camundongos coinfetados quando comparado com os monoinfetados com plasmódio, nos dias 10 e 17 (Figura 5.24B). Em relação ao percentual das células CD8⁺IL-10⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica, somente no grupo dos monoinfetados, ocorreu um aumento transitório dessas células no dia 10 (Figura 5.24C). No grupo dos coinfetados o percentual de células CD8⁺IL-10⁺ estava substancialmente elevado no dia 77 em relação a todos os demais grupos (Figura 5.24C). Os animais monoinfetados com *L. major* não apresentaram variação significativa nos percentuais de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-10 no curso da infecção. Já

as células CD8⁺IL-4⁺ apresentaram percentuais elevados em relação ao controle nos dias 5 e 77.

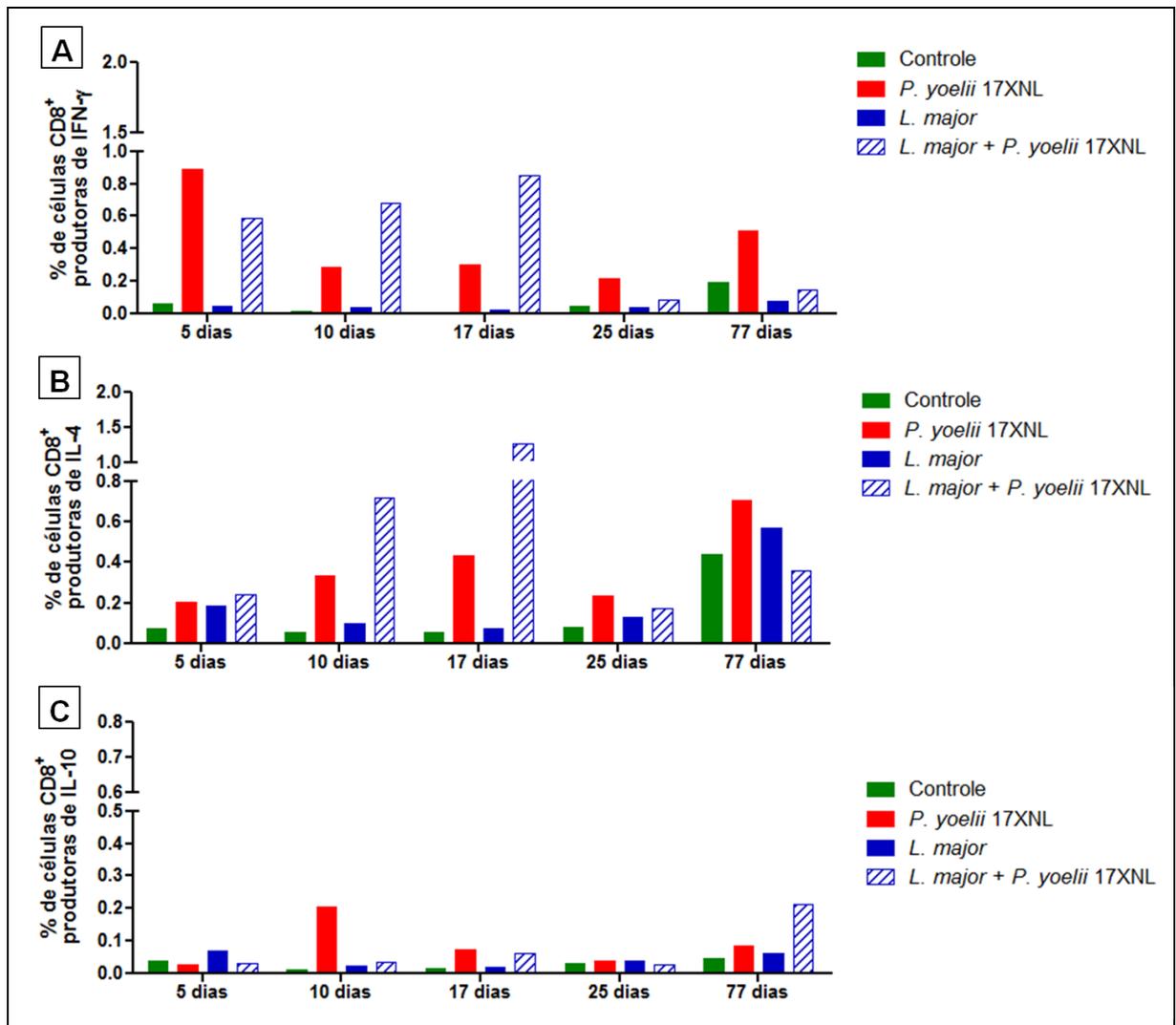


Figura 5.24: Comparação entre o percentual de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major* e co infectado com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

A cinética do percentual de células CD8⁺ foi semelhante nos grupos dos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL e coinfectados no decorrer da infecção malárica. Esse fato sugere que não há interferência da infecção por *L. major* (assim como por *L. braziliensis*) na frequência dessas células no baço. Apesar da diminuição percentual de células CD8⁺ no baço, foi observado um aumento no percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ e CD8⁺IL-4⁺ nos dois grupos infectados com plasmódio (mono e coinfectado). Cabe ressaltar que no grupo dos monoinfectados o aumento no percentual das células CD8⁺IFN- γ ⁺ foi mais acentuado no 5º da infecção, seguido de um decréscimo no dia 10, enquanto no grupo dos coinfectados os percentuais das células CD8⁺IFN- γ ⁺ mantiveram-se estáveis durante a fase aguda da infecção malárica. Já o percentual das células CD8⁺IL-4⁺ apresentava-se mais elevado no grupo dos camundongos coinfectados nos dias 10 e 17. Apesar do aumento dos percentuais das células CD8⁺IFN- γ ⁺ e CD8⁺IL-4⁺ parecer estar associado à fase aguda da infecção malárica, pois o mesmo ocorre nos camundongos infectados apenas com *P. yoelii* 17XNL, observamos que os percentuais dessas células são em sua maioria mais elevados no grupo dos coinfectados (*L. major* e *P. yoelii* 17XNL).

Em relação às células CD8⁺IL-10⁺, seu percentual foi consideravelmente maior no grupo dos coinfectados no dia 77. Vale lembrar que o aumento do percentual dessas células em uma fase mais tardia também foi observado na coinfecção com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL.

- **Células CD14⁺IL-10⁺**

A avaliação de células CD14⁺IL-10⁺ no baço de camundongos demonstrou que os animais monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL não apresentaram variação significativa no percentual dessas células no curso da infecção em relação ao controle. Os monoinfectados com *L. major* apresentaram um pequeno aumento percentual dessas células no dia 77. Já os coinfectados apresentaram um aumento

transitório no percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no dia 5 e um aumento substancial dessas células nos dias 25 e 77, quando não são mais detectadas formas sanguíneas de *P. yoelii* 17XNL (Figura 5.25). Esse aumento foi mais importante no dia 77 sugerindo que a coinfeção influencie na frequência dessas células no baço mais tardiamente.

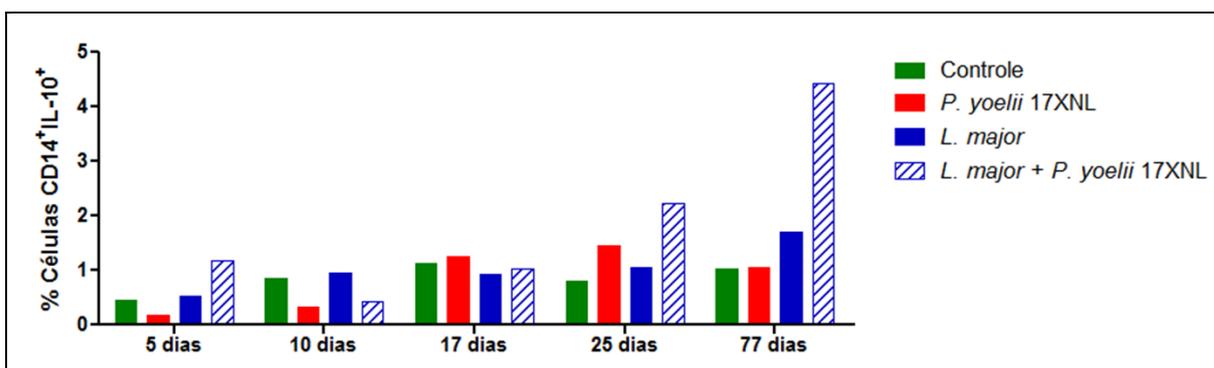


Figura 5.25: Comparação entre o percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. major* e coinfectado com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

Em relação às células CD14⁺IL-10⁺, foi observado um aumento percentual no início da infecção pelo plasmódio (dia 5) e quando não são mais detectadas formas sanguíneas circulantes (dias 25 e 77) no grupo coinfectado. Esse aumento foi mais importante no dia 77 sugerindo que a coinfeção influencie na frequência dessas células no baço mais tardiamente. Também foi verificado um aumento percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no dia 77 no grupo coinfectado com *L. braziliensis*, no entanto esse aumento foi pouco menor do que o encontrado para a coinfeção por *L. major* (3,39% contra 4,42% no grupo coinfectado com *L. major*).

- **Citocinas**

A quantificação de citocinas séricas demonstrou aumento dos níveis de citocinas dos tipos Th1 (IFN- γ e TNF) e Th2 (IL-6) e reguladora (IL-10) na fase aguda da infecção (dias 5, 10 e 17) tanto no grupo dos camundongos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL quanto no grupo dos co infectados, quando comparados aos controles (Tabela 5.2). Entretanto, no grupo dos co infectados os níveis séricos de IFN- γ , TNF e IL-6 no dia 5 eram mais baixos quando comparados aos dos mono infectados com plasmódio (Tabela 5.5). Já no dia 10, IL-6 apresenta níveis substancialmente mais elevados em relação aos camundongos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL. Foi encontrada correlação direta entre parasitemia e os níveis de TNF e IL-10 no grupo co infectado ($R^2= 0,9747$ e $P= 0,0167$, nos dois casos). Em ambos os grupos infectados com plasmódio (mono e co infectados) foi observado um aumento substancial dos níveis de IFN- γ no início da fase aguda (5^o dia) seguido de um decréscimo desses níveis. A concentração de IL-17 no grupo co infectado foi semelhante a do grupo controle e menor do que a concentração do grupo mono infectado com *P. yoelii* 17XNL nos dias 10, 17 e 77. Em relação ao grupo mono infectado com *L. major*, foi observado um aumento nos níveis séricos de IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 no início da infecção. Posteriormente, foi verificada concentração elevada de IL-17 (dia 17) e de IL-6 (dia 77).

A Tabela 5.2 resume as alterações nos níveis séricos das citocinas Th1, Th2, Th17 e reguladora nos grupos mono infectados em relação ao grupo controle e entre o grupo co infectado e os grupos controle e mono infectados. As concentrações séricas das citocinas de cada grupo nos diferentes dias avaliados são apresentadas no Anexo 3.

Tabela 5.2: Alterações nos níveis séricos de citocinas observadas nos animais monoinfectados (em comparação com o grupo controle) e coinfectado (em comparação com os grupos controles e monoinfectados).

		<i>P. yoelii</i> VS Controle					<i>L. major</i> VS Controle					<i>L. major + P. yoelii</i> VS Controle					<i>L. major + P. yoelii</i> VS <i>P. yoelii</i>					<i>L. major + P. yoelii</i> VS <i>L. major</i>								
Citocinas		5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77				
Th1	IFN- γ	30,82 x	2,79 x	2,18 x		2,94 x	9,87 x					12,85 x	3,53 x				2,4 x										4,15 x			
	TNF	7,72 x	3,41 x	4,90 x			3,70 x					2,24 x	7,44 x	5,11 x			3,44 x	2,18 x									5,99 x	4,5 x		
	IL-2																													
Th2	IL-4					2,34 x																								
	IL-6	5,51 x	2,91 x	8,07 x	2,29 x	10,19 x	2,63 x				2,26 x		31,11 x	8,68 x		3,87 x	4,59 x	10,67 x				2,63 x	2,19 x	17,06 x	6,06 x	2,56 x				
Th17	IL-17		2,28 x	3,97 x		4,24 x			2,43 x						2,39 x			3,47 x	2,23 x		2,33 x						2,83 x	2,78 x		
Reg	IL-10	3,73 x	2,9 x	3,41 x	2,1 x		2,39 x					2,53 x	2,83 x	3,3 x																
Inalterado						Maior										Menor														

*Na tabela foram assinaladas as diferenças iguais ou superiores a 2x a concentração de citocina encontrada.

Resumo:

O aumento nos níveis séricos de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF), Th2 (IL-6) e reguladora (IL-10) indica que os dois tipos de respostas são induzidas e reguladas na infecção por *P. yoelii* 17XNL. No grupo coinfestado, no entanto, os níveis de IFN- γ , TNF e IL-6 no início da infecção (dia 5) foram mais baixos do que no grupo monoinfestado. Também foram observados níveis mais baixos dessas citocinas na infecção por *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL. Os níveis séricos de IL-17 também aumentam durante a infecção malárica nos dois grupos, mas na infecção a concentração dessa citocina é mais baixa do que na infecção exclusiva pelo plasmódio, em concordância com o que foi observado na infecção por *L. braziliensis*.

O aumento de IL-10 no soro concorda com o aumento percentual de células CD4⁺IL-10⁺ nos grupos mono e coinfestado, durante a fase aguda da infecção malárica. Já o aumento do nível sérico de IL-10 observado no dia 77 apenas no grupo coinfestado, pode estar relacionado ao crescimento percentual de células CD8⁺IL-10⁺ e CD14⁺IL-10⁺, também observado nesse grupo, provavelmente por influência da infecção concomitante por *L. major*, de forma parecida ao que ocorreu na infecção com *L. braziliensis*.

Na infecção exclusiva por *L. major* é observado um aumento de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF), Th2 (IL-6) e reguladora (IL-10) e, depois, aumento de citocinas Th17 (IL-17).

5.3 Influência da Coinfecção por *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL

5.3.1 Alterações Parasitológicas na Infecção por *P. yoelii* 17XNL

- Parasitemia

A análise da parasitemia realizada pelo monitoramento de distensões sanguíneas demonstrou que a coinfecção não alterou o período pré-patente. As formas sanguíneas do parasito foram detectadas a partir do terceiro dia após infecção atingindo o pico máximo por volta do 13^o e 16^o dia nos grupos dos mono e coinfectados, respectivamente. No dia cinco de infecção a parasitemia do grupo coinfectado foi maior do que a parasitemia do grupo monoinfectado ($P= 0,0149$). Além disso, houve aumento do período patente nos camundongos coinfectados em relação aos monoinfectados (Figura 5.26).

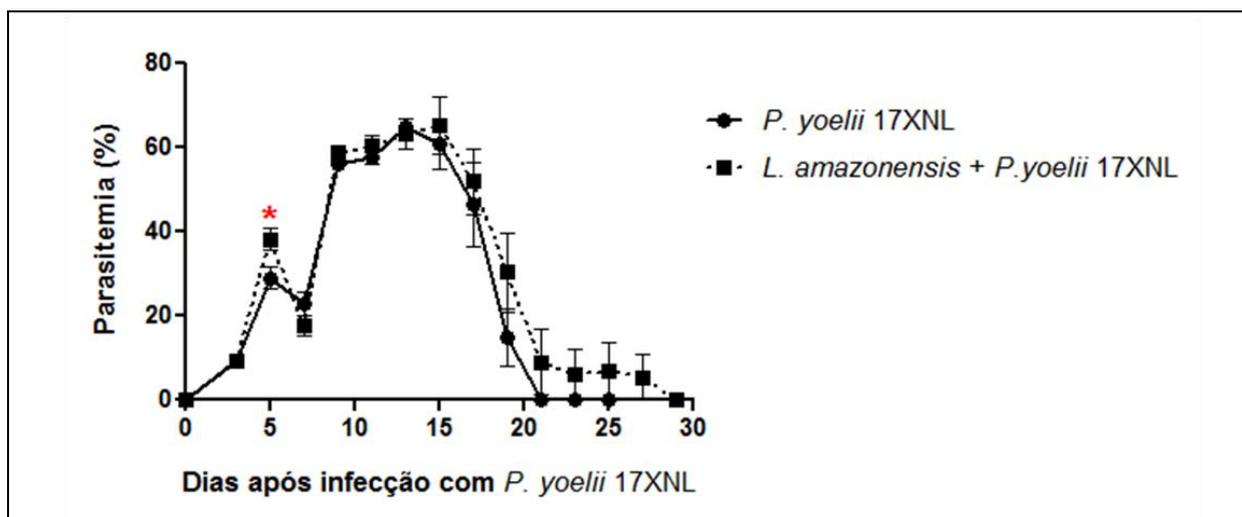


Figura 5.26: Comparação entre as parasitemias dos animais monoinfectados e coinfectados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL ao longo do tempo. O asterisco assinala o dia em que houve diferença significativa entre os grupos monoinfectado (n=15) e coinfectado (n=15) pelo teste *t* de Student. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

5.3.2 Alterações Parasitológicas na Infecção por *L. amazonensis*

- **Avaliação do Aparecimento, do Tamanho e da Evolução das Lesões e Úlceras**

No curso da infecção com *L. amazonensis* as lesões começaram a aparecer por volta do 10º dia e apresentaram aumento progressivo ao longo do tempo em que foram acompanhadas. Nos animais coinfectados as lesões apareceram mais tardiamente, por volta do dia 25 (Figura 5.27) e apresentaram tamanho médio menor do que as lesões dos animais mono infectados até o dia 34. A diferença entre as medidas observadas nos dois grupos foi estatisticamente significativa nos dias 25 ($P= 0,0003$) e 34 ($P= 0,0300$). Além disso, as lesões dos animais coinfectados ulceraram mais tardiamente do que as lesões dos animais mono infectados, com 41 e 25 dias, respectivamente. A proporção de lesões ulceradas nos camundongos coinfectados foi menor até o dia 55 do experimento, porém sem diferença estatística (Figura 5.27). A Prancha 3 (Anexo 2) ilustra o aspecto das lesões no final do período de estudo.

