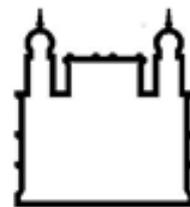




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**CO-INFECÇÃO COM *Leishmania major* E *Trypanosoma brucei brucei* CONTROLA A GRAVIDADE DA PATOLOGIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**LAÍS DA SILVA PEREIRA**

**Salvador–Bahia  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**CO-INFECÇÃO COM *Leishmania major* E *Trypanosoma brucei brucei* CONTROLA A GRAVIDADE DA PATOLOGIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**LAÍS DA SILVA PEREIRA**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cláudia Ida Brodskyn

Co-orientadora: Dr<sup>ª</sup> Shaden Kamhawi

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Patologia como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor

**Salvador–Bahia  
2015**

Ao autor da vida.

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Cláudia Brodskyn, por sua participação fundamental no meu processo de formação profissional durante esses 6 anos de pesquisa trabalhando juntas. Esta pesquisa não teria sido realizada sem sua iniciativa e colaboração, as quais me deram a oportunidade de ir além. Sou grata por todos os seus esforços para que este trabalho fosse possível.

À minha co-orientadora Dra. Shaden Kamhawi, o quanto sua experiência profissional e motivação foram valiosas no meu doutorado.

Ao chefe do laboratório Dr. Jesus Valenzuela, pelo maravilhoso acolhimento e por fazer o laboratório LMVR um ambiente de trabalho tão harmonioso.

Ao meu amigo e colega de trabalho Dr. Rasouli Manoochehr, por sua competência e solicitude durante os trabalhos realizados.

Ao Fabiano Oliveira, pelas colaborações nas instruções técnicas e administrativas no Laboratório.

Aos meus colegas do laboratório: Diône, Augusto, Thiago, Cláudio, Vini, Antônio e Anderson, pelas vivências e risos.

Aos eternos e amados amigos: José, Ashley, Evelyn, Gabriel, Aliana, Juliana, Bruna, Sônia, Carla, Shannon, Silvia, Elze, Clarissa, Maria, Lêda e Maha pelo companheirismo, cuidados e as experiências vividas nesta jornada.

Aos funcionários pertencentes aos setores de biotério, administração, histotecnologia e insetário do NIH pela administração hábil que facilita o trabalho de todos no laboratório.

Aos camundongos, esse modelo experimental, esse “n”, ser vivo. Enfim, às vidas que foram utilizadas nesta pesquisa.

À bibliotecária Ana Maria Fiscina, pelas correções e padronização da tese.

À Fonte financiadora CNPq, pela viabilização da pesquisa.

Àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste estudo.

*“O sucesso não é determinado pelo fato de você encarar ou não os obstáculos, e sim pela sua reação a eles. E se você olhar para todos os obstáculos como uma cerca fechada, eles tornam-se a sua desculpa para o fracasso. Se olhar como uma corrida com obstáculos, cada barreira fortalece-o para a próxima e você vence”*

Dr. Ben Carson

PEREIRA, Laís da Silva. Co-infecção com *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei brucei* controla a gravidade da patologia da leishmaniose cutânea. 87 f. il. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## RESUMO

Os resultados das co-infecções nas leishmanioses cutânea (LC) são variáveis. Neste estudo, demonstramos o desfecho da co-infecção com *Trypanosoma brucei brucei* sobre a LC, causada por *L. major*. Infectamos camundongos C57BL/6 com *T. b. brucei* e estes foram tratados com o Berenil para controlar a infecção antes da transmissão da *L. major* por picadas de *Lutzomyia longipalpis* infectados. Nossos resultados revelam que, a infecção ativa com o *T. b. brucei* controla a patologia da LC causada por *L. major*. Comparados aos controles, camundongos co-infectados mostraram uma diminuição significativa do tamanho da lesão até 6 semanas após infecção. Adicionalmente, uma diminuição significativa da carga parasitária foi observada 3 semanas após a infecção. É importante salientar que a proteção observada não foi devido a reação cruzada entre os antígenos do *T. b. brucei* e *L. major*, mas por uma ativação não específica das células T efectoras, tanto sistemicamente como localmente no sítio da infecção, induzindo uma resposta inflamatória intensa, em particular com a produção de IFN- $\gamma$  e em menor concentração de IL-10. Concluímos que a ativação das células T pelo curso da infecção com *T. b. brucei*, modulou a infecção com *L. major*, resultando em proteção.

**Palavras-chaves:** *Leishmania*, co-infecção, *Trypanosoma*

PEREIRA, Laís da Silva. Co-infection with *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei brucei* controls the severity of cutaneous leishmaniasis pathology. 87 f. il. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## ABSTRACT

The outcome of co-infections on cutaneous leishmaniasis (CL) is variable. Here, we determined the outcome of a co-infection with *Trypanosoma brucei brucei* on CL caused by *L. major*. We infected C57BL/6 mice with *T. b. brucei* and treated them with Berenil to control parasite growth prior to *L. major* transmission by infected *Lutzomyia longipalpis* bites. Our results revealed that an active infection with *T. b. brucei* controls the pathology of CL by *L. major*. Compared to controls, co-infected mice show a significant decrease in lesion size up to 6 weeks post-infection. Additionally, a significant decrease in the parasite load was observed at 3 weeks post-infection. Importantly, the observed protection was not due to cross-reactivity between antigens of *T. b. brucei* and *L. major* but to a non-specific activation of effector T cells, both at the site of infection and systemically, that induces a strong inflammatory response, in particular IFN- $\gamma$  and at a lower IL-10 level. We conclude that activation of T cells by an ongoing *T. b. brucei* infection modulates the outcome of infection with *L. major* resulting in protection.

**Keywords:** *Leishmania*, co-infection, *Trypanosoma*

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1</b>	Distribuição da LC no continente africano, 2014 .....	31
<b>Figura 2</b>	Número de casos de Tripanossomíase humana no continente africano, 2000-2003.....	32
<b>Figura-3</b>	Sistema de alimentação artificial dos flebotomíneos.....	38
<b>Figura 4</b>	Transmissão natural da <i>Leishmania spp</i> .....	39
<b>Figura 5</b>	Carga parasitária de <i>T. b. brucei</i> antes e depois da transmissão da <i>L. major</i> .....	47
<b>Figura 6</b>	Status pré transmissão do <i>Lu. longipalpis</i> infectado com <i>L. major</i> .....	49
<b>Figura 7</b>	Status pós transmissão do <i>Lu. longipalpis</i> infectado com <i>L. major</i> .....	49
<b>Figura 8</b>	Espessura e diâmetro da lesão dos animais desafiados com <i>Lu. longipalpis</i> infectados com <i>L. major</i> .....	50
<b>Figura 9</b>	Carga parasitária de <i>L. major</i> no linfonodo por LDA.....	51
<b>Figura 10</b>	Peso dos animais infectados com <i>T. b. brucei</i> e/ou <i>L. major</i> .....	52
<b>Figura 11</b>	Desestruturação esplênica após infecção com <i>T. b. brucei</i> .....	54
<b>Figura 12</b>	Encefalite após infecção com <i>T. b. brucei</i> .....	56
<b>Figura 13</b>	Avaliação da resposta imune humoral anti-SLA pela quantificação de anticorpos no soro por ELISA, na infecção com <i>T. b. brucei</i> e/ou co- infectado com <i>L. major</i> .....	58
<b>Figura 14</b>	Alterações nos plasmócitos do baço durante a infecção com <i>T. b. brucei</i> .....	59
<b>Figura 15</b>	Alterações nas células B da zona marginal do baço durante a infecção com <i>T. b. brucei</i> .....	60
<b>Figura 16</b>	Avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatória na orelha após a transmissão da <i>L. major</i> por PCR em tempo real.....	62
<b>Figura 17</b>	Avaliação da expressão de citocinas na orelha após a transmissão da <i>L. major</i> por PCR em tempo real.....	63
<b>Figura 18</b>	Infecção com <i>T. b. brucei</i> induz uma resposta imune, do tipo Th-1.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

AnTat1.1	Lisado- antígeno bruto total solúvel do <i>Trypanosoma</i>
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
ConA	Concanavalina A
DC	Células Dendrítica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DS	Doença do Sono
ELISA	Ensaio Imunoenzimático, do inglês Enzyme Liked Immunosorbent Assay
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H&E	Hematoxilina & Eosina
HAT	Tripanosomiase Africana Humana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	do inglês “ <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> ”
IP	Intraperitoneal
LC	Leishmaniose Cutânea
LJM-11	proteína salivar do <i>Lutzomyia longipalpis</i> .
MAPK	do inglês Mitogen-activated protein kinases
NF- $\kappa$ B	do inglês factor nuclear kappa B
NK	do inglês Natural killer
OD	Densidade Ótica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	do inglês Polymerase chain reaction
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês ribonucleic acid
ROS	Espécies reativas de oxigênio, inglês Reactive oxygen species.
RPMI	Meio de cultura, do inglês Roswell Park Memorial Institute medium
SBF	Soro Bovino Fetal.
SLA	do inglês <i>Soluble Leishmania Antigen</i>

TGF	$\beta$ Fator Transformador de Crescimento $\beta$ , do inglês Transforming Growth Factor $\beta$
Th	Célula Auxiliadora, do inglês T helper.
TLR	Receptor do Tipo Toll, do inglês Toll-like Receptor
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg-	Células T regulatórias
VSG	do inglês variable surface glycoprotein

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1.	EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	14
1.2.	CICLO DE VIDA DA <i>LEISHMANIA</i> .....	14
1.3.	MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	15
1.4.	RESPOSTA IMUNE INATA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	17
1.5.	A FUNÇÃO DAS CÉLULAS T CD8 NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	20
1.6.	A FUNÇÃO DAS CÉLULAS TCD4 NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	21
1.7.	RELATOS DE CASOS E CO-INFECÇÕES NAS LEISHMANIOSES.....	25
1.8.	TRYPANOSOMIASES, OUTRA DOENÇA TROPICAL NEGLIGENCIADA.....	26
1.9.	O ENCONTRO DO TRYPANOSOMA E O SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	28
1.10.	RELEVÂNCIA DO ESTUDO DA CO-INFECÇÃO <i>T. B. BRUCEI/L. MAJOR</i> .....	29
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	34
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4.</b>	<b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	35
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
5.1.	ANIMAIS.....	36
5.2.	GRUPOS DE ANIMAIS AVALIADOS.....	36
5.3.	INFECÇÃO DOS ANIMAIS COM <i>TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI</i> .....	36
5.4.	PROTOCOLO TERAPÊUTICO, PARA CONTROLE DA CARGA DE <i>T. B. BRUCEI</i> NOS CAMUNDONGOS.....	37
5.5.	ISOLAMENTO DA <i>L. MAJOR</i> PARA INFECÇÃO ARTIFICIAL.....	38
5.6.	INFECÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS ATRAVÉS DA ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL.....	38
5.7.	ESTIMATIVA DA CARGA DE <i>L. MAJOR</i> NO INTESTINO DO <i>LU.</i> <i>LONGIPALPIS</i> .....	38
5.8.	TRANSMISSÃO DA <i>L. MAJOR</i> PARA OS CAMUNDONGOS E ESCORE DA ALIMENTAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	40
5.9.	MENSURAÇÃO DA LESÃO.....	41
5.10.	DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE <i>LEISHMANIA</i> POR DILUIÇÃO LIMITANTE.....	41

5.11.	AVALIAÇÕESHISTOPATOLÓGICAS.....	41
5.12.	ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI- SLA.....	42
5.13.	ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI- ANTAT1.1 LISADO, ANTAT 1.1 SVSG E MICROFILÁRIA.....	42
5.14.	EXTRAÇÃO DE RNA E PREPARO DO CDNA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS NA ORELHA.....	43
5.15.	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL NA ORELHA.....	44
5.16.	CONTAGENS E LAVAGENS DAS CÉLULAS DO BAÇO.....	44
5.17.	AVALIAÇÃO DOS PLASMÓCITOS, DA ZONA MARGINAL DO BAÇO E PLASMÁTICA.....	45
5.18.	ENSAIO DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS NOS LINFÓCITOS POR CITOMETRIA.....	45
5.19.	FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS T E DOSAGENS DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	45
5.20.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
6.1.	CARGA PARASITÁRIA DE <i>T. B. BRUCEI</i> NO SANGUE DOS ANIMAIS ANTES E DEPOIS DA TRANSMISSÃO DA <i>L. MAJOR</i> .....	47
6.2.	AVALIAÇÃO DA CARGA E VIABILIDADE DA <i>L. MAJOR</i> NO INTESTINO DO <i>LU. LONGIPALPIS</i> .....	48
6.3.	AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO NATURAL DA <i>L. MAJOR</i> PELO <i>LU. LONGIPALPIS</i> PARA CAMUNDONGOS.....	50
6.4.	AVALIAÇÃO PATOLÓGICA DA LESÃO NA ORELHA DOS ANIMAIS INFECTADOS COM <i>L. MAJOR</i> .....	51
6.5.	ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA DE <i>L. MAJOR</i> NO LINFONODO.....	52
6.6.	CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>T. B. BRUCEI</i> TEM INTENSA PERDA DE PESO.....	53
6.7.	ESPLENOMEGALIA E DESESTRUTURAÇÃO DO BAÇO APÓS A INFECÇÃO COM <i>T. B. BRUCEI</i> .....	54
6.8.	INFECÇÃO COM <i>T. B. BRUCEI</i> CAUSA ENCEFALITE TARDIAMENTE.....	56
6.9.	INFECÇÃO COM <i>T. B. BRUCEI</i> INDUZ UMA ATIVAÇÃO POLICLONAL DE ANTICORPOS.....	57