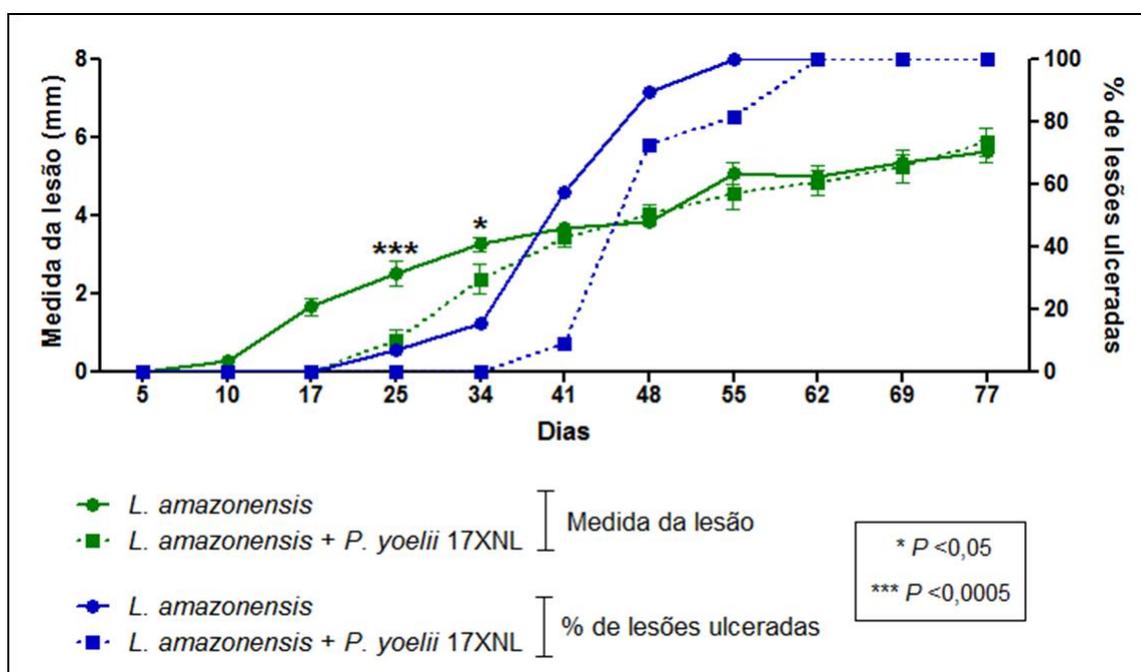


Figura 5.27: Medida de lesão e porcentagem de lesões úlceras ao longo do tempo em animais mono infectados e coinfectados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL. Os valores da medida da lesão (em verde) estão representados no eixo à esquerda do gráfico e a porcentagem de lesões ulceradas (em azul) à direita. Os asteriscos assinalam os dias em que houve diferença significativa entre os grupos mono infectado ($n=15$) e coinfectado ($n=15$) pelo teste t de Student. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

- **Determinação da Carga Parasitária nas Lesões das Orelhas**

No curso da infecção o número de parasitos encontrados por lesão foi menor no grupo coinfectado nos dias 10, 17 e 25 em comparação com o grupo mono infectado com *L. amazonensis*. No entanto, nos dois grupos o número de parasitos por lesão aumentou com o tempo de infecção (Figura 5.28).

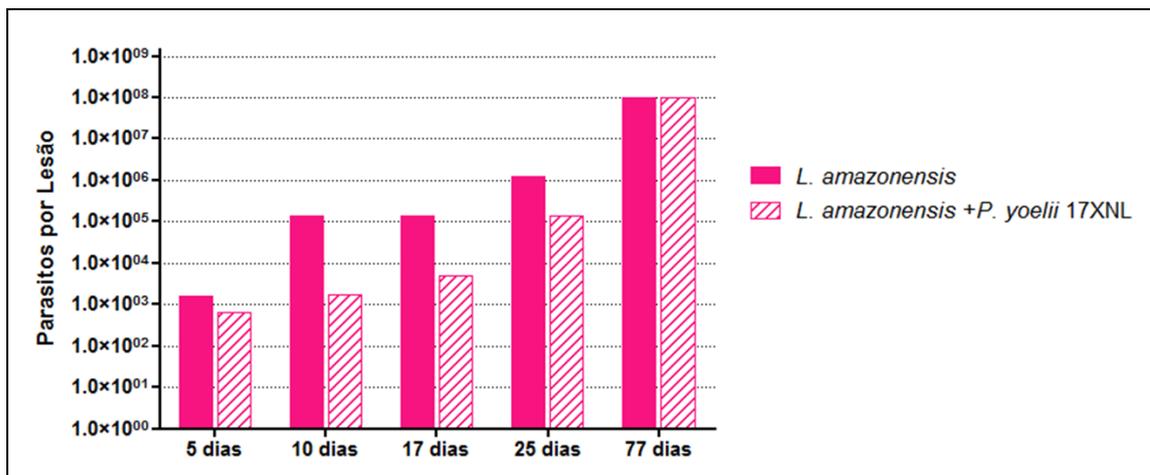


Figura 5.28: Comparação entre a carga parasitária das lesões dos grupos mono infectado com *L. amazonensis* e coinfectado com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL.

5.3.3 Sinais Clínicos

- **Temperatura**

O monitoramento da temperatura corporal demonstrou que tanto os animais mono infectados com *P. yoelii* 17XNL como os coinfectados apresentavam uma queda da temperatura corporal (hipotermia) no curso da infecção malária quando comparados aos camundongos controles (média= 35,2°C ± 0,58). A temperatura corporal dos animais mono infectados com plasmódio e coinfectados alternou entre períodos de hipotermia e normotermia durante a infecção malária de forma semelhante, porém nos dias 9 e 17 a temperatura corporal dos camundongos mono infectados com plasmódio (média=34,4 °C ± 0,1; média=34,02 °C ± 0,17) era mais baixa em relação aos coinfectados (média=34,86 °C ± 0,16; média=35,02 °C ± 0,37) ($P= 0,0407$ e $P= 0,0409$, respectivamente) (Figura 5.29). Já os animais mono infectados com *L. amazonensis* apresentaram temperaturas similares as dos

controles (média= 35,2°C±0,58) no decorrer da infecção. A temperatura corporal dos coinfectados foi mais baixa durante a fase aguda da malária, principalmente nos dias 5 (média=33,44 °C ± 0,48) e 11 (média=33,62 °C ± 0,30), quando comparados aos infectados apenas com *L. amazonensis* ($P < 0,0001$ e $P = 0,0331$, respectivamente) (Figura 5.29).

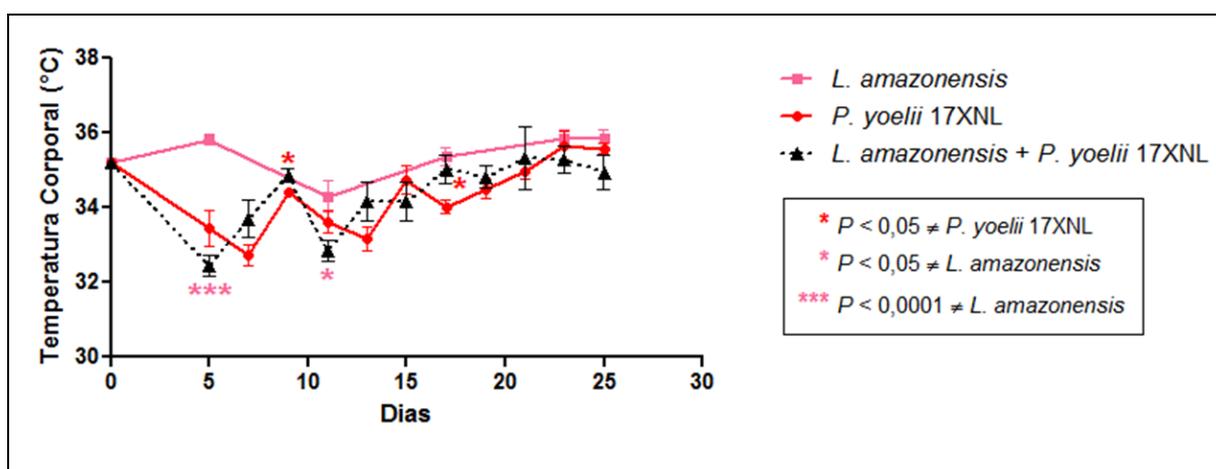


Figura 5.29: Comparação entre as médias de temperatura corporal dos animais mono infectados e coinfectados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL ao longo do tempo. Os asteriscos assinalam os dias em que houve diferença significativa entre os grupos mono infectado com *P. yoelii* 17XNL (vermelho) ou *L. amazonensis* (rosa) e coinfectado pelo teste *t* de Student. As barras representam as médias ± erro padrão da média (EPM).

- **Massa Corporal**

A variação de massa corporal dos animais mono e coinfectados foi comparada com a dos animais controles ao longo do tempo (Figura 5.30). Foi observada uma acentuada perda de massa corporal nos animais mono e coinfectados com *P. yoelii* 17XNL em relação ao grupo controle, compatíveis com a elevação da parasitemia ($R^2 = -0,7583$, $P = 0,0007$ - *P. yoelii* 17 XNL e $R^2 = -0,8277$ e $P < 0,0001$ - *P. yoelii* 17 XNL e *L. amazonensis*). Nos dias 10 e 17, a perda de massa corporal foi expressiva tanto no grupo de animais mono infectados com plasmódio (média= 19,27 ± 0,65 e 20,83 ± 1,08; $P = 0,0002$ e $P = 0,0373$, respectivamente) quanto nos coinfectados (média= 18,74 ± 0,46 e 19,91 ± 1,34; $P < 0,0001$ e $P = 0,0183$, respectivamente), coincidindo com o pico de parasitemia. Os animais mono infectados com *L. amazonensis* não apresentaram variação significativa de massa corporal quando comparados ao grupo controle (Figura 5.30).

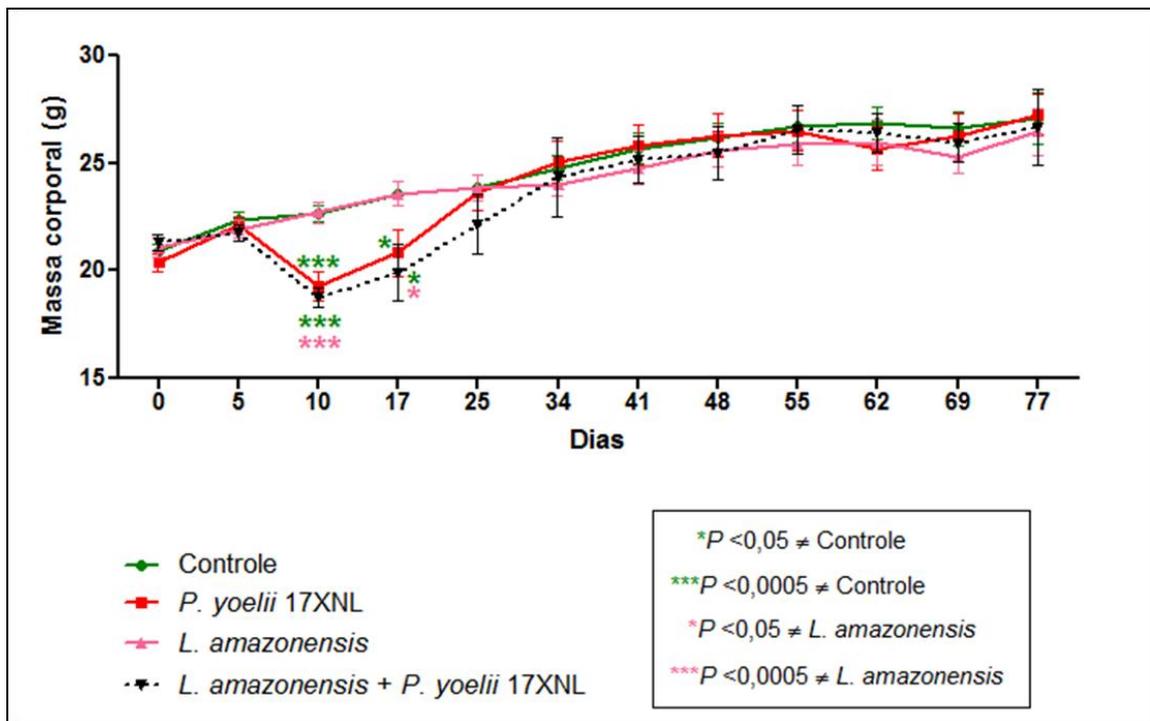


Figura 5.30: Variação de peso em animais coinfetados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL em comparação aos animais controle e monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis*. Os asteriscos assinalam as semanas em que foram encontradas diferenças significativas entre o peso do grupo coinfetado (n=15) e o grupo controle (verde, n=10) ou monoinfectado com *L. amazonensis* (rosa, n=15). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

- **Mortalidade**

A mortalidade, expressa como percentagem de sobrevivência, apresentou perfil diferente entre as monoinfecções e a coinfecção. A comparação entre as curvas de sobrevivência dos grupos monoinfectados com o grupo coinfetado, no entanto, não apontou diferença estatisticamente significativa nos testes utilizados (Figura 5.31). No grupo dos coinfetados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL 26,14% dos animais morreram entre os dias 7 e 21 de infecção.

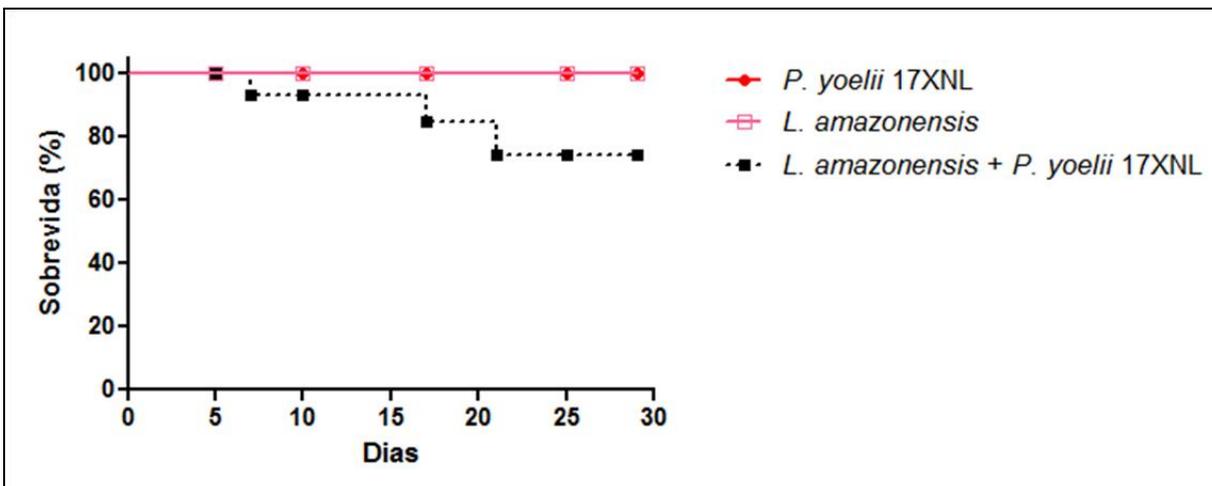


Figura 5.31: Curva de sobrevivência de camundongos coinfestados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL em comparação com a curva de camundongos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis*.

Resumo:

Nossos resultados sugerem que a coinfecção com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL não tem efeito benéfico* a malária, pois o período patente e a mortalidade aumentaram no grupo coinfestado. É importante lembrar que a coinfecção por *L. amazonensis* foi a única em que a negativação da parasitemia ocorreu mais tardiamente em relação ao grupo mono infectado com *P. yoelii* 17XNL. Já a taxa de mortalidade foi pouco menor do que a observada no grupo coinfestado com *L. major* e a maioria das mortes ocorreu mais tardiamente. Assim sendo, nossos dados indicam que a coinfecção por *L. amazonensis* influencia de forma diferente o curso da malária, quando comparamos com as coinfecções pelas outras espécies de leishmânia avaliadas neste trabalho, de forma que a maior persistência dos parasitos pode estar envolvida no agravamento da doença em uma fase mais tardia.

*Estabelecemos, para esse trabalho, que a coinfecção com *Leishmania* teria um **efeito benéfico** à malária se fosse observado uma redução de pelo menos dois dos três parâmetros avaliados (níveis de parasitemia, período patente e taxa de sobrevivência).

Resumo (continuação):

Em relação à leishmaniose, pudemos perceber que a coinfeção tem um efeito benéfico** transitório, já que o tamanho médio das lesões foi menor até o dia 34 e as úlceras apareceram posteriormente em comparação ao grupo monoinfectado. Além disso, a carga parasitária das lesões foi menor durante a fase aguda de infecção malárica nos animais coinfectados.

Estabelecemos, para esse trabalho, que a coinfeção com *P. yoelii* teria um **efeito benéfico na leishmaniose se fosse observado uma redução de pelo menos dois dos três parâmetros parasitológicos ou de evolução da doença avaliados (carga parasitária, tamanho e ulceração das lesões).

5.3.4 Alterações Imunológicas

- **Células CD4⁺**

Na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectados quanto nos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL foi observada uma redução no percentual de células CD4⁺ no baço nos dias 5, 10 e 17. Entretanto, nos animais monoinfectados com *L. amazonensis* não foi observada variação significativa no percentual de células CD4⁺ no decorrer da infecção, indicando que a infecção malárica é responsável por esse decréscimo. No grupo coinfectado a redução no percentual dessas células também foi observado no dia 25, provavelmente em função da maior persistência dos parasitos na circulação sanguínea em comparação com ao grupo monoinfectado. No dia 77, o percentual de células CD4⁺ tende a ser maior nos grupos dos monoinfectados com plasmódio e coinfectados quando comparados ao grupo controle (Figura 5.32).

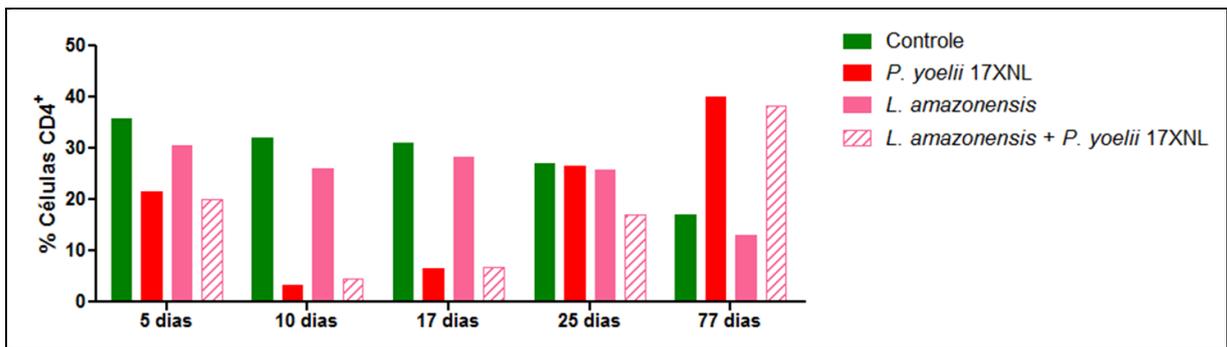


Figura 5.32: Comparação entre o percentual de células CD4⁺ no baço de camundongos do grupo controle, monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis* e coinfectados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD4⁺ Produtoras de Citocinas (INF- γ , IL-4 e IL-10)**

Em relação à produção de citocinas pelas células CD4⁺ do baço, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectados quanto nos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento nos percentuais de células produtoras de IFN- γ e IL-4 nos dias 5, 10 e 17, em relação ao grupo controle (Figura 5.33A e 5.33B) apesar da diminuição percentual de células CD4⁺ no baço (Figura 5.32). No entanto, no grupo coinfectado o percentual de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-4 foi substancialmente maior em comparação ao grupo monoinfectado. Com a negatização da parasitemia o percentual de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-4⁺ diminuiu e ficou semelhante ao do grupo controle. Já os percentuais das células CD4⁺IL-10⁺ aumentam um pouco no grupo coinfectado durante a fase aguda da malária, principalmente nos dias 5 e 10, quando comparado aos dos grupos controle e monoinfectados (Figura 5.33C). Foi encontrada correlação positiva entre o percentual de células CD4⁺INF- γ ⁺ e parasitemia nos grupos mono e coinfectados ($R^2= 0,9747$ e $P= 0,0167$, nos dois grupos) e entre o percentual de células CD4⁺IL-4⁺ e parasitemia no grupo coinfectado ($R^2= 1,000$ e $P= 0,0167$). Os percentuais das células CD4⁺IL-10⁺ apresentam um discreto aumento no grupo dos coinfectados no início da fase aguda da malária, principalmente nos dias 5 e 10, enquanto nos monoinfectados um aumento é observado na fase mais tardia na infecção malárica, nos dias 17 e 25 (Figura 5.33C). Os animais monoinfectados com *L. amazonensis* apresentaram aumento nos percentuais de células CD4⁺ produtoras

de IFN- γ , IL-4 e IL-10 no curso da infecção, sendo o aumento percentual de células CD4⁺IL-10⁺ observado apenas nos dias 25 e 77 (Figura 5.33A, 5.33B e 5.33C).

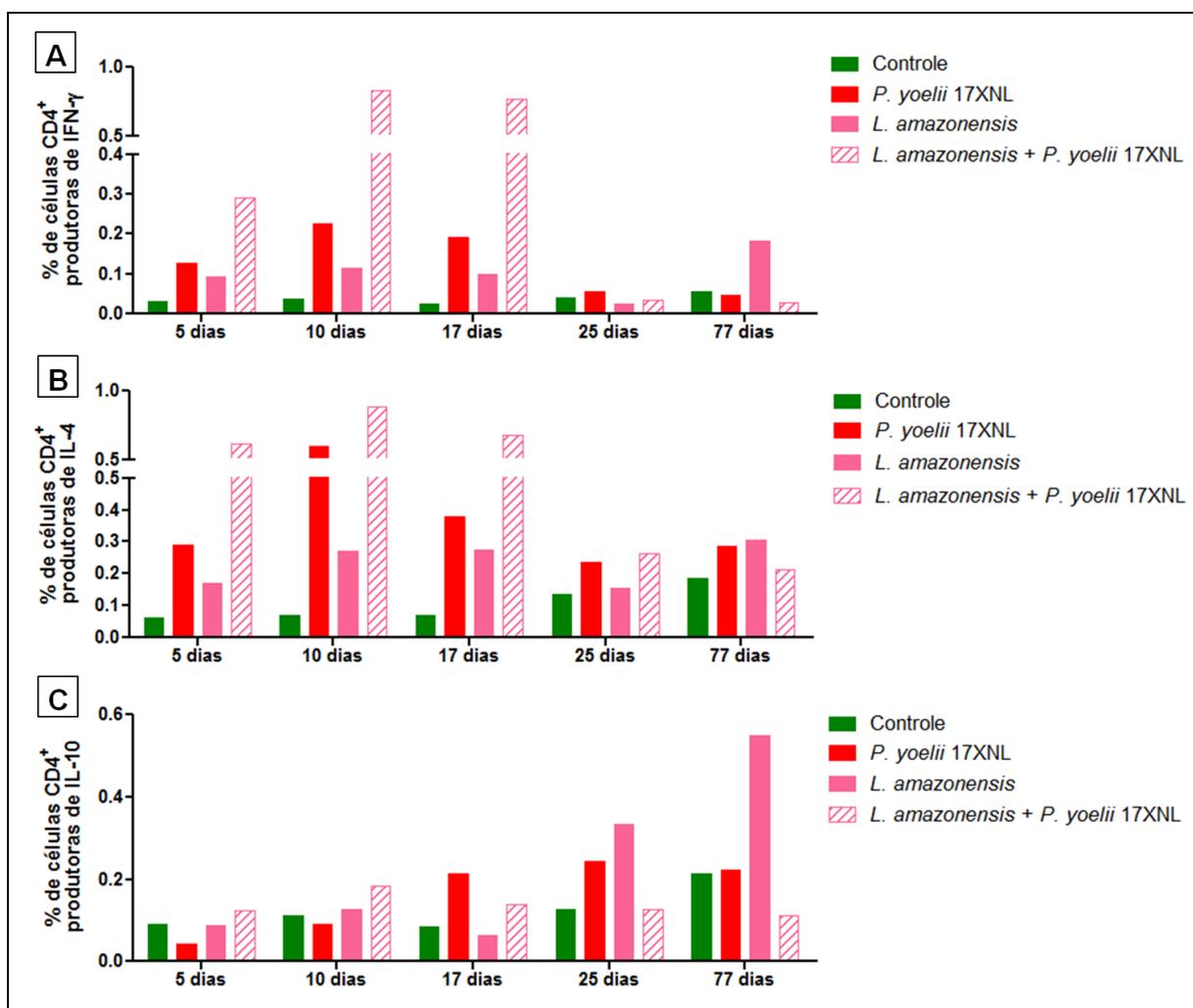


Figura 5.33: Comparação entre o percentual de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectados com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis* e co infectado com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD4⁺CD25⁺**

Ao avaliarmos o percentual de células CD4⁺CD25⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto no grupo dos camundongos co infectados quanto no grupo dos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento expressivo nos percentuais dessas células nos dias 10 e 17, em relação ao grupo controle. No grupo mono infectado com *P. yoelii* 17XNL foi observado, ainda, um aumento no

percentual dessas células no dia 77 quando comparado com o controle. Entretanto, no grupo dos coinfectados esse aumento percentual foi menor do que o observado nos animais mono infectados com plasmódio em todos os dias avaliados (Figura 5.34). O percentual de células $CD4^+CD25^+$ no baço dos camundongos mono infectados com *L. amazonensis* é semelhante ao do grupo controle no decorrer da infecção, sendo observado um pequeno aumento percentual nos dias 17 e 77 (Figura 5.34).

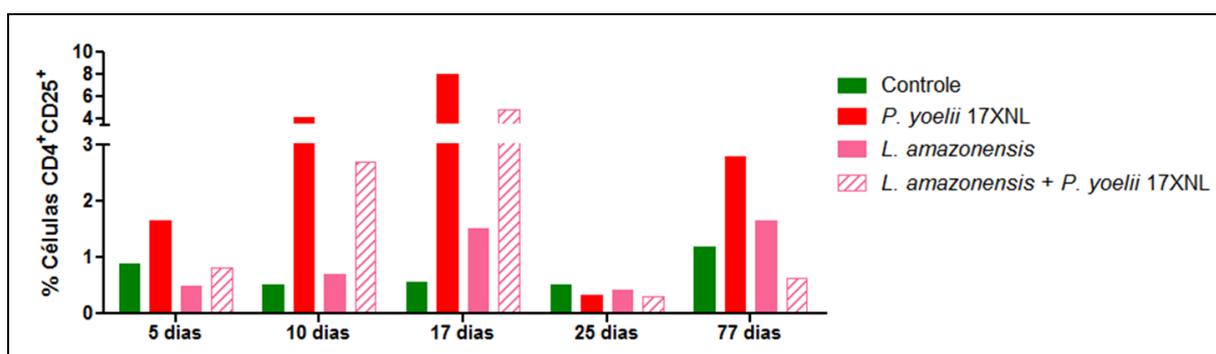


Figura 5.34: Comparação entre o percentual de células $CD4^+CD25^+$ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis* e coinfectado com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células T Reguladoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)**

Na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectados quanto nos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL foi observado um aumento no percentual de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no baço nos dias 5, 10 e 17, indicando que a infecção malárica é responsável por esse aumento (Figura 5.35). O percentual dessa população de células declinou quando plasmódios não foram mais detectados na corrente sanguínea, alcançando valores semelhantes aos dos controles, em ambas as infecções. No grupo mono infectado com *L. amazonensis* o percentual de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no baço foi semelhante ao do grupo controle no decorrer da infecção (Figura 5.35).

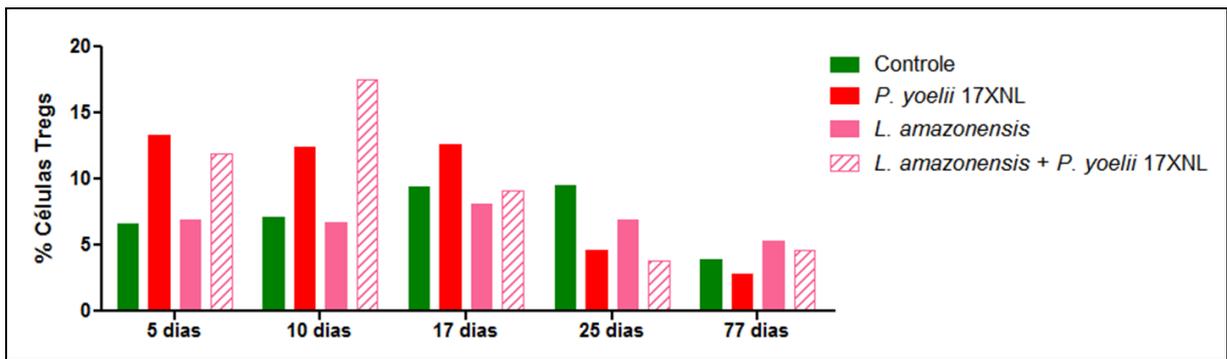


Figura 5.35: Comparação entre o percentual de células Tregs no baço de camundongos do grupo controle, monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis* e coinfectedo com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

O percentual de células CD4⁺ diminuiu apenas nos grupos coinfectedos e monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL na fase aguda da infecção malárica, indicando que não há interferência da infecção por *L. amazonensis* (assim como por *L. braziliensis* e *L. major*) na frequência dessas células no baço. Apesar disso, ocorreu um substancial aumento das células CD4⁺IFN γ ⁺ e CD4⁺IL4⁺ nos grupos coinfectedo e monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL durante a fase aguda da infecção malárica, sendo esse aumento mais exacerbado no grupo dos coinfectedos (perfil semelhante foi observado na coinfecção com *L. braziliensis*). Já o aumento do percentual de células CD4⁺IL10⁺, apresentou um perfil diferente e não foi tão expressivo na fase aguda da infecção malárica quanto o observado nas coinfecções por *L. braziliensis* e *L. major*. Cabe ressaltar que a infecção exclusiva por *L. amazonensis* é a única na qual foi verificado aumento marcante no percentual de células CD4⁺IL-10⁺ nos dias 25 e 77.

O percentual de células CD4⁺CD25⁺ aumenta durante a fase aguda da infecção malárica nos animais monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL e coinfectedos. Resultados semelhantes foram observados nas coinfecções com *L. braziliensis* e *L. major*.

Resumo (continuação):

O incremento percentual de células Tregs observado no grupo coinfectado está relacionado à infecção pelo plasmódio, uma vez que a infecção exclusiva por *L. amazonensis* não é capaz de provocar aumento expressivo no percentual dessas células. O mesmo foi observado nas coinfeções com as outras espécies de leishmânia (*L. braziliensis* e *L. major*) avaliadas neste estudo.

- **Células CD8⁺**

Ao avaliarmos o percentual de células CD8⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica tanto os camundongos coinfectados quanto os mono infectados com *P. yoelii* 17XNL apresentaram uma redução no percentual dessas células no baço em relação ao grupo controle (Figura 5.36). Contudo, não foi encontrada correlação entre parasitemia e percentual de células CD8⁺ em ambos os grupos. No dia 77, o percentual de células CD8⁺ nos camundongos coinfectados se apresentou mais elevado em comparação aos grupos controle e mono infectados. Os animais mono infectados com *L. amazonensis* não apresentaram variação significativa nos percentuais dessas células no curso da infecção (Figura 5.36).

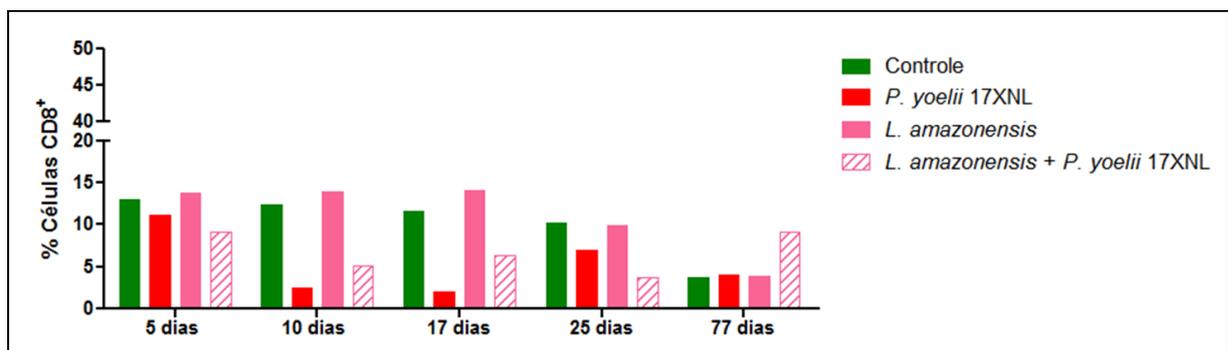


Figura 5.36: Comparação entre o percentual de células CD8⁺ no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis* e coinfectado com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

- **Células CD8⁺ Produtoras de Citocinas (INF- γ , IL-4 e IL-10)**

Em relação às células CD8⁺ produtoras de citocinas, observamos que na fase aguda da infecção malárica, tanto nos camundongos coinfectedos quanto nos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL, ocorreu um aumento expressivo de células produtoras de INF- γ e IL-4 nos dias 5, 10, 17 e 77 em relação ao grupo controle (Figura 5.37A e 5.37B), apesar do decréscimo do percentual das células CD8⁺ no baço (Figura 5.36). A cinética do percentual de células CD8⁺ produtoras das diferentes citocinas variou no decorrer da infecção malárica: foi observado um aumento substancial do percentual de células CD8⁺INF γ ⁺ no início da fase aguda (5^o dia), em ambas as infecções, seguido de um decréscimo do percentual dessas células nos camundongos mono infectados com *P. yoelii* 17XNL. O aumento substancial do percentual de células CD8⁺INF- γ ⁺ no 5^o dia, parece estar associado não só ao início da fase aguda da infecção malárica, pois o mesmo ocorre nos camundongos infectados apenas com *P. yoelii* 17XNL, como demonstrado na Figura 5.37A, mas também ao aumento observado na infecção exclusiva por *L. amazonensis*. Nos dias 5, 10 e 17 o percentual de células CD8⁺INF- γ ⁺ apresentava-se mais elevado no grupo dos coinfectedos em comparação ao grupo dos mono infectados com plasmódio (Figura 5.37A). Já o percentual de células CD8⁺IL-4⁺ apresentava-se mais elevado no grupo dos camundongos coinfectedos quando comparado com os mono infectados, nos dias 5 e 25 (Figura 5.37B). Em relação ao percentual das células CD8⁺IL-10⁺, observamos que na fase aguda da infecção malárica, somente no grupo dos coinfectedos, ocorreu um aumento importante dessas células nos dias 5 e 77 em relação aos demais grupos (controle e mono infectados) (Figura 5.37C). Os animais mono infectados com *L. amazonensis* apresentaram aumento significativo nos percentuais de células CD8⁺ produtoras de INF- γ , IL-4 ou IL-10 no curso da infecção, sendo o aumento de células CD8⁺IL-10⁺ limitado aos dias 5, 10 e 17. No dia 77, o aumento percentual de células CD8⁺INF- γ ⁺ e CD8⁺IL-4⁺ no grupo mono infectado com *L. amazonensis* foi mais expressivo.