6.10.	INFECÇÃO COM <i>T. B. BRUCEI</i> CAUSA EXPANSÃO POLICLONAL DOS PLASMÓCITO.....	60
6.11.	O <i>T. B. BRUCEI</i> CAUSA A PERDA DAS CÉLULAS B DA ZONA MARGINAL DO BAÇO.....	61
6.12.	PERFIL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA ORELHA POR RT-PCR, DEPOIS DA INFECÇÃO COM <i>T. B. BRUCEI</i> E/OU <i>L. MAJOR</i> .....	62
6.13.	PERFIL DE OUTRAS CITOCINAS NA ORELHA POR RT-PCR, DEPOIS DA INFECÇÃO COM <i>T. B. BRUCEI</i> E/ OU <i>L. MAJOR</i> .....	63
6.14.	INFECÇÃO COM <i>T. B. BRUCEI</i> INDUZ UMA INTENSA RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA.....	65
7.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A leishmaniose cutânea, doravante LC é uma doença infecto-parasitária, causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A doença acomete o homem e outras espécies de mamíferos, provocando úlceras na pele e nas mucosas. A LC é considerada um grave problema de saúde pública e conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), nos últimos 5 anos foram registrados 1 milhão de casos de LC. A incidência da doença é de 0.7 até 1.3 milhões de novos casos/ano (WHO, 2015).

A maioria dos casos da LC concentra-se em regiões pobres como sudeste da Ásia, leste da África, América Latina e o Mediterrâneo. Dentre essas regiões, os países mais atingidos são Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e República Árabe da Síria (WHO, 2015). Nos últimos anos, tem sido considerada uma doença emergente entre os turistas, tendo como agravante, neste grupo, o retardo do tratamento, por não haver familiaridade com a sintomatologia da doença (SCHWARTZ et al., 2006).

Existem mais de 20 espécies diferentes do gênero *Leishmania* que são encontradas em áreas endêmicas, dependendo das variações geográficas. O clima (sub) tropical possui condições ambientais, nas quais o vetor pode adaptar-se melhor. Nas Américas (Novo Mundo), os agentes etiológicos mais comuns causadores da LC, são *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Os principais agentes encontrados na Ásia, Afeganistão e Europa (Velho Mundo), são *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) tropica* (SHARMA e SINGH, 2008,; MAHBOUDI et al., 2002).

## 1.2 CICLO DE VIDA DA LEISHMANIA

Os parasitos protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo digenético (heteróximo). São encontrados na forma livre flagelada, denominada promastigota, presente no lúmen do trato digestivo do vetor e na forma amastigota, sem flagelo, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (LAINSON; SHAW, 1987).

As amastigotas, ao serem ingeridas com sangue pelo vetor, são deglutidas e conduzidas ao intestino médio. No primeiro dia, ocorre a ruptura dos macrófagos e, após 12 a 20 horas, aproximadamente, os parasitos transformam-se em promastigotas procíclicas - que são as formas multiplicativas, necessárias para o estabelecimento da metaciclogênese. (PIMENTA et al., 1997). No segundo e quinto dia, ocorrem mitoses e diferenciação dos procíclicos, surgindo uma nova população de promastigotas - as nectomonas. As nectomonas são as formas predominantes no terceiro e quarto dias após a infecção e, posteriormente, surgem as haptomonas (LAWYER et al., 1990).

A última etapa da metaciclogênese é representada com a presença de promastigotas metacíclicas, uma forma altamente ativa, delgada, com um flagelo longo, cujo tamanho é, aproximadamente, três vezes maior do que o corpo celular. As metacíclicas são as formas multiplicativas necessárias para o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado (PIMENTA et al., 1991).

Prosseguindo o ciclo, as promastigotas metacíclicas migram para as regiões anteriores do intestino e são transmitidas ao vertebrado no momento em que o flebotômíneo infectado faz seu repasto sanguíneo, inoculando-as na pele. Essas últimas são fagocitadas por macrófagos e se instalam no interior de fagolisossomos, onde se diferenciam na forma amastigota, proliferando por divisão binária. A *Leishmania* desenvolveu uma variedade de mecanismos de adaptação para sobreviver dentro do macrófago e evadir da sua resposta imune (ALEXANDER et al., 1999).

### 1.3 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

As manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar dependem de fatores, como: espécie do vetor e *Leishmania spp*, dose, local da inoculação e genética do parasito. Além de fatores inerentes ao hospedeiro, como genética, idade, estado nutricional e perfil da resposta imune desenvolvida (AKILOV et al., 2007).

As quatro principais formas clínicas da leishmaniose tegumentar são: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose disseminada e leishmaniose mucosa. Na nossa pesquisa, avaliamos os aspectos imunopatológicos na leishmaniose cutânea localizada, causada por *L. major*.

Independente da espécie de *Leishmania* causadora da leishmaniose cutânea localizada, a primeira manifestação no local da inoculação é apenas uma pápula circunscrita que, subsequentemente, adquire uma forma mais nodular, podendo evoluir para uma úlcera. O crescimento da úlcera tem características clinicamente clássicas na LC, como bordas mais endurecidas, com erosão central e coberta de crostas. A úlcera torna-se dolorosa quando apresenta infecções secundárias, como fungos ou bactérias, associadas com a linfadenopatia regional (NYLÉN e EIDSMO., 2012). Existem muitos relatos de casos onde o indivíduo desenvolve uma resposta imune capaz de resultar em resolução espontânea da úlcera sem intervenção terapêutica. O processo de cicatrização ocasiona o atrofiamento da úlcera, deixando, por fim, uma escara de halo pigmentado. Entretanto, é possível que, mesmo depois do tratamento ou cura espontânea da úlcera, a *Leishmania* persista na escara ou em linfonodos. Em alguns casos em que o indivíduo passa por períodos de imunossupressão, a úlcera pode ser reativada (JIRMANUS et al., 2012).

Com relação as outras formas clínicas da leishmaniose tegumentar, existem casos mais raros, onde o parasito multiplica-se, sem controle, aumentando o número de lesões e expandindo sua distribuição na superfície corporal. Nestes casos a forma metastática cutânea, é denominada leishmaniose cutânea difusa (LCD), devido à acentuada proliferação da *Leishmania* e à disseminação da infecção. A LCD acontece em pacientes anérgicos aos antígenos de *Leishmania*, e as manifestações clínicas são nódulos e lesões infiltradas de maneira difusa pelo tegumento (BARRAL et al., 1995). Os casos de leishmaniose cutânea disseminada caracterizam-se clinicamente pela presença de inúmeras lesões acneiformes, papulosas e ulceradas que surgem abruptamente (COUPPIÉ et al., 2004).

A leishmaniose cutânea mucosa pode ocorrer juntamente com a lesão cutânea ainda em atividade, ou anos após sua cicatrização. As lesões mucosas manifestam-se como úlcera-infiltrante e poliposa. Na maioria dos casos as lesões acometem a mucosa nasal e/ou oral, com risco de deformidades permanentes das áreas atingidas. Essa forma clínica é caracterizada por uma resposta imune exacerbada contra o parasito (DAVID et al., 2009).

#### 1.4 RESPOSTA IMUNE INATA NA LEISMANIOSE CUTÂNEA

Uma vez que o vetor inocula as formas flageladas da *Leishmania* (as promatigotas metacíclicas infectantes) na pele do hospedeiro, o sistema imune é ativado. As principais células do sistema imune inato que reagem no local da picada, na tentativa de deter a disseminação da *Leishmania*, são neutrófilos, monócitos inflamatórios, macrófagos, células dendríticas (DC) e as células Natural Killer (NK). Os macrófagos são, predominantemente as células que possuem a capacidade de destruir ou albergar as amastigotas de *Leishmania* dentro dos vacúolos parasitóforos (KAYE.; SCOTT., 2011).

Os neutrófilos migram ao sítio da infecção logo após a penetração do parasito. O papel exercido pelos neutrófilos na infecção pela *Leishmania* é ainda bastante controverso, e depende de diferentes fatores, como por exemplo, a espécie da *Leishmania*. Peters e Sacks, por meio de microscopia intravital, mostraram que os neutrófilos atingem o sítio inflamatório nos momentos iniciais da infecção pela *L. major*. Após expor camundongos a transmissão natural pelo vetor da *L. major*, observou-se intensa infiltração dos neutrófilos na pele internalizando a *Leishmania* no local da picada. A depleção prévia dos neutrófilos antes de expor os camundongos C57BL/6 à picadas do vetor infectado favoreceu o estabelecimento da infecção pela *L. major* (PETER et al., 2008; PETERS; SACKS, 2009).

Em camundongos BALB/c, modelo considerado suscetível para LC, evidenciou-se que, a morte dos neutrófilos, induziu maior produção dos mediadores PGE-2 e TGF- $\beta$  pelos macrófagos, facilitando assim, a multiplicação da *L. major*. PGE2 é capaz de induzir a produção de citocinas de perfil Th2, bem como IL-10 e IL-4, que contribuem na formação de um ambiente intracelular imunossupressor, favorável à sobrevivência da *L. major*. Por outro lado, os neutrófilos em camundongos C57BL/6, degranulam rapidamente e promovem a morte do parasito através da liberação de elastase neutrofílica, levando à produção de TNF- $\alpha$ , diminuição de TGF- $\beta$  e aumento da atividade leishmanicida em macrófagos, contribuindo para a resistência contra o desenvolvimento da lesão (RIBEIRO-GOMES et al., 2004).

Já foi demonstrado que os neutrófilos humanos e murinos liberam redes extracelulares (NETs), ricas em cromatina, histonas e peptídeos antimicrobianos, que contribuem para a morte da *Leishmania* (GUIMARAES-COSTA et al., 2009 e CHAGAS et al., 2014). Observou-se, *in vitro* que neutrófilos humanos quando tratados com a Lundep, uma proteína salivar do *Lu*.

*longipalpis*, apresentam inibição na formação das NETS. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que ao se infectar camundongos C57BL/6 com *L. major* simultaneamente com proteína rLundep, houve, aumento da lesão e carga parasitária, sugerindo que Lundep, favorece o estabelecimento da infecção, uma vez que os parasitos, escapam da ação dos neutrófilos (CHAGAS et al., 2014). Neutrófilos podem também destruir os parasitos por diferentes mecanismos, por exemplo, estas células, quando infectadas com *L. amazonensis*, tornam-se ativadas e liberam leucotrieno LTB-4, que induz degranulação e consequente destruição da *Leishmania* (TAVARES et al., 2014). Assim, verifica-se uma ação direta dos neutrófilos na morte da *Leishmania* e podem contribuir para o controle da doença.

Por outro lado, diferentes abordagens experimentais mostram que os neutrófilos atuam facilitando a disseminação da *Leishmania*. Ao inocular-se  $2 \times 10^7$  de *L. major*, pela via subcutânea, em camundongos C57BL/6, observou-se que, houve um aumento significativo do número de neutrófilos, o qual retornou à sua concentração basal após 3 dias. Já nos camundongos BALB/c, suscetíveis para LC, o infiltrado de neutrófilos no local da inoculação manteve-se alto até 12 dias, contribuindo para aumento da lesão e multiplicação da *L. major* (BIEL et al., 1992). Estes resultados sugerem que os neutrófilos em camundongos BALB/c, auxiliam o estabelecimento e disseminação da *L. major*. É importante mencionar que o papel dos neutrófilos na patogênese da LC continua controverso, pois vários fatores contribuem para os resultados encontrados, tais como a espécie de *Leishmania*, modelo animal, forma e via de inoculação do parasito.

Os neutrófilos internalizam a *Leishmania*, entretanto, o parasito inibe a sua resposta oxidativa, retardando o processo de apoptose e mantendo sua viabilidade no interior destas células (LAUFS et al., 2012). Em neutrófilos humanos, principalmente os apoptóticos, observou-se o favorecimento da disseminação do parasito. Os corpos apoptóticos contendo parasitos de neutrófilos infectados podem ser fagocitados por macrófagos, induzindo uma resposta anti-inflamatória e supressora associada à produção de TGF- $\beta$  e PGE-2 pelos macrófagos. Este ambiente favorece a multiplicação da *Leishmania* no vacúolo parasitóforo do macrófago. Este mecanismo ficou conhecido como “Cavalo de Tróia” (LASKAY, VAN ZANDBERGEN, SOLBACH, 2003, ZANDBERGEN et al., 2004). Existe o mecanismo denominado “Coelho de Troia”, onde a *Leishmania* usa os neutrófilos como abrigo transitório e podem escapar antes deles entrarem em apoptose. Após a evasão do parasito, eles são fagocitados de forma silenciosa, por macrófagos não ativados no local da infecção (RITTER.;

FRISCHKNECHT.; VAN ZANDBERGEN.; 2009). A *Leishmania* portanto, desenvolveu mecanismos de manipulação, evasão e sobrevivência nas diferentes células do hospedeiro.