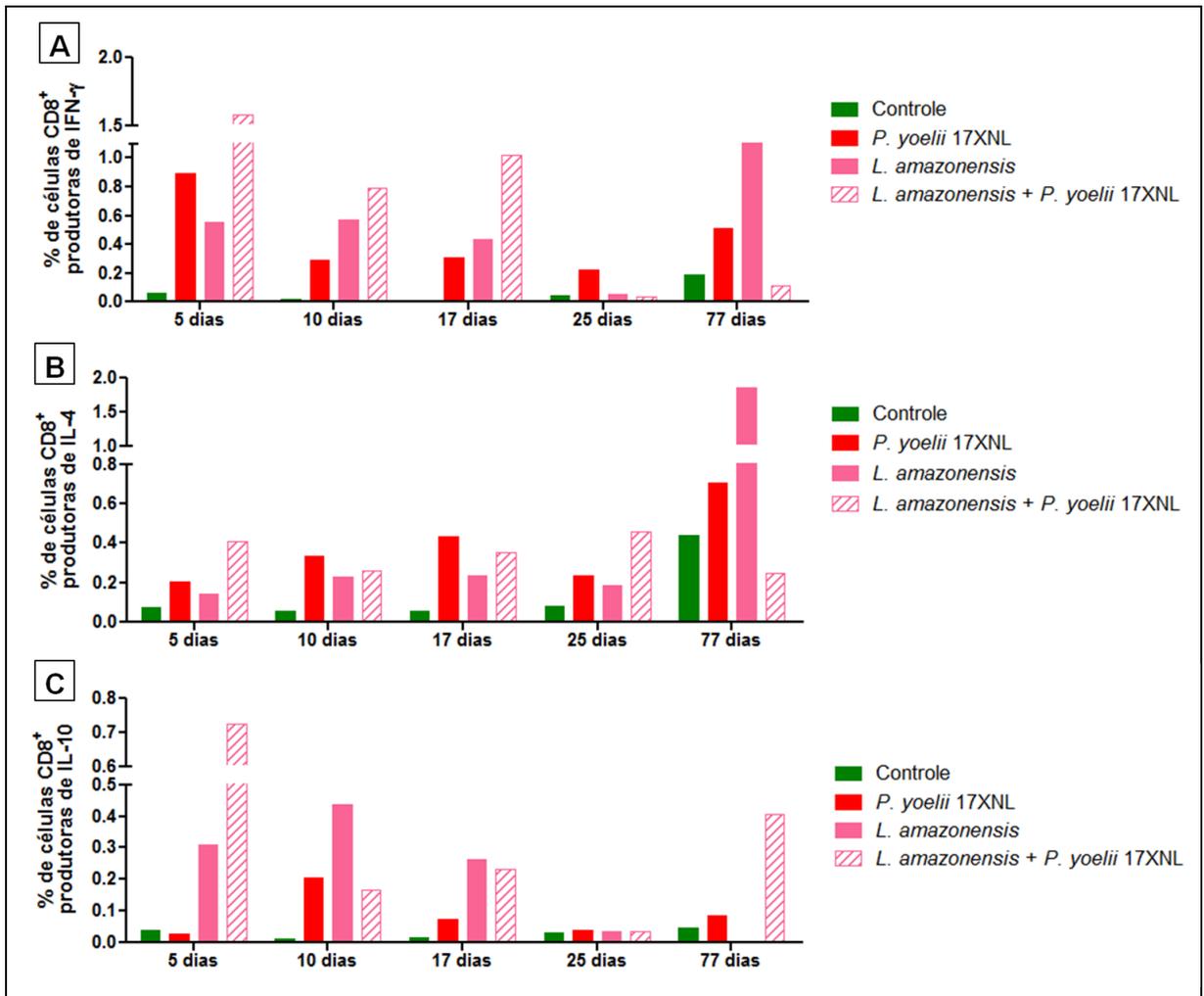


Figura 5.37: Comparação entre o percentual de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) no baço de camundongos do grupo controle, mono infectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis* e co infectado com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

O percentual de células CD8⁺ diminuiu apenas nos grupos coinfectado e monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL na fase aguda da infecção malárica, sugerindo não haver interferência da infecção por *L. amazonensis* (assim com por *L. braziliensis* e *L. major*) na frequência dessas células no baço. O percentual de células CD8⁺ produtoras das citocinas IFN- γ e IL-4, no entanto, aumentou nos dois grupos infectados com plasmódio (mono e coinfectado). O aumento do percentual de células CD8⁺IL-4⁺ nas coinfeções por *L. braziliensis* e *L. major* foi mais expressivo, principalmente nos dias 10 e 17 da infecção malárica, em relação à coinfeção por *L. amazonensis*.

O aumento no percentual de células CD8⁺IL-10⁺ nos dias 5, 10 e 17 só foi observado no grupo coinfectado com *L. amazonensis* (não ocorreu nas coinfeções com *L. braziliensis* ou *L. major*). Provavelmente isso ocorre por influencia da infecção por *L. amazonensis* já que esse aumento também foi observado no grupo monoinfectado por esse protozoário. No dia 77, o percentual de células CD8⁺IL-10⁺ foi consideravelmente mais elevado no grupo dos coinfectados. A elevação da proporção dessas células no baço no dia 77 também foi observada na coinfeção com *L. braziliensis* e *L. major*.

- **Células CD14⁺IL-10⁺**

A avaliação de células CD14⁺IL-10⁺ no baço de camundongos demonstrou que os animais monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL não apresentaram variação significativa no percentual dessas células no curso da infecção em relação ao controle. Os monoinfectados com *L. amazonensis* apresentaram um aumento percentual dessas células nos dias 25 e 77. Já os coinfectados apresentaram um aumento transitório no percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no dia 10 e um aumento substancial dessas células no dia 77, quando não são mais detectadas formas sanguíneas de *P. yoelii* 17XNL (Figura 5.38), sugerindo que a coinfeção influencie no aumento da frequência dessas células no baço mais tardiamente.

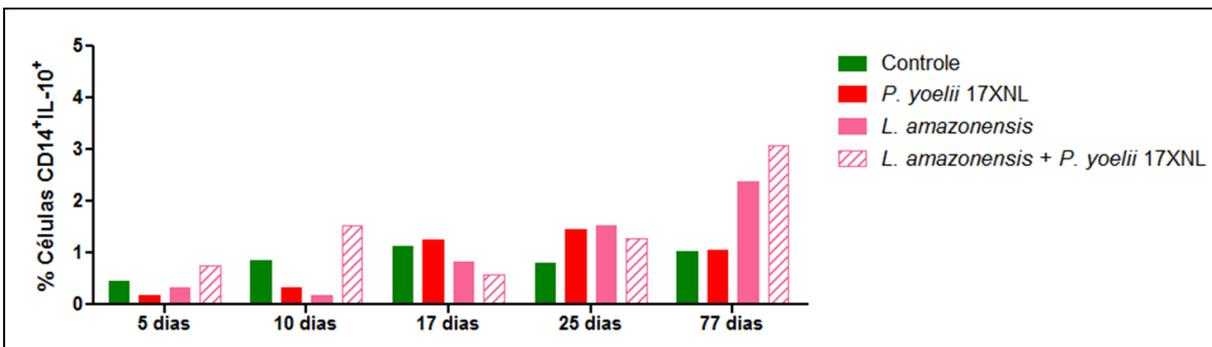


Figura 5.38: Comparação entre o percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no baço de camundongos do grupo controle, monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL ou *L. amazonensis* e coinfectado com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 5, 10, 17, 25 e 77.

Resumo:

Foi observado um aumento percentual de células CD14⁺IL-10⁺ quando não são mais detectadas formas sanguíneas circulantes de *P. yoelii* 17XNL (dia 77) no grupo coinfectado. No grupo monoinfectado com *L. amazonensis* houve um aumento no percentual dessas células era maior em relação ao controle nos dias 25 e 77. Juntos, esses resultados sugerem que a coinfeção influencia no aumento da frequência de células CD14⁺IL-10⁺ no baço mais tardiamente. Também foi verificado um aumento percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no dia 77 nos grupos coinfectados com as outras espécies de leishmânia (*L. braziliensis* e *L. major*).

- **Citocinas**

A quantificação de citocinas séricas demonstrou aumento dos níveis de citocinas dos tipos Th1 (IFN- γ e TNF), Th2 (IL-6) e reguladora (IL-10) na fase aguda da infecção (dias 5, 10 e 17) tanto no grupo dos camundongos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL quanto no grupo dos coinfectados, quando comparados aos controles (Tabela 5.3). Em ambos os grupos, coinfectado e monoinfectado com plasmódio, foi observado um aumento substancial dos níveis de IFN- γ no início da fase aguda (5^o dia) seguido de um decréscimo desses níveis. A concentração de IL-

17 no grupo coinfestado foi aproximadamente igual a do grupo controle, exceto no dia 77 no qual foi detectado aumento nos níveis séricos da citocina. Em relação ao grupo monoinfestado com *P. yoelii* 17XNL, os níveis séricos de IL-17 nos animais coinfestados eram mais baixos nos dias 10 e 17. Foi observado que os níveis séricos de IL-6 no grupo monoinfestado com *L. amazonensis* eram mais elevados que o do grupo controle.

A Tabela 5.3 resume as alterações nos níveis séricos das citocinas Th1, Th2, Th17 e reguladora nos grupos monoinfestados em relação ao grupo controle e entre o grupo coinfestado e os grupos controle e monoinfestados. As concentrações séricas das citocinas de cada grupo nos diferentes dias avaliados são apresentadas no Anexo 3.

Tabela 5.3: Alterações nos níveis séricos de citocinas observadas nos animais monoinfectados (em comparação com o grupo controle) e coinfectados (em comparação com os grupos controle e monoinfectados).

Citocinas	<i>P. yoelii</i> VS Controle					<i>L. amazonensis</i> VS Controle					<i>L. amazonensis + P. yoelii</i> VS Controle					<i>L. amazonensis + P. yoelii</i> VS <i>P. yoelii</i>					<i>L. amazonensis + P. yoelii</i> VS <i>L. amazonensis</i>				
	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77
IFN- γ	30,82 x	2,79 x	2,18 x		2,94 x						26,65 x	2,14 x									24,65 x	2,41 x			
TNF	7,72 x	3,41 x	4,90 x								6,7 x	3,54 x	3,89 x								9,37 x	3,48 x	3,13 x		
IL-2																									
IL-4					2,34 x																				
IL-6	5,51 x	2,91 x	8,07 x	2,29 x	10,19 x	2,91 x	2,03 x		2,25 x	4,22 x	2,69 x	13,37 x	2,18 x	5,24 x						2,81 x		6,6 x	3,62 x	2,33 x	
IL-17		2,28 x	3,97 x		4,24 x										2,6 x		2,17 x	3,68 x							2,42 x
IL-10	3,73 x	2,9 x	3,41 x	2,1 x							3,88 x	2,33 x	2,47 x								3,04 x	2,95 x			
Inalterado					Maior										Menor										

*Na tabela foram assinaladas as diferenças iguais ou superiores a 2x a concentração de citocina encontrada.

Resumo:

O aumento nos níveis séricos de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF), Th2 (IL-6) e reguladora (IL-10) indica que os dois tipos de respostas são induzidas e reguladas na infecção por *P. yoelii* 17XNL. No grupo coinfectado com *L. amazonensis* não foram verificados níveis mais baixos de IFN- γ , TNF e IL-6 em relação ao grupo monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL no dia 5, como aconteceu nas coinfeções por outras espécies de leishmânia (*L. braziliensis* e *L. major*).

Os níveis séricos de IL-17 também aumentam durante a infecção malárica, mas no grupo coinfectado a concentração dessa citocina é mais baixa do que na infecção exclusiva pelo plasmódio, em concordância com o que foi encontrado na coinfeção por *L. braziliensis* e *L. major*.

O grupo monoinfectado com *L. amazonensis* apresentou níveis de IL-6 mais elevados que o grupo controle.

A coinfeção humana por múltiplas espécies de parasitos na natureza é frequentemente observada e, recentemente, estudos epidemiológicos indicam que essa complexa interação representa um desafio na ecologia de parasitos e na saúde humana. No modelo murino, há evidências de que animais infectados concomitantemente com *L. mexicana amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL apresentam um aumento na severidade e susceptibilidade às duas infecções (210, 212). No entanto, a avaliação dos efeitos decorrentes da coinfeção com malária é limitada a poucos trabalhos.

O modelo experimental de infecção com *P. yoelii* 17XNL em camundongos BALB/c é caracterizado por infecções não-letais que cursam com aumento progressivo de parasitemia até, aproximadamente, o 12º dia de infecção. Em seguida, ocorre rápida diminuição e negatificação da parasitemia em torno do 20º dia (62). A resposta imune ao estágio eritrocítico da malária em camundongos é marcada pelo desenvolvimento de uma intensa resposta celular, tanto Th1 quanto Th2 (62). Ao mesmo tempo, a resposta pró-inflamatória precisa ser estritamente regulada a fim de prevenir o aparecimento de complicações imunomediadas. Nesse sentido, destaca-se o papel das células Tregs e das citocinas IL-10 e TGF- β (79, 86, 87, 88).

No nosso estudo verificamos, como esperado, que a infecção de camundongos BALB/c fêmeas com *P. yoelii* 17XNL causa uma infecção não-letal, que cursa com aumento de parasitemia até o dia 13 de infecção. Nos dias subsequentes, ocorre uma acentuada redução da parasitemia até a negatificação, por volta do 21º dia após infecção. Nesse período foi observada perda de massa corporal e hipotermia nos animais, em concordância com o que é relatado na literatura para este modelo (68). Nos animais coinfectados com *L. braziliensis* foi observado que os camundongos apresentavam parasitemias médias mais baixas nos dias próximos ao pico de parasitemia e que a recuperação clínica dos animais foi mais precoce em relação ao grupo infectado apenas com *P. yoelii* 17XNL. Já nas coinfeções com *L. major* e *L. amazonensis* os animais apresentaram taxas de mortalidade em torno de 28% e, no caso da coinfeção por *L. amazonensis* foi verificado, ainda, uma maior persistência

de parasitos na circulação sanguínea. Coleman e colaboradores, ao estudarem a infecção concomitante com *P. yoelii* 17XNL e *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6, mostrou um aumento de parasitemia do *P. yoelii* 17XNL quando *L. amazonensis* foi inoculada 2 dias, 3 semanas ou 12 semanas antes da inoculação do plasmódio (210). Resultados semelhantes foram obtidos pelo mesmo grupo utilizando, desta vez, uma linhagem de camundongo suscetível à leishmaniose (BALB/c). Foi observado nesse trabalho e confirmado no nosso, que a mortalidade dos animais aumenta durante a fase aguda da malária quando o inóculo do plasmódio é realizado poucos dias depois da infecção por leishmânia e que a negatificação da parasitemia ocorre mais tardiamente nos animais coinfectados quando comparado aos infectados apenas com *P. yoelii* 17XNL (212), sugerindo que a coinfeção com leishmânia, nessas condições, agravaria o curso da malária.

A infecção subcutânea com *L. major* em camundongos da linhagem BALB/c é o modelo mais bem estudado de doença crônica que envolve a ativação de células T CD4⁺ (213, 214), tendo sido o que primeiramente descreveu, na década de 80, a dicotomia de células CD4 Th1 e Th2. Atualmente, sabe-se que camundongos BALB/c são susceptíveis a infecção tanto por *L. major* quanto por *L. amazonensis* e desenvolvem resposta imune predominantemente do tipo Th2. No entanto, quando infectados com *L. braziliensis* desenvolvem doença autolimitada devido ao equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, de forma que a infecção subcutânea por *L. braziliensis* não resulta em infecção e apresenta apenas pequenos edemas que logo em seguida desaparecem. Em função das limitações da infecção subcutânea com *L. braziliensis* e da importância do estudo desta espécie que é a mais prevalente no território brasileiro, optamos pela infecção intradérmica na orelha. Esse modelo tem como vantagens o fato de ser mais semelhante à infecção natural e apresentar desfecho clínico nos animais semelhante ao observado nos seres humanos, principalmente em relação ao aparecimento de úlceras na lesão, persistência do parasito e resposta imune (162). Apesar do modelo de infecção intradérmica ter sido inicialmente desenvolvido e mais aplicado em infecções com *L. major* (161, 215, 216), atualmente ele também vem sendo utilizado em estudos com outras espécies de leishmânia, tais como *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, justamente por ser mais parecido com a infecção natural (162, 217). Após um rigoroso levantamento na literatura, e com o intuito de garantir que as infecções com as 3 diferentes espécies de leishmânias por nós utilizadas originassem lesões com evolução semelhante e

pudessem ser acompanhadas pelo mesmo período de tempo, utilizamos inóculos de *L. major* e *L. amazonensis* 10 vezes menores do que o inóculo de *L. braziliensis*.

As lesões dos animais coinfectedados com *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* demoraram mais para aparecer e apresentaram tamanho médio menor do que as lesões dos animais mono infectados, pelo menos nos primeiros 20 dias após infecção. Na coinfecção por *L. major* e *L. amazonensis* o aparecimento de úlceras também ocorreu mais tardiamente, sendo que na coinfecção por *L. major* o percentual de lesões ulceradas tendeu a ser menor até o final do período de acompanhamento dos animais, indicando que a infecção simultânea pelo plasmódio pode atrasar o desenvolvimento das lesões. No trabalho de Coleman de 1988, as lesões causadas por *L. amazonensis* se mostraram aumentadas nos camundongos concomitantemente infectados com *P. yoelii* 17XNL em comparação com camundongos infectados apenas com *L. amazonensis* (212).

A contradição existente entre os dois resultados pode, no entanto, ser explicada por diferenças na via e no número de parasitos de *Leishmania* inoculados. A mudança da via subcutânea para a via intradérmica induz um tipo de resposta imune celular diferente, já que na pele são encontradas células especializadas, tais como queratinócitos, células dendríticas dérmicas e células de Langerhans, que não estão presentes no tecido subcutâneo (125-127). Diversos trabalhos também apontam a mudança do tipo de resposta imune gerada em função do número de parasitos inoculados. Em estudos de infecção subcutânea com *L. major* em camundongos suscetíveis (BALB/c) foi observado que doses pequenas do parasito determinam uma resposta predominantemente Th1 que converte o fenótipo de suscetibilidade ao de resistência (218-220). Já no modelo de infecção intradérmica com inóculos de baixa concentração de parasitos (10-1000 por inóculo) de *L. major* ou *L. amazonensis* foram detectadas tanto citocinas Th1 (IFN- γ) quanto citocinas Th2 (IL-4, IL-13 e IL-10) no baço e linfonodo de drenagem dos animais que apresentaram sinais clínicos de infecção (217), mostrando que existem diferenças em relação ao tipo de resposta imune induzida de acordo com a via e o número de parasitos inoculados.