Uma vez que os macrófagos estejam infectados com *Leishmania*, ocorre a fusão do fagossomo com o lisossomo, induzindo a ação das lisozimas, e de outros agentes leishmanicidas tais como, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes últimos são produzidos pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) sobre a arginina e nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato-oxidase (NADPH). Estes mediadores são críticos para o controle da capacidade de multiplicação ou destruição das *Leishmanias* (MOSSER.; ZHANG, 2008). O substrato arginina, quando metabolizado pela enzima arginase-I leva a produção de poliaminas, que são compostos que favorecem a proliferação de parasitos intracelulares (VINCENDEAU et al., 2003). A importância da ativação da enzima arginase I para a sobrevivência de várias espécies de *Leishmania* foi demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo*. Formas amastigotas de *L. major* e *L. infantum* proliferam mais em macrófagos incubados com IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , que induzem aumento da atividade da enzima arginase I (INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001). Por outro lado, a maior catabolização do substrato arginina, pela enzima iNOS, induz alta síntese de NO, capaz de matar a *L. major*. Este controle foi associado à alta produção de citocinas IFN- $\gamma$  e TNF, características de resposta imune do tipo Th1 (MUNDER et al., 2009).

Ainda relacionado à resposta imune inata, podemos citar as células NK, as quais desempenham um papel importante no controle da infecção por *L. major*. Estas migram e agregam-se no local da inoculação da *Leishmania*, sendo uma fonte de liberação inicial de IFN- $\gamma$ , importante para a ativação de macrófagos. É importante salientar, que as células TCD4<sup>+</sup> antígeno específica, são requeridas para ativação das células NK no linfonodo drenante de camundongos infectados com *L. major*. Além disso, IFN- $\gamma$  secretado pelas células NK é modulado pela produção de IL-2 e IL-12 (BIHL et al., 2010). O ambiente inflamatório gerado pelas células NK, nos momentos iniciais da infecção, tem ação direta no controle da disseminação da *Leishmania*. Camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* quando tratados com anticorpos asialo-GM1 ou NK1.1, presentes na superfície destas células, apresentaram aumento no número de parasitos no linfonodo, e isso foi associado a menor produção de IFN- $\gamma$ . Ao tratar-se camundongos BALB/c com poly I:C, verifica-se, que ocorre ativação das células NK com produção de IFN- $\gamma$  e um controle mais eficiente do número de parasitos (LASKAY et al., 1993). As células NK também participam na resposta imune inata

nos seres humanos. Pacientes infectados com *Leishmania amazonensis* apresentam melhora clínica, após a imunoterapia mensal com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) e vacinas monovalentes de *L. amazonensis* PH8 e *L. braziliensis* M2903, sendo verificado que este fato está associado ao aumento das células NK e monócitos pró-inflamatórios ativados (PEREIRA et al., 2009).

As células dendríticas que se encontram na interface entre a imunidade inata e adaptativa também desempenham papel relevante na infecção por *Leishmania*. As células dendríticas dermais, após a infecção com a *Leishmania* são capazes de processar e apresentar diretamente os antígenos para os linfócitos T, presentes no linfonodo. Uma vez que as células dendríticas, estimulem os linfócitos T naive, ativando os diferentes ramos da resposta imune estes desencadeiam a resposta imune interagindo com as células B para produção de anticorpos e com os macrófagos para induzir a liberação de citocinas ou induzir a lise celular das células dendríticas infectadas com *Leishmania* (RITTER.; OSTERLOH., 2007).

### 1.5 A FUNÇÃO DAS CÉLULAS TCD8

Os linfócitos TCD8 possuem funções relevantes para a eliminação de vírus e bactérias, mas com relação às leishmanioses, não se sabe, de forma clara, como essas células orquestram a resposta imune adaptativa. Em algumas condições, os linfócitos TCD8, no linfonodo drenante, podem produzir IFN- $\gamma$ , ativando células TCD4 Th1. Esta citocina, por sua vez, aumenta a capacidade microbicida dos macrófagos e, conseqüentemente, destroem o parasito. Todavia, as células TCD8 citolíticas posteriormente migram para a lesão, exacerbando a inflamação e causando a lesão tecidual (NOVAES et al., 2014).

Vários trabalhos demonstraram o papel benéfico dos linfócitos TCD8 na LC. O grupo de Phillip Scott, mostrou que um baixo inóculo de *L. major* foi capaz de ativar as células TCD8 a produzirem IFN- $\gamma$ , prevenindo, assim, a evolução da LC em camundongos (UZONNA, JOYCE, SCOTT, 2004). Foi demonstrado também em camundongos BALB/c, que ao se depletar os linfócitos TCD4, infectando-os posteriormente com *L. major*, os animais que apresentavam células TCD8 controlavam o desenvolvimento da lesão (MÜLLER et al., 1991). Resultados semelhantes ao do papel protetor dos linfócitos TCD8 foram observados quando camundongos foram re-infectados com *L. major* e nenhuma lesão foi observada (BELKAID et al., 2002).

Por outro lado, há trabalhos que correlacionam a gravidade da leishmaniose com a frequência de células TCD8 de memória, células produtoras de granzima. Os linfócitos TCD8 isolados da biópsia de pacientes com LC com lesão grave, apresentaram alta expressão de marcadores de granzima A e perforinas (FARIA et al., 2009). Resultados semelhantes foram vistos em pacientes infectados com *Leishmania braziliensis*, observou-se que as células TCD8<sup>+</sup> granzima B<sup>+</sup> são as responsáveis por mediar a lesão tecidual, enquanto que as células TCD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  medeiam a morte do parasito (SANTOS et al., 2013). Além disso, as granzimas B, são capazes de lisar células infectadas com amastigotas, liberando-as para metastatizar outras células fagocíticas (NOVAES et al., 2014).