Estudos no modelo de malária murina e em humanos indicam que as citocinas junto com as células T, células NK e macrófagos contribuem tanto para o controle da infecção malárica quanto para a persistência e aumento da parasitemia. O equilíbrio

entre as citocinas Th1 e Th2 parece ser crucial no controle dos sintomas clínicos da doença, livrando o hospedeiro do desenvolvimento dos quadros graves ou moderados da infecção.

A avaliação da resposta imune dos animais mono infectados com *P. yoelii* 17XNL e co infectados mostrou haver uma redução importante no percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ no baço dos animais, aparentemente relacionada com os níveis de parasitemia. Estudos em diferentes modelos murinos para a malária verificaram que a redução no percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ se deve a apoptose dessas células (221-223). Uma possível explicação para esse fenômeno é que antígenos liberados pelo parasito possam induzir a apoptose dos esplenócitos (224). O aumento da apoptose de linfócitos é um fenômeno encontrado em uma série de infecções como, por exemplo, em citomegalovírus, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* e *Mycobacterium avium* (221), e pode ser considerado um mecanismo de escape do parasito ou de regulação da resposta imune pelo hospedeiro (225, 226).

Apesar da redução no percentual de células CD4⁺ observado na fase aguda da infecção malárica, o percentual de células produtoras de IFN- γ aumenta nos grupos mono e co infectados por *P. yoelii* 17XNL. O aumento no percentual dessas células já foi demonstrado em diferentes modelos murinos experimentais e está relacionado aos níveis de parasitemia e com o desenvolvimento de uma resposta que controla a replicação do parasito na fase aguda da infecção (81, 227-229). Também foi observado um aumento no percentual de células CD4⁺IL-4⁺ nos grupos mono e co infectados com o plasmódio murino na fase aguda da infecção malárica em relação ao grupo controle em concordância com o que é relatado nas infecções maláricas murinas de outros trabalhos (227, 229). Contudo, o aumento percentual observado no grupo co infectado com *L. major* foi menor do que o observado na infecção apenas com *P. yoelii* 17XNL e nas co infecções com as outras espécies de leishmânia (*L. braziliensis* e *L. amazonensis*).

Além do aumento no percentual de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-4 nos animais co infectados, observamos um aumento da frequência de células CD4⁺IL-10⁺ no baço dos animais co infectados, principalmente com *L. braziliensis* ou *L. major*, em relação aos grupos controle e mono infectados com plasmódio ou leishmânia. O aumento percentual de células CD4⁺IL-10⁺ no baço de camundongos durante a

infecção malárica já foi mostrado em infecções por *P. chabaudi* AS (230). Nesse trabalho, foi verificado que no dia 5 de infecção a população de células CD4⁺ correspondia a cerca de 50% do total de células secretoras de IL-10 no baço (dentre as células CD4⁺, CD8⁺, B, NK e NKT avaliadas) e que nos dias 15, 20 e 30 após a infecção, esse percentual aumentava para 70% (230), ressaltando a importância dessas células como as principais produtoras de IL-10 nesse órgão. Sabe-se, no entanto, que diferentes populações de células T CD4⁺ (Th1, Th2 e Th17) assim como células Tregs naturais e adaptativas (Tr1) são capazes de produzir IL-10 (231-234). Na infecção com *P. chabaudi* AS a população de células CD4⁺ produtora de IL-10⁺ foi caracterizada como uma população de células predominantemente Th1, pois também eram IFN- γ ⁺. No nosso estudo, em nenhum dos grupos (monoinfectados ou coinfectados) foi verificada a presença de células triplo positivas CD4⁺IL-10⁺IFN- γ ⁺ ou CD4⁺IL-10⁺IL-4⁺, indicando que a população celular de células CD4⁺IL-10⁺ que encontramos com maior frequência nos grupos dos animais coinfectados não era do tipo Th1 e nem do tipo Th2 (dados não apresentados).

No modelo de infecção de camundongos C57BL/6 com *P. yoelii* 17XNL e 17XL, Couper e colaboradores verificaram que a produção de IL-10 por células Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) não influenciava significativamente no curso da infecção com a cepa letal de *P. yoelii*. Ao contrário, foi constatado que células CD4⁺ produtoras de IL-10 que são CD25⁻, Foxp3⁻, CD127⁻ e que não produzem citocinas Th1, Th2 ou Th17, geradas durante a infecção com cepas letais e não-letal de *P. yoelii* é que estavam associadas à diminuição da resposta pró-inflamatória (234). Essas células T CD4⁺ produtoras de IL-10 induzidas pela infecção com *P. yoelii* 17XNL ou 17XL caracterizadas no trabalho de Couper se enquadravam na definição de células Tregs adaptativas ou Tr1 (234, 235).

No nosso estudo, durante a infecção malárica os animais coinfectados com *L. braziliensis* ou *L. major* apresentaram um aumento significativo no percentual de células CD4⁺IL-10⁺, que não são Th1 e nem Th2. Ao mesmo tempo, foram observados níveis séricos das citocinas IFN- γ , TNF e IL-6 mais baixos em comparação com a infecção exclusiva pelo plasmódio murino, sugerindo um papel importante dessas células na regulação da resposta pró-inflamatória nesses grupos. Já na coinfecção por *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL não foi observado aumento importante nos percentuais de células CD4⁺IL-10⁺, assim como na monoinfecção com *P. yoelii* 17XNL. Da mesma forma, os níveis de citocinas pró-inflamatórias no

grupo coinfectado com *L. amazonensis* foram semelhantes aos encontrados na infecção exclusiva pelo plasmódio, indicando que quando o percentual de células CD4⁺IL-10⁺ não é alterado os níveis de citocinas pró-inflamatórias também não se modificam. Ao avaliar a população de células Tregs verificamos que a frequência dessas células aumentava durante a infecção malárica nos grupos mono e coinfectados de forma semelhante, indicando que essas células provavelmente não estão envolvidas na redução dos níveis séricos de IFN- γ , TNF e IL-6 observados nos grupos coinfectados por *P. yoelii* e *L. braziliensis* ou *L. major*. De certa forma, os resultados obtidos no presente estudo concordam com aqueles encontrados por Couper e colaboradores, já que também no nosso estudo as células Tregs naturais aparentemente não estão influenciando nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, mas é possível que a população de células CD4⁺IL-10⁺ encontradas com maior frequência no grupo coinfectados por *P. yoelii* e *L. braziliensis* ou *L. major* esteja contribuindo para a redução dos níveis dessas citocinas. No entanto, é preciso avaliar se essas células CD4⁺IL-10⁺ são células Tr1.

Apesar da importância das células Tregs produtoras de IL-10 no controle de imunopatologias durante a infecção malárica ter sido questionado recentemente (234), o papel dessas células como moduladoras da resposta pró-inflamatória não pode ser negado. Em estudos com modelo de malária cerebral foi observado que a expansão do número de células Tregs exerce um papel protetor evitando o desenvolvimento dessa patologia por um mecanismo celular dependente de CTLA-4 (proteína 4 associada a citotoxicidade de linfócitos T) ao invés de IL-10 (236). A cinética das células Tregs foi bastante estudada em infecções com *P. yoelii* 17XNL e XL sendo observado que ocorre um aumento transiente no percentual dessas células durante o início da infecção malárica, mas em infecções letais esse aumento pode perdurar por mais tempo (237). Em infecções com *P. chabaudi* foi visto que as células Tregs naturais se localizam preferencialmente no baço e não no linfonodo ou sangue, ressaltando a importância desse órgão na resposta imune durante a fase eritrocítica da doença (58). Como a malária, outras infecções como: HIV, *M. tuberculosis*, helmintos e leishmânia podem aumentar o número de células Tregs (237). No que diz respeito a infecção por *Plasmodium* ou *Leishmania* foi observado que ambos os parasitos podem ativar a produção de TGF- β (238, 239). Como o TGF- β é uma molécula que estimula a diferenciação das células Tregs (237), é possível que a coinfeção por esses dois parasitos contribua para o aumento da

frequência de células Tregs. De fato, observamos em nosso estudo um aumento no percentual de células Tregs durante a infecção malárica nos grupos mono e coinfectedados com *Leishmania* em relação ao controle, porém nos grupos coinfectedados esse aumento foi maior do que o do grupo infectado apenas com *P. yoelii* 17XNL somente no dia 10 de infecção. Nos grupos monoinfectedados com *Leishmania* sp. o aumento na frequência de células Tregs em relação ao controle foi observado em alguns dias apenas.

Embora a depleção de células T CD25⁺ seja bastante utilizada no estudo das células Tregs durante a infecção malárica experimental, sabe-se que esta estratégia é insuficiente para compreender o real papel dessas células, já que algumas células Tregs são CD25⁻ e células T ativadas e efectoras também expressam essa molécula (240). Ao avaliarmos o percentual de células CD4⁺CD25⁺ percebemos que houve um aumento na frequência dessas células durante a fase aguda da malária nos grupos monoinfectedados com plasmódio e coinfectedados. Esse aumento pode estar relacionado com a ativação dessas células no baço devido ao aumento da parasitemia. De forma semelhante, Lepenies e colaboradores verificaram um aumento percentual de células CD4⁺CD25⁺ no baço de camundongos da linhagem BALB/c no sexto dia após infecção com *P. yoelii* 17XNL (241). Na linhagem C57BL/6 o mesmo foi observado em infecções com a cepa letal (17XL) e não-letal (17XNL) de *P. yoelii* (242). Na infecção exclusiva por *Leishmania* sp. não foi notado um aumento expressivo no percentual dessas células no baço. Isso pode ser explicado pelo fato da leishmaniose causada por *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis* determinar uma lesão cutânea localizada ao invés de uma infecção sistêmica como a malária.

O papel das células T CD8⁺ na imunidade a malária durante a fase eritrocítica foi bastante questionado por causa da inexistência de moléculas de MHC de classe I na superfície dos eritrócitos parasitados. No entanto, foi demonstrado no modelo murino, que durante a fase eritrocítica da infecção células CD8⁺ específicas são geradas após apresentação cruzada por células dendríticas (243). No nosso estudo, foi verificado que, apesar da redução no percentual de células CD8⁺ no baço durante a infecção malárica, ocorreu um aumento no percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ nos grupos monoinfectedados com plasmódio e coinfectedados com *Leishmania* sp.. O aumento no percentual de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ na malária já foi demonstrado em trabalhos anteriores nas infecções experimentais com *P. chabaudi* e com *P. yoelii* 17XL (244, 245). Essas células aparentemente exercem um papel

importante na imunidade a malária durante a fase eritrocítica através da ativação de macrófagos, via liberação de IFN- γ , levando-os a fagocitar eritrócitos infectados (245). O aumento no percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ também pode estar contribuindo no controle do desenvolvimento das lesões cutâneas de *Leishmania* sp. nos animais dos grupos coinfectados, já que essas lesões apresentaram tamanho médio menor do que as lesões dos animais monoinfectados, pelo menos durante o período de infecção malárica. Possivelmente, o aumento percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ observado nos camundongos coinfectados, e que foi na maioria das vezes superior ao aumento do grupo monoinfectado com plasmódio ou leishmânia, contribui para a ativação clássica de macrófagos. Macrófagos ativados pela via clássica (M1), ou seja, por IFN- γ apresentam um aumento da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) com produção de NO e radicais reativos de oxigênio, o que os tornam mais eficientes no controle da infecção por *Leishmania* sp.. Considerando que os macrófagos são células que estão em constante circulação, é possível que alguns desses macrófagos M1 cheguem até o local da lesão e controlem mais eficientemente a replicação de *Leishmania* sp.. Com efeito, observamos uma carga parasitária menor nas lesões dos camundongos coinfectados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL nos dias 10, 17 e 25 e nos dias 10 e 17 nas coinfeções por *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente, em comparação com as monoinfecções.

Além do aumento percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ também observamos aumento no percentual de células CD8⁺IL-4⁺ em todos os grupos coinfectados. Esse aumento aparentemente acompanhou o aumento provocado pela infecção exclusiva por *P. yoelii* 17XNL durante a infecção malárica, já que não foram encontrados aumentos tão expressivos durante a infecção exclusiva por *Leishmania* sp.. O aumento concomitante no percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ e CD8⁺IL-4⁺ poderia estar contribuindo para o equilíbrio entre as respostas citotóxica do tipo 1 e 2 (Tc1 e Tc2). Nos camundongos monoinfectados com *P. yoelii* 17XNL também foi observado um aumento transiente (dia 10) na frequência de células CD8⁺IL-10⁺. Resultado similar foi obtido em um trabalho com *P. chabaudi* AS, no qual foi verificado um aumento na expressão de RNAm de IL-10 em células CD8⁺ do baço de camundongos da linhagem CBA/Ca 11 dias após infecção com o plasmódio (244). O aumento no percentual de células CD8⁺IL-10⁺ na malária pode estar relacionado a um mecanismo de controle da inflamação e do dano tecidual no baço. Em infecções com vírus foi demonstrado um aumento transiente no percentual de

células CD8⁺ produtoras de IL-10 que limitam o desenvolvimento de imunopatologias sem interferir no processo de eliminação viral. Além disso, comparadas às células IL-10⁻ as células CD8⁺IL-10⁺ apresentaram maior potencial citotóxico com produção igual ou superior de IFN- γ , granzima B e TNF- α (246).

Na monoinfecção com *L. amazonensis* foi observado um aumento no percentual de células CD8⁺IL-10⁺ no início da infecção. De fato, em experimentos *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis, não infectados com *Leishmania* sp., foi observado uma produção inicial elevada de IL-10 mediante o estímulo com promastigotas viáveis de *L. amazonensis*. A concentração de IL-10 no sobrenadante celular foi, inclusive, superior a concentração de IFN- γ após 24, 48 e 120 horas de cultivo (247), indicando que uma resposta voltada para a produção de IL-10 é induzida precocemente na infecção por *L. amazonensis*. Contudo, neste trabalho os autores não definiram qual a população de células que seria responsável pela produção de IL-10. Em nosso estudo, no grupo coinfestado com *P. yoelii* 17XNL e *L. amazonensis* foi observado um aumento no percentual de células CD8⁺IL-10⁺ no início da infecção, provavelmente em função da infecção por *L. amazonensis*. No entanto, nos 3 grupos coinfestados foi observado um aumento no percentual de células CD8⁺ produtoras de IL-10 no dia 77, indicando que a coinfeção induz o aumento dessa população celular. Vale ressaltar que as células CD8⁺IL10⁺ detectadas em nosso estudo eram produtoras exclusivas dessa citocina, não tendo sido observada produção simultânea de IFN- γ e/ou IL-4 por esta população celular (dados não mostrados). Uma possível explicação para esse fenômeno seria a indução de uma população de células CD8⁺ reguladoras mediante a intensa resposta inflamatória inicial à infecção malárica somada ao estímulo prolongado com antígenos de *Leishmania*, já que essas células foram encontradas em todos os grupos coinfestados e em nenhum grupo monoinfectado no dia 77. A IL-10 produzida por essas células poderia ter função importante no desenvolvimento da lesão cutânea da leishmaniose, limitando o dano tecidual, mas contribuindo para a persistência do parasito e para o desenvolvimento de uma resposta celular de memória (248).

Finalmente, observamos um aumento percentual de células CD14⁺IL-10⁺ nos grupos monoinfectados com *Leishmania* principalmente no dia 77. A molécula CD14 é expressa preferencialmente em macrófagos, mas também é encontrada em monócitos e granulócitos. Na leishmaniose já foi verificada uma produção de IL-10

aumentada em macrófagos infectados com *L. amazonensis* em função da indução de fatores de transcrição celular pelo parasito. No entanto, isso só foi possível quando a infecção pelas amastigotas era combinada com estímulos inflamatórios tais como a ligação do parasito opsonizado aos receptores de fração Fc presentes na superfície do macrófago (249). Outros estímulos inflamatórios importantes para a indução da produção de IL-10 seriam fragmentos de ácido hialurônico da matriz extracelular, liberação de proteínas de choque térmico após ruptura de macrófagos infectados e infecções bacterianas secundárias nas lesões (249). O tempo necessário para o estabelecimento e desenvolvimento das lesões e o fato de realizarmos a imunofenotipagem de macrófagos do baço explica o motivo pelo qual as células CD14⁺IL-10⁺ só foram encontradas mais tardiamente nos animais monoinfectados com *Leishmania*. Fato interessante e que precisa ser investigado é que nos animais coinfectados o percentual de células CD14⁺IL-10⁺ no dia 77 foi consideravelmente maior do que o percentual dessas células no grupo monoinfectado, independentemente da espécie de leishmânia envolvida.

De maneira geral, este trabalho contribuiu para mostrar que as coinfeções por *P. yoelii* 17 XNL e *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* induzem alterações na resposta imune e na evolução da malária e das leishmanioses nos camundongos BALB/c, de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida. Contudo, diversas questões continuam em aberto. A aparente polarização para um perfil de resposta mais regulador, com aumento percentual de diferentes populações celulares produzindo IL-10 nas coinfeções, por exemplo, é intrigante e ressalta a necessidade do estudo mais aprofundado deste tema.

Com base em nossos resultados podemos inferir que as coinfeções por *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* induzem alterações na resposta imune e na evolução da malária e das leishmanioses nos camundongos BALB/c, de acordo com a espécie de *Leishmania* coinfectante.

Como conclusões pontuais têm se que:

1) A coinfeção com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL parece ter um efeito benéfico à malária (redução dos níveis de parasitemia e do período patente), mas não à leishmaniose. Apesar, das lesões e ulcerações ocorrerem mais tardiamente nos camundongos coinfectados, essas se equiparam aos dos monoinfectados com *L. braziliensis* no decorrer da infecção. Esse fenômeno possivelmente está associado à resposta imune gerada na fase aguda da infecção malárica.

2) A coinfeção com *P. yoelii* 17XNL parece ter um efeito benéfico às infecções por *L. major* e *L. amazonensis*, visto que, em ambas foi observada redução de pelo menos dois dos três parâmetros parasitológicos ou de evolução da doença avaliados (carga parasitária, tamanho e ulceração das lesões) durante a fase aguda da infecção malárica, provavelmente associada à resposta imune gerada nesse período.