Resultados semelhantes sobre ação das células TCD8<sup>+</sup> no agravamento da LC, foram observados em camundongos C57BL/6 pré-infectados com *Listeria* onde se observava um aumento no número de células TCD8 de memória. Quando esses mesmos animais foram infectados com *L. major* ocorreu a exacerbação da doença (CROSBY et al., 2014). Testando camundongos deficientes para linfócitos B e T maduros, demonstrou-se que, os animais infectados com *L. major* desenvolveram uma lesão menor. Quando esses mesmos animais foram reconstituídos com linfócitos TCD8, desenvolveram uma maior lesão, demonstrando que os linfócitos T CD8 agravam o quadro clínico da LC no modelo murinho (NOVAES et al., 2013).

#### 1.6- A FUNÇÃO DAS CÉLULAS T CD4 NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

No modelo murino, o camundongo C57BL/6 que é resistente à *L. major*, apresenta um perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF, responsáveis por ativarem macrófagos e induzirem a produção de NO e ROS, importantes na destruição do parasito. No modelo de suscetibilidade (BALB/c), a infecção pela *L. major* leva à produção das citocinas com perfil de resposta Th2, como IL-13, IL-4, IL-10 e IL-5. Estas estão associadas ao aumento e gravidade da lesão (revisto em KAYE e SCOTT, 2011). Vale ressaltar que a produção exacerbada das citocinas associadas à proteção pode ser prejudicial ao indivíduo por causarem uma resposta inflamatória intensa contribuindo para a formação da úlcera.

Vários trabalhos têm demonstrado que a resposta imune adaptativa protetora na LC, tanto no modelo animal quanto em humanos, é dependente de células T CD4<sup>+</sup> específicas produtoras de IFN- $\gamma$ . Em camundongos C57BL/6, resistentes à infecção por *L. major*, a

secreção de IFN- $\gamma$  é mantida principalmente pelas células CD4<sup>+</sup> do perfil Th1 e as células NK. Camundongos que apresentam perda do gene para IFN- $\gamma$  ou quando tratados com anticorpos anti-IFN- $\gamma$ , tornam-se incapazes de controlar a lesão ou a patologia causada pela *L. major* e isto relacionou-se a diminuição da atividade leishmanicida de macrófagos (WANG et al., 1994). A neutralização da citocina IL-12 inibe a produção inicial de IFN- $\gamma$  pelas células NK, levando a um decréscimo na diferenciação das células CD4<sup>+</sup> em Th1 e aumentando a suscetibilidade dos animais à LC (LASKEY et al., 1993).

Zaph e colaboradores demonstraram que indivíduos assintomáticos residentes em áreas endêmicas para leishmaniose estão constantemente expostos ao vetor e provavelmente aos parasitos, e mesmo assim, não apresentam sintomas clínicos da doença, somente uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) positiva a antígenos do parasito. Esta população apresenta um perfil de células T CD4 de memória central e efetora que garantem a proteção contra o parasito (ZAPH et al., 2004). Nosso grupo de pesquisa, em estudos realizados com pacientes com LC mostrou que a co-cultura de células T CD4 com macrófagos infectados mediou a morte da *L. braziliensis*, e o efeito inverso foi observado ao utilizar-se anti-IFN- $\gamma$  (SANTOS et al., 2013).

A ação do IFN- $\gamma$  e a produção do NO por macrófagos de camundongos, podem ser potencializadas pela secreção da citocina TNF, entretanto, a resolução da lesão e destruição do parasito, não é essencialmente dependente de TNF na LC. Contatou-se que, camundongos C57BL/6 que não apresentam genes para os receptores de TNF p55 e TNF p75, quando infectados com *L. major*, são ainda capazes de produzirem NO, o suficiente para eliminar o parasito. Portanto, em camundongos, o TNF otimiza a ativação dos macrófagos, mas a eliminação do parasito pode acontecer na sua ausência (NASHLEANAS.; KANALY.; SCOTT, 1993).

A IL-12 é uma das citocinas essenciais para obtenção da cura na LC, sendo secretada principalmente pelas células apresentadoras de antígenos. A IL-12 também regula os receptores da IL-18, sendo que ambas as citocinas possuem efeito sinérgico, ativando as células Th-1. O mecanismo imunológico que confere resistência ou suscetibilidade através da IL-12 foi comprovado com o uso de camundongos sem a presença dos genes codificadores da IL-12. Camundongos BALB/c com ausência do gene para IL-12, são mais suscetíveis à infecção pela *L. major*, mas quando tratados com IL-12, desenvolveram resposta imune protetora do tipo Th-

1. As células TCD4<sup>+</sup> de memória central específicas contra *L. major* requerem IL-12 para produzirem IFN- $\gamma$ . Quando estes animais sem IL-12, foram infectados com o parasito *L. major*, as células TCD4<sup>+</sup> de memória central liberam mais IL-4 no linfonodo e baço. Estes dados revelam que a IL-12 é essencial para definir o perfil de resposta Th-1 ou Th-2 gerada contra o parasito e para manter a capacidade de resposta rápida e intensa das células TCD4<sup>+</sup> de memória central contra os antígenos da *Leishmania*. A chave para uma resposta imune duradora e eficaz contra LC, são as células TCD4<sup>+</sup> de memória central, principalmente na seleção de antígenos vacinais e nos casos de re-infecções (SCOTT et al., 2008). Em uma outra linhagem de camundongo (C3H), foi demonstrado que a capacidade destes animais em controlar a infecção causada pela *L. major*, nos momentos iniciais da infecção, era através do aumento da produção de IL-12. A intensa migração de células dendríticas e NK para o linfonodo, também para sítio da infecção, foi associado ao aumento de IL-12 local e sistêmica (QUINONES, et al., 2007 e STEBUT et al., 1998).

Está bem estabelecido na literatura que a progressão da LC em BALB/c é diretamente associada a expansão de linfócitos T CD4 do padrão Th-2. A maior produção endógena ou administração exógena de IL-4 influencia drasticamente a multiplicação da *L. major*, agravando o desfecho da LC em ambos camundongos resistentes e suscetíveis (NOBEN et al., 2003). O uso de anticorpos anti- IL-4 é capaz de neutralizar a ação da citocina e o padrão da infecção em BALB/c é redirecionado para resistência contra o parasito (SADICK et al., 1990). As células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th2 secretam também IL-13, juntamente com a citocina IL-4, contribuindo para o estabelecimento da *L. major* em BALB/c. O mesmo receptor celular que reconhece a interleucina 13 é capaz de se ligar a IL-4 à IL-13 com alta afinidade e esta pode ser umas das razões que ambas as citocinas possuam o mesmo efeito deletério na infecção (NOBEN-TRRAUTH et al., 1999). Camundongos tratados com IL13R $\alpha$ 2, uma proteína bloqueadora das atividades das citocinas IL-4 e IL-13, mudaram o curso da infecção, e obtiveram proteção contra a infecção. Ao se bloquear separadamente cada receptor (IL-4 ou IL-13), os animais necessitaram mais tempo para eliminar a *L. major* (KROPF et al., 1999). Isso explica o compartilhamento de efeitos biológicos entre essas duas interleucinas vista na LC.