3) As coinfeções com *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* não interferem no perfil do percentual das células CD4⁺ e CD8⁺ na fase aguda da infecção malárica, que é caracterizada por uma intensa diminuição no percentual dessas populações nos baços dos camundongos BALB/c com malária.

4) A coinfeção com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL induz perfis distintos nos percentuais de células produtoras de IL-10 no baço dos camundongos. Apenas na coinfeção, há aumentos expressivos nos percentuais de células CD4⁺IL10⁺, que coincidem com a fase aguda da infecção malárica, e das células CD14⁺IL-10⁺ e CD8⁺IL-10⁺ após o período patente dessa infecção. Fenômeno, semelhante foi

observado também nas coinfeções por *L. major* e *L. amazonensis*, porém com variações interespecies.

5) Perfis distintos entre os percentuais das células CD4⁺IL-10⁺ nos baços dos camundongos coinfectados com *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* na fase aguda da infecção malárica, sugerem que essa população de células contribua para o controle e a eliminação do plasmódio nas coinfeções. Visto que, as variações interespecies em relação à intensidade do aumento e do tempo de manutenção dos altos percentuais das células CD4⁺IL-10, durante a fase aguda da infecção malárica, coincidem com as variações observadas na sobrevida e no controle da infecção malárica (níveis de parasitemia e período patente) nos camundongos coinfectados com as diferentes espécies de *Leishmania*.

6) Os aumentos dos percentuais de células CD8⁺IL-10⁺ e CD14⁺IL-10⁺ observados apenas na fase tardia das coinfeções, podem estar associados aos mecanismos homeostáticos da resposta imune que limitam a evolução das lesões e ulcerações cutâneas nos camundongos. Estudos complementares e com maior período de acompanhamento do curso das coinfeções por *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* serão necessários para melhor elucidação desse fenômeno.

7) As coinfeções com *L. braziliensis*, *L. major* ou *L. amazonensis* não interferem no perfil do percentual das células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no baço dos camundongos na fase aguda da infecção malárica, sugerindo que a infecção plasmodial seja responsável pelo aumento transitório dessa população celular.

8) A coinfeção com *L. amazonensis* não interfere no perfil de citocinas séricas Th1 (IFN- γ e TNF), Th2 (IL-6) e IL-10 característico da infecção por *P. yoelii* 17XNL. Já nas coinfeções com *L. braziliensis* e *L. major* os níveis de IFN- γ , TNF e IL-6 se apresentam mais baixos no início da infecção malárica, sugerindo que ambas as espécies de *Leishmania* estejam modulando tanto a resposta Th1 quanto a Th2 nesse período da infecção malárica.

- 1- Rey L. Parasitologia. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Os plasmódios e a malária: os parasitos; p. 207-209.
- 2- Manguin S, Carnevale P, Mouchet J. Biodiversity of Malaria in the World. Mountrouge: John Libbey Eurotext; 2008. Parasites and Vectors; p. 12. Disponível em:
http://books.google.com.br/books/about/Biodiversity_of_Malaria_in_the_World.html?id=hSUfzyxZRuWC&redir_esc=y
- 3- Kantele A, Jokiranta TS. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis. 2011 Jun;52(11):1356-62.
- 4- Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? Braz J Infect Dis. 2010 May-Jun;14(3):299-309.
- 5- Garcia LS. Malaria. Clin Lab Med. 2010 Mar;30(1):93-129.
- 6- Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jun;5(6):e1160.
- 7- Picot S, Bienvenu AL. [*Plasmodium vivax* infection: not so benign]. Med Sci (Paris). 2009 Jun-Jul;25(6-7):622-6.
- 8- Killeen GF, Fillinger U, Kiche I, Gouagna LC, Knols BG. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? Lancet Infect Dis. 2002 Oct;2(10):618-27.
- 9- Hiwat H, Bretas G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. Parasit Vectors. 2011 Sep 16;4:177.
- 10- Marrelli MT, Malafronte RS, Sallum MA, Natal D. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. Malar J. 2007 Sep 19;6:127.
- 11- World Health Organization. World Malaria Report 2011: Briefing on Revised Estimates of Cases and Deaths. Disponível em:
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/burdenestimatesbriefing2011.pdf
- 12- World Health Organization. 10 Facts on Malaria. Disponível em:
http://www.who.int/features/factfiles/malaria/malaria_facts/en/index.html. Acesso em 06 de janeiro de 2012.
- 13- World Health Organization. World Malaria Report 2011.
- 14- SIVEP-MALARIA, Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Secretária de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Disponível em:
<http://www.webcitation.org/getfile?fileid=37cb614143090770979ba9a8d3325a00e3fd5204>. Acesso em 28 de março de 2012.

- 15- Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Set/05/jarbas_malaria_050911.pdf. Acesso em 23 de janeiro de 2012.
- 16- Portal da Saúde. Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526. Acesso em 16 de março de 2012.
- 17- CIVES, Centro de Informação em Saúde para Viajantes. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/malaria/mal-iv.html>. Acesso em 15 de março de 2012.
- 18- Ministério da Saúde. Aspectos epidemiológicos. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31086&janela=2. Acesso em 06 de janeiro de 2012.
- 19- FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Malária, PNCM, Brasília: Ministério da Saúde, 2003.
- 20- Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. *C R Biol*. 2006 Nov;329(11):858-62.
- 21- Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, Ménard R. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc*. 2007;2(7):1705-12.
- 22- Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18640-5.
- 23- Meyer KC, Klatte JE, Dinh HV, Harries MJ, Reithmayer K, Meyer W, Sinclair R, Paus R. Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. *Br J Dermatol*. 2008 Nov;159(5):1077-85.
- 24- Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol*. 2004 Jan;2(1):E4.
- 25- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig V, Rodríguez A. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 2001 Jan 5; 291: 141–144.
- 26- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1; 313(5791):1287-90.
- 27- Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res*. 2011 Jan;108(1):247-52.
- 28- Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79 (1):1-11.
- 29- Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):755-66.

- 30- Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U: Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog* 2007, 3:e171.
- 31- Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today*. 2000 May;16(5):196-201.
- 32- Medica DL, Sinnis P. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):4363-9.
- 33- Frischknecht F, Baldacci P, Martin B, Zimmer C, Thiberge S, Olivo-Marin JC, Shorte SL, Ménard R. Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol*. 2004 Jul;6(7):687-94.
- 34- Rosenberg R, Wirtz RA, Schneider I, Burge R. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990 Mar-Apr;84(2):209-12.
- 35- Sturm A, Heussler V. Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol*. 2007 Sep;196(3):127-33.
- 36- Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan;22(1):13-36, Table of Contents.
- 37- McGregor IA, Wilson RJM. 1988. Specific immunity: acquired in man, p. 559-619. *In* Wernsdorfer W H & McGregor I (ed.), *Malaria. Principles and practice of malariology*, vol. 1. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom.
- 38- Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*. 2008 Jul;9(7):725-32.
- 39- Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK, Lowe B, Mwangi T, Bull PC, Thomas AW, Cavanagh DR, McBride JS, Lanar DE, Mackinnon MJ, Conway DJ, Marsh K. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun*. 2008 May;76(5):2240-8.
- 40- Stanistic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, Gilson PR, Murphy VJ, Anders RF, Mueller I, Beeson JG. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009 Mar;77(3):1165-74.
- 41- Polley SD, Conway DJ, Cavanagh DR, McBride JS, Lowe BS, Williams TN, Mwangi TW, Marsh K. High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine*. 2006 May 8;24(19):4233-46.
- 42- McGregor IA. The passive transfer of human malarial immunity. *Am J Trop Med Hyg*. 1964 Jan;13: suppl 237-9.
- 43- Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Parasitologic and

clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Sep;45(3):297-308.

44- Druilhe P, Khusmith S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. *Infect Immun.* 1987 Apr;55(4):888-91.

45- Jafarshad A, Dziegiel MH, Lundquist R, Nielsen LK, Singh S, Druilhe PL. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγR2 and FcγR3. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):3099-106.

46- Druilhe P, Pérignon JL. Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans. *Immunol Lett.* 1994 Jul;41(2-3):115-20.

47- Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1633-41.

48- Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med.* 1995 Aug 1;182(2):409-18.

49- Soe S, Singh S, Camus D, Horii T, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* serine repeat protein, a new target of monocyte-dependent antibody-mediated parasite killing. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):7182-4.

50- Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye KS, Druilhe P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect Immun.* 2004 Jan;72(1):247-52.

51- Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, Anderson K, Mahakunkijcharoen Y, Martin LB, Wilson D, Elliott S, Eisen DP, Weinberg JB, Saul A, Good MF. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet.* 2002 Aug 24;360(9333):610-7.

52- Ing R, Stevenson MM. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. *Infect Immun.* 2009 Feb;77(2):770-82.

53- Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):297-316.

54- Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol.* 2011 Oct;27(10):442-9.

55- Omer FM, Kurtzhals JA, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-β? *Parasitol Today.* 2000 Jan;16(1):18-23.

56- Niikura M, Inoue S, Kobayashi F. Role of interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:383962.

- 57- Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, Lawrence E, Ngwa-Amambua A, Jayasooriya S, Cheeseman IH, Gomez-Escobar N, Okebe J, Conway DJ, Riley EM. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog*. 2009 Apr;5(4):e1000364.
- 58- Berretta F, St-Pierre J, Piccirillo CA, Stevenson MM. IL-2 contributes to maintaining a balance between CD4+Foxp3+ regulatory T cells and effector CD4+ T cells required for immune control of blood-stage malaria infection. *J Immunol*. 2011 Apr 15;186(8):4862-71.
- 59- Cambos M, Bélanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T. Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi adami* infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol*. 2008 Feb;38(2):229-38.
- 60- Douradinha B, Doolan DL. Harnessing immune responses against *Plasmodium* for rational vaccine design. *Trends Parasitol*. 2011 Jun;27(6):274-83. Epub 2011 Apr 30. Review.
- 61- Laurent Rénia, Elodie Belnoue, Irène Landau. Mouse Models for Pre-Erythrocytic-Stage Malaria. In: Doolan DL. *Malaria Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press; 2002. p. 41-42.
- 62- Latifu A. Sanni, Luis F. Fonseca, Jean Langhorne. Mouse Models for Erythrocytic-Stage Malaria. In: Doolan DL. *Malaria Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press; 2002. p. 57-66.
- 63- Vincke, I. H. and Lips, M. Un nouveau *Plasmodium* d'un rongeur sauvage du Congo, *Plasmodium berghei* n. sp. *Ann Soc belge Méd Trop*. 1948, 28: 197-204.
- 64- Rodhain, J. *Plasmodium vinckei* n. sp. Un deuxième *Plasmodium* de parasite de rongeurs sauvages au Katanga. *Ann Soc belg Med. Trop*. 1952, 32: 275-79.
- 65- Landau, I. Description de *Plasmodium chabaudi* n. sp. Parasite de rongeurs africains. *C R Acad Sci Paris*. 1965, 260: 3758-61.
- 66- Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol*. 2011 Nov 17. [Epub ahead of print].
- 67- Li C, Seixas E, Langhorne J. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol*. 2001 Apr;189(3):115-26.
- 68- Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med*. 2006 Mar 23;8(6):1-22.
- 69- Chandele A, Mukerjee P, Das G, Ahmed R, Chauhan VS. Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. *Immunology*. 2011 Feb;132(2):273-86.
- 70- Stevenson MM, Tam MF. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol*. 1993 Apr;92(1):77-83.

- 71- Li J, Pattaradilokrat S, Zhu F, Jiang H, Liu S, Hong L, Fu Y, Koo L, Xu W, Pan W, Carlton JM, Kaneko O, Carter R, Wootton JC, Su XZ. Linkage maps from multiple genetic crosses and loci linked to growth-related virulent phenotype in *Plasmodium yoelii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):E374-82.
- 72- Taylor-Robinson AW. Regulation of immunity to *Plasmodium*: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design. *Exp Parasitol*. 2010 Nov;126(3):406-14.
- 73- Zheng W, Wang QH, Feng H, Liu J, Meng HR, Cao YM. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells prevent the development of Th1 immune response by inhibition of dendritic cell function during the early stage of *Plasmodium yoelii* infection in susceptible BALB/c mice. *Folia Parasitol (Praha)*. 2009 Dec;56(4):242-50.
- 74- Chen G, Liu J, Wang QH, Wu Y, Feng H, Zheng W, Guo SY, Li DM, Wang JC, Cao YM. Effects of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+)regulatory T cells on early *Plasmodium yoelii* 17XL infection in BALB/c mice. *Parasitology*. 2009 Sep;136(10):1107-20.
- 75- Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, Flavell RA, de Souza JB, Riley EM. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog*. 2008 Feb 29;4(2):e1000004.
- 76- Stevenson MM, Tam MF, Belosevic M, van der Meide PH, Podoba JE. Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun*. 1990 Oct;58(10):3225-32.
- 77- Su Z, Stevenson MM. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun*. 2000 Aug;68(8):4399-406.
- 78- Kobayashi F, Ishida H, Matsui T, Tsuji M. Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN-gamma monoclonal antibody on the host defense mechanism against *Plasmodium yoelii yoelii* infection. *J Vet Med Sci*. 2000 Jun;62(6):583-7.
- 79- Bakir HY, Tomiyama C, Abo T. Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Biomed Res*. 2011 Jun;32(3):203-8.
- 80- Sam H, Stevenson MM. In vivo IL-12 production and IL-12 receptors beta1 and beta2 mRNA expression in the spleen are differentially up-regulated in resistant B6 and susceptible A/J mice during early blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria. *J Immunol*. 1999 Feb 1;162(3):1582-9.
- 81- Muxel SM, Freitas do Rosário AP, Zago CA, Castillo-Méndez SI, Sardinha LR, Rodriguez-Málaga SM, Câmara NO, Álvarez JM, Lima MR. The spleen CD4+ T cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties. *PLoS One*. 2011;6(7):e22434.
- 82- Taylor-Robinson AW, Phillips RS. B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect Immun*. 1994 Jun;62(6):2490-8.
- 83- Smith EC, Taylor-Robinson AW. Parasite-specific immunoglobulin isotypes during lethal and non-lethal murine malaria infections. *Parasitol Res*. 2003 Jan;89(1):26-33.

- 84- Coffman RL, Savelkoul HF, Lebman DA. Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. *Semin Immunol*. 1989 Sep;1(1):55-63.
- 85- Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF Jr, Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:303-33.
- 86- Niikura M, Inoue S, Kobayashi F. Role of interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:383962.
- 87- Kobayashi F, Morii T, Matsui T, Fujino T, Watanabe Y, Weidanz WP, Tsuji M. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parasitol Res*. 1996;82(5):385-91.
- 88- Omer FM, Kurtzhals JA, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? *Parasitol Today*. 2000 Jan;16(1):18-23.
- 89- Omer FM, de Souza JB, Riley EM. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii yoelii* infections. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):5430-6.
- 90- Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):4850-6.
- 91- Omer FM, Riley EM. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J Exp Med*. 1998 Jul 6;188(1):39-48.
- 92- World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso: 25 de janeiro de 2012.
- 93- Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*. 2008 Dec;45(4):255-72.
- 94- Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol*. 2006 Jul;24(3):165-70.
- 95- Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*. 2002 Mar 30;359(9312):1124-5.
- 96- Zinchuk A, Nadruga A. Congenital visceral leishmaniasis in Ukraine: case report. *Ann Trop Paediatr*. 2010;30(2):161-4.
- 97- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001 May-Jun;95(3):239-43.
- 98- Rey L. *Parasitologia*. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. O Complexo "Leishmania donovani" e a Leishmaníase Visceral; p. 397-400

- 99- Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Dec;41(6):687-725.
- 100- Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Jul 11;9(8):604-15.
- 101- Bañuls AL, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Oct;17(10):1451-61.
- 102- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2 ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde; 2007.
- 103- Guerra JA, Coelho LI, Pereira FR, Siqueira AM, Ribeiro RL, Almeida TM, Lacerda MV, Barbosa MG, Talhari S. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Sep;85(3):524-7.
- 104- Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol.* 2009 Feb;160(2):311-8.
- 105- Portal da Saúde. Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31319. Acesso em: 21 de março de 2012.
- 106- Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, Zentella A, Becker I. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Nov 2;4(11):e871.
- 107- Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 2007 Feb;46(2):132-42.
- 108- World Health Organization. Burden of disease. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 27 de janeiro de 2012.
- 109- Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>. Acesso em: 28 de janeiro de 2012.
- 110- Domínguez M, Moreno I, Aizpurua C, Toraño A. Early mechanisms of Leishmania infection in human blood. *Microbes Infect.* 2003 May;5(6):507-13.
- 111- Basu MK, Ray M. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol.* 2005;31(3):145-54.
- 112- Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des.* 2002;8(4):297-318.
- 113- McConville MJ, Naderer T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:543-61.

- 114- Bates PA. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Aug;11(4):340-4. Epub 2008 Jul 25.
- 115- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006 Sep;22(9):439-45.
- 116- Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007 Aug;37(10):1097-106.
- 117- Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet.* 2006 Apr;7(4):294-305.
- 118- Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med.* 1996 Feb 1;183(2):515-26
- 119- Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells. *Eur J Immunol.* 1998 Apr;28(4):1389-400.
- 120- Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol.* 2007 Mar-Apr;17(2):115-22.
- 121- Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):286-96.
- 122- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J Immunol.* 2004 Dec 1;173(11):6521-5.
- 123- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008 Aug 15;321(5891):970-4. Erratum in: *Science.* 2008 Dec 12;322(5908):1634.
- 124- Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection. *J Immunol.* 2009 Dec 15;183(12):8088-98.
- 125- León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity.* 2007 Apr;26(4):519-31.
- 126- Ritter U, Osterloh A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2007 Mar;196(1):51-9.
- 127- Ritter U, Meissner A, Scheidig C, Körner H. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 2004 Jun;34(6):1542-50.
- 128- Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von Stebut E, Weiss JM, Münck NA, Viemann D, Varga G, Müller-Tidow C, Schuberth HJ, Roth J, Sunderkötter C.

Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 29;6(4):e1000871.

129- Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discov Today.* 2004; 1: 81-86.

130- von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* 1998;188:1547-52.

131- Sypek JP, et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 1993;177:1797–1802.

132- Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8427-32.

133- Prajeeth CK, Haeblerlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infect Immun.* 2011 Jul;79(7):2699-708.

134- Bihl F, Pecher J, Bréart B, Poupon G, Cazareth J, Julia V, Glaichenhaus N, Braud VM. Primed antigen-specific CD4+ T cells are required for NK cell activation in vivo upon *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2010 Aug 15;185(4):2174-81.

135- Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001 Jan 15;166(2):1141-7.

136- Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, McKenzie AN. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2000 Feb 1;164(3):1458-62.

137- Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J Immunol.* 1999 Jan 15;162(2):974-9.

138- Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol.* 2009 Jun;70(6):383-90.

139- Dudda JC, Perdue N, Bachtanian E, Campbell DJ. Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *J Exp Med.* 2008 Jul 7;205(7):1559-65.

140- Honda T, Miyachi Y, Kabashima K. Regulatory T cells in cutaneous immune responses. *J Dermatol Sci.* 2011 Aug;63(2):75-82.

141- O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jun;7(6):425-8.

142- Carneiro FP, De Magalhães AV, De Jesus Abreu Almeida Couto M, Bocca AL, Muniz-Junqueira MI, Ribeiro Sampaio RN. Foxp3 expression in lesions of the

different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009 Oct;31(10):646-51.

143- Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, Tacchini-Cottier F, Couppie P, Launois P. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun.* 2009 Apr;77(4):1465-74.

144- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.

145- Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):3039-46.

146- Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.* 2010 Oct;40(10):2830-6.

147- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2009 Jul 1;200(1):75-8.

148- Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *Int Immunol.* 1991 Jun;3(6):587-97.

149- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994 Jun;62(6):2614-8.

150- Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, el Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol.* 1999 Jun;91(3):314-20.

151- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Mar;9(2):251-6.

152- Nateghi Rostami M, Keshavarz H, Edalat R, Sarrafnejad A, Shahrestani T, Mahboudi F, Khamesipour A. CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Oct 12;4(10):e845.

153- Bourreau E, Ronet C, Couppié P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P. IL-10 producing CD8+ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. *Microbes Infect.* 2007 Jul;9(8):1034-41.

154- Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, Zentella A, Becker I. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Nov 2;4(11):e871.

- 155- Russo DM, Chakrabarti P, Higgins AY. Leishmania: naive human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8(+) cytotoxic effectors. *Exp Parasitol.* 1999 Nov;93(3):161-70.
- 156- Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol.* 2002 Sep-Oct;12(5):449-51.
- 157- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):7853-9.
- 158- Sacks DL, Melby PC. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. In: Coligan JE. *Current Protocols in Immunology.* Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; 2001. Capítulo 19: Unidade 19.2.
- 159- Baldwin TM, Elso C, Curtis J, Buckingham L, Handman E. The site of Leishmania major infection determines disease severity and immune responses. *Infect Immun.* 2003 Dec;71(12):6830-4.
- 160- Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2009 Aug;25(8):383-91.
- 161- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med.* 1998 Nov 16;188(10):1941-53.
- 162- de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis. *Infect Immun.* 2005 Sep;73(9):5827-34.
- 163- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002 Nov;2(11):845-58.
- 164- Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with Leishmania major and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol.* 2004 Mar 29;34(4):433-44.
- 165- Launois P, Maillard I, Pingel S, Swihart KG, Xénarios I, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, MacDonald HR, Louis JA. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to Leishmania major in BALB/c mice. *Immunity.* 1997 May;6(5):541-9.
- 166- Maillard I, Launois P, Himmelrich H, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, Louis JA. Functional plasticity of the LACK-reactive Vbeta4-Valpha8 CD4(+) T cells normally producing the early IL-4 instructing Th2 cell development and susceptibility to Leishmania major in BALB / c mice. *Eur J Immunol.* 2001 Apr;31(4):1288-96.

- 167- Julia V, Glaichenhaus N. CD4(+) T cells which react to the Leishmania major LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infect Immun*. 1999 Jul;67(7):3641-4.
- 168- Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. Resistance to Leishmania major induced by tolerance to a single antigen. *Science*. 1996 Oct 18;274(5286):421-3.
- 169- Erb KJ, Blank C, Moll H. Susceptibility to Leishmania major in IL-4 transgenic mice is not correlated with the lack of a Th1 immune response. *Immunol Cell Biol*. 1996 Jun;74(3):239-44.
- 170- Leal LM, Moss DW, Kuhn R, Müller W, Liew FY. Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to Leishmania major infection. *Eur J Immunol*. 1993 Feb;23(2):566-9.
- 171- Noben-Trauth N, Paul WE, Sacks DL. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to Leishmania major parasite substrains. *J Immunol*. 1999 May 15;162(10):6132-40.
- 172- Park AY, Hondowicz BD, Scott P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during Leishmania major infection. *J Immunol*. 2000 Jul 15;165(2):896-902.
- 173- Park AY, Scott P. IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. *Scand J Immunol*. 2001 Jun;53(6):529-32.
- 174- Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with Leishmania major. *J Exp. Med*. 1994 Apr; 179 (4): 1367-71.
- 175- Belosevic M, Finbloom DS, van der Meide PH, Slayter MV, Nacy CA. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with Leishmania major. *J Immunol*. 1989 Jul; 143 (1): 266-74.
- 176- Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD. Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin. Invest*. 1983 Oct; 72 (4): 1506-10.
- 177- Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*. 1990 Dec;71(4):556-9.
- 178- Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with Leishmania braziliensis, L. mexicana, and L. aethiopica. *Ann Trop Med Parasitol*. 1984 Feb;78(1):25-34.
- 179- DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with Leishmania braziliensis. *Infect Immun*. 1998 Feb;66(2):827-9.
- 180- Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of Leishmania (Viannia) braziliensis in mice. *Infect Immun*. 2007 Aug;75(8):3823-32.

- 181- Calabrese KS, da Costa SC. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 1:49-56.
- 182- Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*. 1993 Jul;61(7):2952-9.
- 183- Pereira BA, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol*. 2008 Dec 20;158(4):239-55.
- 184- Lemos de Souza V, Ascensão Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect*. 2000 Dec;2(15):1807-15.
- 185- Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Apr;66(4):338-45.
- 186- Vanloubbeeck YF, Ramer AE, Jie F, Jones DE. CD4+ Th1 cells induced by dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* do not promote healing. *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4455-63.
- 187- Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect Immun*. 2002 Apr;70(4):2151-8.
- 188- Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*. 2000 Jul 1;165(1):364-72.
- 189- Kanjilal SD, Dutta A, Mondal RK, Chakravorti S. Uncomplicated falciparum malaria complicated by salmonella septicaemia: cause not coincidence. *J Indian Med Assoc*. 2006 Nov;104(11):646, 648.
- 190- Degarege A, Anmut A, Legesse M, Erko B. Malaria severity status in patients with soil-transmitted helminth infections. *Acta Trop*. 2009 Oct;112(1):8-11.
- 191- Goselle ON, Onwuliri CO, Onwuliri VA. Malaria infection in HIV/AIDS patients and its correlation with packed cell volume (PCV). *J Vector Borne Dis*. 2009 Sep;46(3):205-11.
- 192- Yatich NJ, Yi J, Agbenyega T, Turpin A, Rayner JC, Stiles JK, Ellis WO, Funkhouser E, Ehiri JE, Williams JH, Jolly PE. Malaria and intestinal helminth co-infection among pregnant women in Ghana: prevalence and risk factors. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Jun;80(6):896-901.
- 193- Adegnika AA, Kremsner PG. Epidemiology of malaria and helminth interaction: a review from 2001 to 2011. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012 Mar 14.
- 194- Thapa R, Mallick D, Biswas B. Perinatal malaria and tuberculosis co-infection: a case report. *Int J Infect Dis*. 2010 Mar;14(3):e254-6.

- 195- Uneke CJ, Ogbonna A. Malaria and HIV co-infection in pregnancy in sub-Saharan Africa: impact of treatment using antimalarial and antiretroviral agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Aug;103(8):761-7.
- 196- Ab Rahman AK, Abdullah FH. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and malaria coinfection in an immigrant in the state of Terengganu, Malaysia: A case report. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011 Jan 13;44(1):72-76.
- 197- Specht S, Hoerauf A. Does helminth elimination promote or prevent malaria? *Lancet.* 2007 Feb 10;369(9560):446-7.
- 198- Degarege A, Anmut A, Legesse M, Erko B. Malaria severity status in patients with soil-transmitted helminth infections. *Acta Trop.* 2009 Oct;112(1):8-11.
- 199- Berhe N, Wolday D, Hailu A, Abraham Y, Ali A, Gebre-Michael T, Desjeux P, Sönnnerborg A, Akuffo H, Britton S. HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS.* 1999 Oct 1;13(14):1921-5.
- 200- Da-Cruz AM, Rodrigues AC, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Sabbaga-Amato V, Posada MP, Lindoso JA, Goto H. [Immunopathologic changes in HIV-Leishmania co-infection]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39 Suppl 3:75-9.
- 201- Malafaia G. [Co-infection HIV/Leishmania: a serious problem of Public Health]. *Rev Saude Publica.* 2009 Feb;43(1):195.
- 202- O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007 Jan 1;195(1):142-8.
- 203- Newlove T, Guimarães LH, Morgan DJ, Alcântara L, Glesby MJ, Carvalho EM, Machado PR. Anthelmintic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Apr;84(4):551-5.
- 204- Scott CP, Kumar N, Bishai WR, Manabe YC. Short report: modulation of *Mycobacterium tuberculosis* infection by *Plasmodium* in the murine model. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Feb;70(2):144-8.
- 205- Page KR, Jedlicka AE, Fakheri B, Noland GS, Kesavan AK, Scott AL, Kumar N, Manabe YC. *Mycobacterium*-induced potentiation of type 1 immune responses and protection against malaria are host specific. *Infect Immun.* 2005. Dec;73(12):8369-80.
- 206- Matsumoto S, Yukitake H, Kanbara H, Yamada H, Kitamura A, Yamada T. *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin induces protective immunity against infection by *Plasmodium yoelii* at blood-stage depending on shifting immunity toward Th1 type and inducing protective IgG2a after the parasite infection. *Vaccine.* 2000 Nov 22;19(7-8):779-87.
- 207- Scott CP, Kumar N, Bishai WR, Manabe YC. Short report: modulation of *Mycobacterium tuberculosis* infection by *Plasmodium* in the murine model. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Feb;70(2):144-8.
- 208- MacLennan CA. Host defense against malaria favors *Salmonella*. *Nat Med.* 2012 Jan 6;18(1):21-2.

- 209- Cunnington AJ, de Souza JB, Walther M, Riley EM. Malaria impairs resistance to Salmonella through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nat Med*. 2011 Dec 18;18(1):120-7.
- 210- Coleman RE, Edman JD, Semprevivo LH. Interactions between *Plasmodium yoelii* and *Leishmania mexicana amazonensis* in *Leishmania* resistant C57B1/6 mice. *Am J Trop Med Hyg*. 1988 Dec;39(6):540-4.
- 211- Marques CS, Rolão N, Centeno-Lima S, Lousada H, Maia C, Campino L, do Rosário VE, Silveira H. Studies in a co-infection murine model of *Plasmodium chabaudi chabaudi* and *Leishmania infantum*: interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Dec;100(8):889-92.
- 212- Coleman RE, Edman JD, Semprevivo LH. *Leishmania mexicana*: effect of concomitant malaria on cutaneous leishmaniasis. Development of lesions in a *Leishmania*-susceptible (BALB/c) strain of mouse. *Exp Parasitol*. 1988 Apr;65(2):269-76.
- 213- Schariton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med*. 1993 Aug 1;178(2):567-77.
- 214- Scott P, Farrell JP. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol*. 1998;70:60-80. Review.
- 215- Lang T, Courret N, Colle JH, Milon G, Antoine JC. The levels and patterns of cytokines produced by CD4 T lymphocytes of BALB/c mice infected with *Leishmania major* by inoculation into the ear dermis depend on the infectiousness and size of the inoculum. *Infect Immun*. 2003 May;71(5):2674-83.
- 216- Baldwin T, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Kumar B, Smyth GK, Foote SJ, Handman E. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. *Parasite Immunol*. 2007 Oct;29(10):501-13.
- 217- Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol*. 2003 Oct;33(12):1373-83.
- 218- Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*. 1992 Jul 24;257(5069):539-42.
- 219- Doherty TM, Coffman RL. *Leishmania major*: effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. *Exp Parasitol*. 1996 Nov;84(2):124-35.
- 220- Mattner F, Di Padova K, Alber G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infect Immun*. 1997 Nov;65(11):4378-83.
- 221- Sanchez-Torres L, Rodriguez-Ropon A, Aguilar-Medina M, Favila-Castillo L. Mouse splenic CD4+ and CD8+ T cells undergo extensive apoptosis during a

- Plasmodium chabaudi chabaudi AS infection. Parasite Immunol. 2001 Dec;23(12):617-26.
- 222- Helmsby H, Jönsson G, Troye-Blomberg M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage Plasmodium chabaudi chabaudi AS. Infect Immun. 2000 Mar;68(3):1485-90.
- 223- Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD, Kelso A, Good MF. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. J Exp Med. 2002 Apr 1;195(7):881-92.
- 224- Mukherjee P, Devi YS, Chauhan VS. Blood stage malaria antigens induce different activation-induced cell death programs in splenic CD4+T cells. Parasite Immunol. 2008 Oct;30(10):497-514.
- 225- Graumann K, Hippe D, Gross U, Lüder CG. Mammalian apoptotic signaling pathways: multiple targets of protozoan parasites to activate or deactivate host cell death. Microbes Infect. 2009 Nov;11(13):1079-87.
- 226- Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. Science. 1998 Apr 10;280(5361):243-8.
- 227- Kimura D, Miyakoda M, Honma K, Shibata Y, Yuda M, Chinzei Y, Yui K. Production of IFN- γ by CD4(+) T cells in response to malaria antigens is IL-2 dependent. Int Immunol. 2010 Dec;22(12):941-52.
- 228- Langhorne J, Meding SJ, Eichmann K, Gillard SS. The response of CD4+ T cells to Plasmodium chabaudi chabaudi. Immunol Rev. 1989 Dec;112:71-94.
- 229- Fonseca L, Seixas E, Butcher G, Langhorne J. Cytokine responses of CD4+ T cells during a Plasmodium chabaudi chabaudi (ER) blood-stage infection in mice initiated by the natural route of infection. Malar J. 2007 Jun 7;6:77.
- 230- Freitas do Rosário AP, Lamb T, Spence P, Stephens R, Lang A, Roers A, Muller W, O'Garra A, Langhorne J. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. J Immunol. 2012 Feb 1;188(3):1178-90.
- 231- Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. J Exp Med. 2007 Feb 19;204(2):285-97.
- 232- Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. J Exp Med. 2007 Feb 19;204(2):273-83.
- 233- McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. Nat Immunol. 2007 Dec;8(12):1390-7.

- 234- Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, Flavell RA, de Souza JB, Riley EM. IL-10 from CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁺ adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog.* 2008 Feb 29;4(2):e1000004.
- 235- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997 Oct 16;389(6652):737-42.
- 236- Haque A, Best SE, Amante FH, Mustafah S, Desbarrieres L, de Labastida F, Sparwasser T, Hill GR, Engwerda CR. CD4⁺ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. *PLoS Pathog.* 2010 Dec 9;6(12):e1001221.
- 237- Scholzen A, Minigo G, Plebanski M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends Parasitol.* 2010 Jan;26(1):16-25.
- 238- Omer FM, de Souza JB, Corran PH, Sultan AA, Riley EM. Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1817-27.
- 239- Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SM, Nascimento ET, Goldman TL, Recker TJ, Miller MA, Wilson ME. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol.* 2003 Mar 1;170(5):2613-20.
- 240- Finney OC, Riley EM, Walther M. Regulatory T cells in malaria--friend or foe? *Trends Immunol.* 2010 Feb;31(2):63-70.
- 241- Lepenies B, Gaworski I, Tartz S, Langhorne J, Fleischer B, Jacobs T. CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal *Plasmodium yoelii* infections. *Microbes Infect.* 2007 May;9(6):687-94.
- 242- Couper KN, Blount DG, Hafalla JC, van Rooijen N, de Souza JB, Riley EM. Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia. *Infect Immun.* 2007 Dec;75(12):5806-18.
- 243- Lundie RJ, de Koning-Ward TF, Davey GM, Nie CQ, Hansen DS, Lau LS, Mintern JD, Belz GT, Schofield L, Carbone FR, Villadangos JA, Crabb BS, Heath WR. Blood-stage *Plasmodium* infection induces CD8⁺ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8alpha⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 23;105(38):14509-14.
- 244- Legorreta-Herrera M, Rivas-Contreras S, Ventura-Gallegos J, Zentella-Dehesa A. Nitric oxide is involved in the upregulation of IFN-gamma and IL-10 mRNA expression by CD8⁺ T cells during the blood stages of *P. chabaudi* AS infection in CBA/Ca mice. *Int J Biol Sci.* 2011;7(9):1401-11. Epub 2011 Nov 1.
- 245- Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, Tetsutani K, Moriya C, Ishida H, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H, Himeno K. Involvement of CD8⁺ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. *Eur J Immunol.* 2010 Apr;40(4):1053-61.

- 246- Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011 Aug 26;35(2):161-8.
- 247- Coêlho ZC, Teixeira MJ, Mota EF, Frutuoso MS, Silva JS, Barral A, Barral-Netto M, Pompeu MM. 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*. 2010 Sep-Oct;14(5):476-82.
- 248- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 2001 Nov 19;194(10):1497-506.
- 249- Yang Z, Mosser DM, Zhang X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *J Immunol*. 2007 Jan 15;178(2):1077-85.