A IL-10 é uma outra citocina anti-inflamatória que diminui a capacidade dos macrófagos em destruir a *Leishmania*. Além das células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th2, a IL-10 também é secretada por linfócitos B, macrófagos, células Treg e dendríticas. Altos níveis de IL-10 inibem a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) e moléculas de

adesão do macrófago, responsáveis pelo reconhecimento e fagocitose do parasito (BOURREAU et al., 2010). Observou-se que a depleção de IL-10 promove um fenótipo de resistência à infecção por *L. major* em camundongos BALB/c. Entretanto, ao se inocular baixas doses de *L. major*, em animais deficientes em IL-10, estes foram capazes de eliminar o parasito (KANE.; MOSSER, 2001). Portanto, concluiu-se que a vulnerabilidade vista na LC é intrinsecamente relacionada a concentrações altas de IL-10.

Ainda relacionada a inibição da resposta imune das citocinas do perfil Th1, após a infecção com *L. major*, observou-se que as citocinas IL-10 e IL-4, direcionam e elevam a frequência das células T CD4 regulatórias (Treg). Notou-se que as células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se encontravam em maior frequência nas lesões crônicas da LC causada por *L. major* em BALB/c (KANE et al., 2001). É importante mencionar que a IL-10 é indispensável para balancear a resposta imune pró-inflamatória vista na LC, pois inibem as respostas das células TCD4<sup>+</sup> Th1. Na ausência de IL-10, o excesso das citocinas tais como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12, podem ser tóxicas e conseqüentemente causar dano tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998).

Na última década, vem sendo elucidado, no modelo de LC, o papel das células Th17 e as secreções das citocinas induzidas por elas, principalmente as IL-17, IL-21, IL-22 e quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL8 e CXCL10) (CHARMOY et al., 2010). Para que ocorra a polarização e manutenção do padrão das células Th17 em humanos e camundongos é necessário um microambiente com a presença de TGF- $\beta$ , IL-6, IL-21 e IL-23, além dos receptores órfãos do ácido retinoico (ROR- $\alpha$  e ROR- $\gamma$ t) (GHORESCHI et al., 2010).

Avaliou-se que camundongos BALB/c infectados com *L. major* e com maior progressão da doença, apresentaram maior secreção da quimiocina CXCL2, acompanhado de um intenso recrutamento e infiltrado de neutrófilos persistentes na lesão. Isso foi devido a maior frequência das células Th17, secretando IL-17 na lesão. Este achado está envolvido com o fator genético, pois notou-se que a IL-17 é expressa em maiores concentrações no linfonodo de BALB/c infectados com *L. major* do que no linfonodo de camundongos C57BL/6 (LOPES JOSTKA et al., 2009). Ao se induzir a depleção do gene indutor de estresse, X-1(IEX-1), em camundongos C57BL/6, estes tornaram-se suscetíveis a infecção com *L. major*, devido a potencialização da produção de IL-17, pelos linfócitos Th17 (AKILOV et al., 2009)

A predominância de uma resposta do perfil Th-1, gerada pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, é estreitamente ligada a proteção na LC, causada pela *L. major*, em modelos murinos de leishmaniose. Todavia, a plasticidade destas células e a inflamação gerada por elas necessitam ser moduladas pela participação das citocinas e mediadores produzidos por diferentes subpopulações de células, incluindo-se os linfócitos CD4<sup>+</sup> do padrão Th2 e linfócitos T reguladores.

## 1.7 RELATOS DE CASOS E CO-INFECÇÕES NAS LEISHMANIOSES

Os dados epidemiológicos registrando a incidência de co-infecções nas Leishmanioses em animais e humanos têm sido crescentes em todo o mundo. No Rio de Janeiro, foram detectados, no baço e nas lesões de pele de cães com suspeita de leishmanioses, uma infecção simultânea com *L. braziliensis* e *L. infantum* (PIRES et al., 2015). Além de infecções com diferentes espécies de *Leishmania*, há também um relato de caso de um cão co-infectado com dois parasitos, *Toxoplasma gondii* e *L. braziliensis* (SILVA et al., 2015).

Em 2015, vários trabalhos relataram cães com leishmaniose e co-infectados com vírus e bactéria. Um destes relatos foi registrado na Turquia, onde mostrou-se a presença de cães co-infectados com *Leishmania infantum* e com *Toscana Vírus*, agente causador da meningoencefalite grave em humanos (DINCER et al., 2015). Amostras de cães domiciliados na região de Minas Gerais mostrou, por diferentes métodos diagnósticos (PCR, ELISAs e Imunofluorescência), cães co-infectados com: *Leishmania spp*, *Babesia spp* e *Ehrlichia spp* (KRAWCZAK et al., 2015).

Nos últimos 15 anos, grupos de pesquisa empenharam-se em investigar humanos co-infectados com leishmanioses e outros patógenos. Em diferentes países, há relatos de pacientes co-infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e com leishmaniose visceral e/ou cutânea (DAVARPANA et al., 2015). No Brasil, em 2012, foram constatados mais de 250 casos de humanos com HIV e LV (LINDOSO et al., 2014).

Além de relatos de casos de humanos com HIV nas leishmanioses, na literatura, há registros de pacientes com LV e co-infectados com o vírus *Epstein Barr*, causador da linfocitose hemofagocítica secundária. O *Epstein Barr* compromete os linfócitos TCD8 e macrófagos, induz altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, além de hemofagocitose e

hepatoesplenomegalia (DOMINGUEZ et al., 2015). A possibilidade de co-infecções na leishmaniose, tem consequências graves, e podem levar o paciente à morte. Assim, no Sudão, casos de pacientes com LV co-infectados com o vírus da hepatite B/C quando tratados com o antimonial pentavalente, estibogluconato de sódio, droga hepatotóxica, apresentaram agravamento do quadro clínico (ABUBAKR et al., 2014).