Anexo 1 – Licença Comitê de Ética no Uso de Animais

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência		Comissão de Ética no Uso de Animais
---	---	---	--

LICENÇA

LW-17/11

Certificamos que o protocolo (P-87/10-5), intitulado "Co-infecção por malária e leishmaniose: avaliação das alterações na resposta imune e o impacto de uma infecção sobre a evolução clínica da outra.", sob a responsabilidade de DALMA MARIA BANIC, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

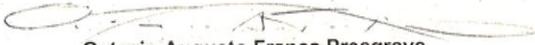
Esta licença tem validade até 09/06/2015 e inclui o uso total de :

Mus musculus
- 2172 Fêmeas de BALB/c - BM, Idade: 6 Semana(s).

Mus musculus
- 2172 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s).

Mus musculus
- 2172 Fêmeas de BP2, Idade: 6 Semana(s).

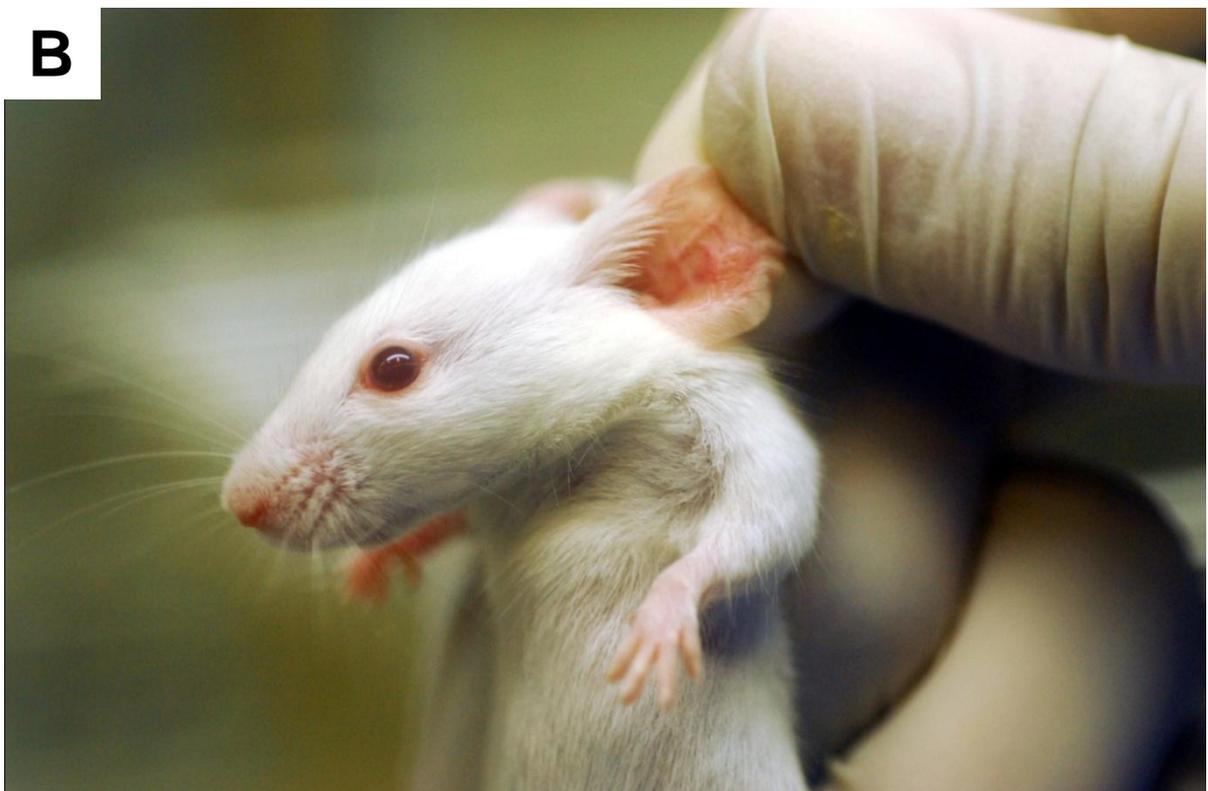
Rio de Janeiro, 9 de junho de 2011


Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

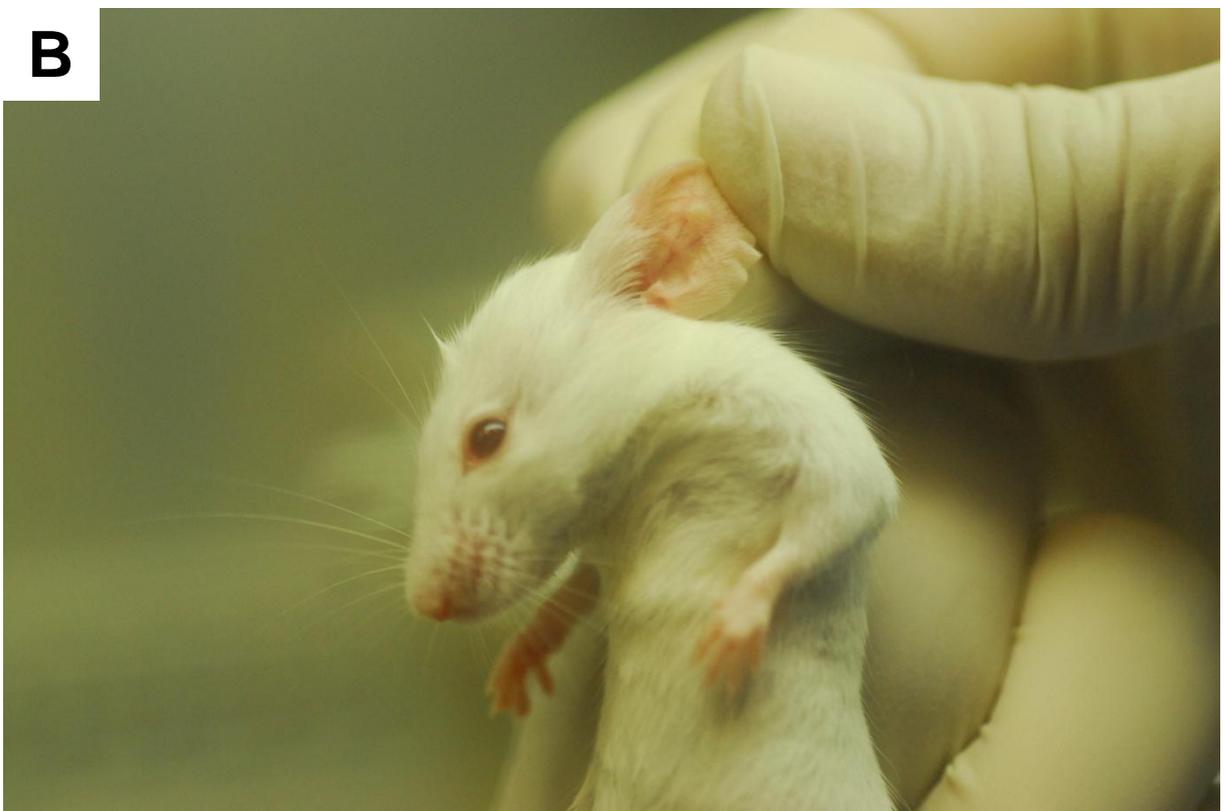
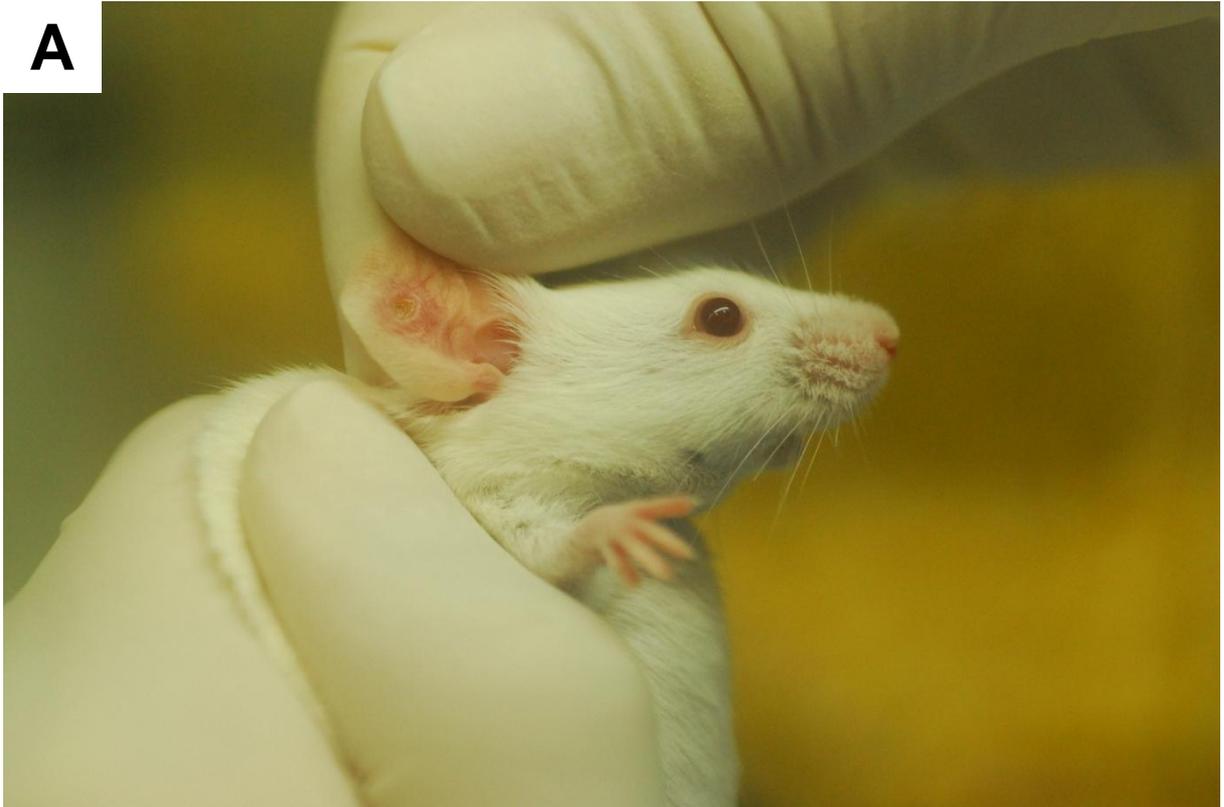
Anexo 2 – Aspecto das lesões no final do período de estudo

Prancha 1 – Aspecto das lesões em camundongos mono infectados com *L. braziliensis* (A) e co infectados com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL (B) no dia 77.



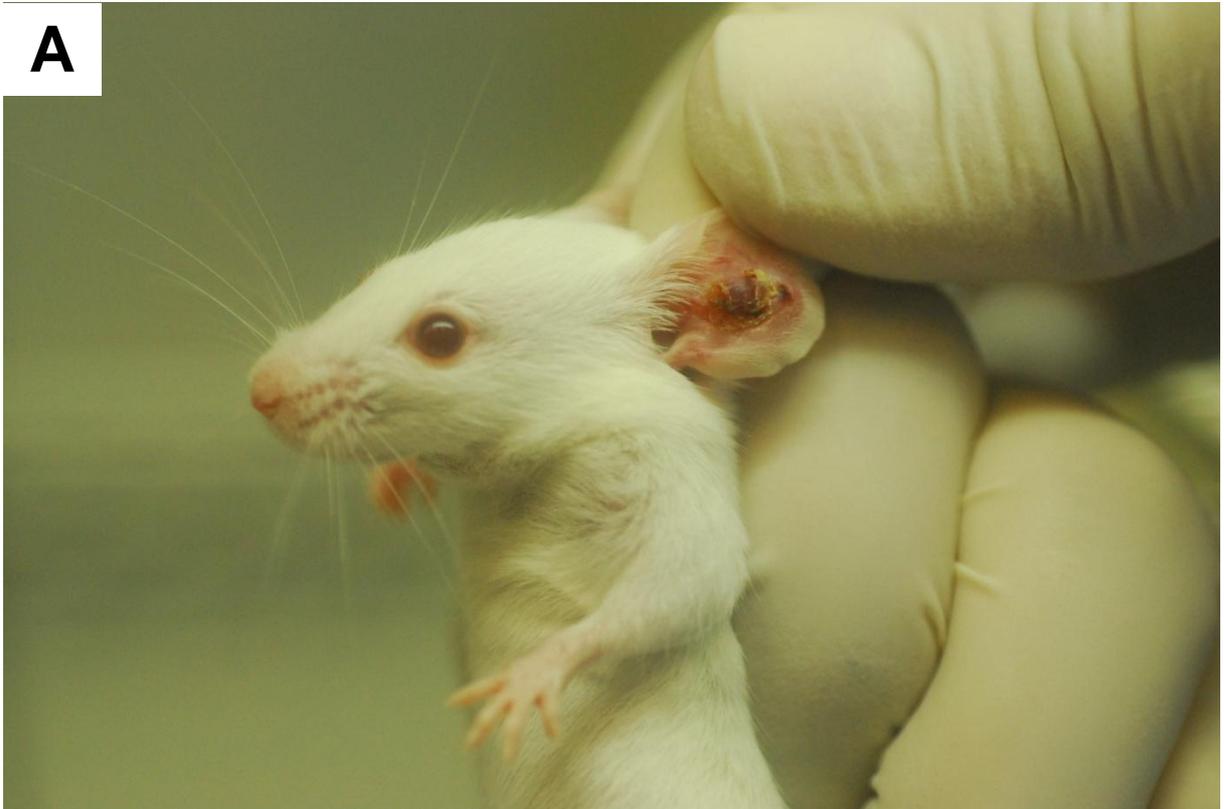
Fotos: Rodrigo Méxas, 2011.

Prancha 2 – Aspecto das lesões em camundongos mono infectados com *L. major* (A) e co infectados com *L. major* e *P. yoelii* 17XNL (B) no dia 77.



Fotos: Rodrigo Méxas, 2011.

Prancha 3 – Aspecto das lesões em camundongos mono infectados com *L. amazonensis* (A) e co infectados com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL (B) no dia 77.



Fotos: Rodrigo Méxas, 2011.

Anexo 3 - Concentrações de citocinas no soro de camundongos dos grupos controle, mono infectados e co infectados

Citocinas Th1

Grupos/Dias	IL-2 (pg/mL)					IFN- γ (pg/mL)					TNF (pg/mL)				
	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77
Controle	4,09	4,48	2,87	2,28	3,29	4,57	4,94	3,82	5,13	3,27	25,34	19,14	14,6	14,6	15,1
<i>P. yoelii</i> 17XNL	4,28	5,92	3,49	2,66	5,92	140,86	13,8	8,31	10,2	9,63	195,51	65,28	71,5	14,6	18,63
<i>L. braziliensis</i>	3,69	3,29	2,44	2,44	3,08	4,57	3,64	3,27	3,82	4,01	20,16	23,77	14,11	12,13	11,64
<i>L. major</i>	4,48	3,29	4,85	3,89	2,87	45,1	4,2	5,69	4,94	3,82	93,64	23,77	16,61	16,61	9,21
<i>L. amazonensis</i>	4,28	3,69	4,85	3,69	2,44	4,94	4,38	6,25	4,57	3,45	18,12	19,65	18,12	15,6	10,18
<i>L. braziliensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	5,4	4,28	4,66	3,49	5,75	67,55	15,13	6,81	10,2	15,13	94,99	37,76	43,94	16,61	13,61
<i>L. major</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	5,04	4,28	3,29	3,89	3,89	58,71	17,43	6,25	7,75	5,69	56,78	142,42	74,66	15,1	13,61
<i>L. amazonensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	5,4	4,48	3,29	3,08	3,89	121,78	10,57	6,62	5,13	6,23	169,87	67,75	56,78	12,13	17,11

Citocinas Th2

Grupos/Dias	IL-4 (pg/mL)					IL-6 (pg/mL)				
	5	10	17	25	77	5	10	17	25	77
Controle	2,27	2,27	1,87	2,27	2,01	3,44	2,45	2,29	3,28	1,02
<i>P. yoelii</i> 17XNL	2,07	2,54	3,07	4,18	4,7	18,94	7,14	18,49	7,51	10,39
<i>L. braziliensis</i>	2,14	1,87	1,87	1,54	1,94	3,11	2,29	2,29	1,97	1,65
<i>L. major</i>	2,14	1,94	2,54	2,21	1,67	9,03	4,47	3,28	2,29	2,29
<i>L. amazonensis</i>	2,47	2,14	2,34	2,21	1,87	5,16	7,14	4,64	1,97	2,29
<i>L. braziliensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	2,47	2,93	2,54	3,46	7,02	8,07	8,64	4,99	4,64	13,66
<i>L. major</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	2,01	2,27	2,27	3,46	2,67	4,12	76,21	19,87	5,87	3,95
<i>L. amazonensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	2,67	2,41	2,07	3,53	3,33	14,51	6,59	30,62	7,14	5,34

Citocina Th17

Grupos/Dias	IL-17 (pg/mL)				
	5	10	17	25	77
Controle	1,32	1,32	0,87	1,63	0,94
<i>P. yoelii</i> 17XNL	0,79	3,02	3,46	2,44	3,99
<i>L. braziliensis</i>	1,71	0,87	0,87	1,17	1,32
<i>L. major</i>	1,4	1,17	2,11	1,01	0,64
<i>L. amazonensis</i>	1,32	1,47	1,63	1,09	1,01
<i>L. braziliensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	1,4	1,47	2,27	4,54	7,49
<i>L. major</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	1,09	0,87	1,55	3,9	1,71
<i>L. amazonensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	1,17	1,4	0,94	1,87	2,44

Citocina Reguladora

Grupos/Dias	IL-10 (pg/mL)				
	5	10	17	25	77
Controle	31,57	35,19	29,7	35,19	27,8
<i>P. yoelii</i> 17XNL	117,85	102,16	101,34	46,78	58,37
<i>L. braziliensis</i>	29,7	29,7	25,85	25,85	17,57
<i>L. major</i>	75,54	35,19	35,19	31,57	17,57
<i>L. amazonensis</i>	40,35	27,8	46,78	38,66	21,81
<i>L. braziliensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	104,58	103,78	76,64	42	67,38
<i>L. major</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	79,88	99,67	97,97	35,19	33,4
<i>L. amazonensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL	122,51	81,97	73,28	36,94	42