No intuito de se avaliar a resposta de memória específica em co-infecções na LC, camundongos C57BL/6 foram infectados com *Listeria monocytogenes* e, posteriormente, desafiados com *L. major*. Observou-se que esses animais co-infectados não apresentaram alteração na carga parasitária, entretanto, apresentaram uma lesão maior (CROSBY et al., 2014). Esses achados foram associados com um aumento dos linfócitos TCD8, maior liberação de granzima-B e intensa resposta inflamatória local. Camundongos quando infectados com o vírus da coriomeningite linfocítica e, posteriormente, co-infectados com *L. major* apresentam uma maior lesão, e isso foi associado ao aumento do número de células TCD8+NKG2D+ e à diminuição de IFN- $\gamma$ . Ao eliminar o vírus, rapidamente ocorreu a resolução da lesão patológica (CROSBY et al., 2015).

Flamme e colaboradores, utilizando 2 parasitos co-endêmicos, o *Schistosoma mansoni* e *L. major*, provaram que a esquistossomíase retarda a resolução da LC. Nesse estudo, observou-se que nos camundongos, 4 semanas após a co-infecção, ocorreu a diminuição da indução de IFN- $\gamma$  e de óxido nítrico no linfonodo. Esse achado foi associado à presença do *Schistosoma mansoni* induzindo a secreção de IL-4 e, como consequência, houve diminuição da ativação macrofágica, necessária para destruição da *Leishmania* (FLAMME et al., 2004).

Avaliando-se a deficiência da função das células dendríticas humanas *in vitro*, na co-infecção com *Plasmodium falciparum* e *L. donovani*, demonstrou-se que a *Leishmania* predomina no direcionamento das células dendríticas com alta produção de IL-10, silenciando a resposta imune contra a malária (BOGAART et al., 2015).

## 1.8 TRYPANOSOMIASE AFRICANA HUMANA, OUTRA DOENÇA TROPICAL NEGLIGENCIADA

Tripanosomiase Africana Humana (HAT), conhecida popularmente como doença do sono, é uma doença transmitida pela mosca Tsé-tsé, da família Muscidae, do gênero *Glossina spp.* A HAT atingiu, aproximadamente, 30 países no continente Africano, e estima-se que 20.000 pessoas estejam infectadas com o agente causador da HAT (SUTHERLAND et al., 2015).

A HAT é causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* (crônica) ou *T. b. rhodesiense* (aguda). Existe outra sub-espécie, o *T. b. brucei*, que infecta apenas os animais domésticos e de reprodução como, equídeos, ovinos, bovinos, dentre outros, causando nesses animais, um quadro de pirexia, letargia, anemia e edema. Esse último agente, o *T. b. brucei* causa nos animais uma doença chamada Nagana. Essa infecção causa impacto econômico negativo na produção de leite e carne no continente sub-saariano Africano (DESQUESNES et al., 2013).

Independente de qual seja a espécie, uma vez que a mosca Tsé-Tsé inocula os *Trypanosoma* procíclicos (localizados nas glândulas salivares) na pele do hospedeiro, eles sofrem uma rápida transformação e multiplicação. Esses parasitos, no estágio inicial, atingem a corrente sanguínea, multiplicando-se assexuadamente no sistema hemolinfático e, devido à parasitemia oscilante, causam sintomatologia inespecífica. No estágio mais tardio, chamado meningoencefálico, os parasitos atravessam a barreira hematoencefálica e invadem o sistema nervoso central causando a deterioração das funções cerebrais e, por fim, levando o animal ou o ser humano à morte (MACLEAN et al., 2010).

A variabilidade genética dos antígenos de membrana do *T. b. brucei* é o maior desafio que o sistema imune do hospedeiro vertebrado lida para controlar a infecção. A cada multiplicação do parasito, são rearranjadas as transcrições dos 1000 genes responsáveis pelas expressões das glicoproteínas de superfície, as VSG (variable surface glycoprotein), do *Trypanosoma*. Como consequência, há uma exaustão na eficiência da produção de anticorpos específicos contra os antígenos de superfície do *Trypanosoma* (revisto em ACHCAR, KERKHOVEN, BARRETT., 2014). Essa variabilidade nas mudanças das proteínas do VSG dificulta a possibilidade da criação de uma vacina eficaz contra esse patógeno.

## 1.9 O ENCONTRO DO *TRYPANOSOMA* E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

Existem estágios críticos da regulação da resposta imunológica contra o *Trypanosoma brucei*. Uma etapa importante é através da resposta imune inata, onde o sistema imune reconhece os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Um dos principais PAMPs dos tripanosomatídeos são as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), resíduos encontrados na superfície das proteínas de membrana do parasito (PAULNOCK, FREEMAN e MANSFIELD, 2010).

Estudos têm mostrado que, na fase inicial da infecção, os GPIs ativam os eventos das cascatas subcelulares de ativação das vias de NFκB e MAPK e genes pró-inflamatórios. Estes mecanismos induzem macrófagos e células dendríticas a produzirem fatores antimicrobianos como: ROS, RNI, e TNF. Ocorre também a produção de citocinas pró-inflamatórias como: IL-6, IL-12 e IFN-γ (HANRAHAN et al., 2009). Existe uma correlação direta entre a exposição à GPI e a morte do Trypanosomatídeos. A GPI aumenta a expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias incrementando a atividade das células apresentadoras de antígenos (APC). Devido ao aumento significativo de IL-12 ocorre a ativação de células NK e produção de IFN-γ, induzindo a polarização das células T (COLLER e PAULNOCK., 2001).

As glicoproteínas variantes de superfície (VSG) do *Trypanosoma sp* são as principais responsáveis pela ativação da resposta imune adaptativa. Na tripanossomíase, os marcadores MHC-II, CD80 e CD86, presentes em macrófagos e DC, são considerados responsáveis pela polarização das células Th-1 em camundongos (WÄLLBERG; HARRIS, 2005). O resultado protetor contra o *Trypanosoma*, tem ação direta das células TCD8, as principais indutoras da produção de IFN-γ que resulta na secreção de óxido nítrico para o controle da parasitemia. Os experimentos de Liu e colaboradores mostram que, a IL-27 é responsável por inibir a hiperativação de células T CD4, evitando a exacerbação da resposta inflamatória mediada por IFN-γ (LIU et al., 2015).

Por outro lado, a exacerbação da resposta inflamatória causado pelo parasito pode ter efeitos prejudiciais para o sistema do hospedeiro. Demonstrou-se que, camundongos deficientes para células T regulatórias (Treg) possuem maior inflamação, anemia e lesão de tecido, consequentemente aumenta a sobrevivência do *Trypanosoma brucei*. Ao usar CD28 para expandir as células Treg houve uma diminuição de IFN-γ, TNF e NO, prolongando a

sobrevivência dos camundongos infectados (GUILLIAMS et al., 2008). É importante mencionar que uma intensa resposta imune, com alta produção de IFN- $\alpha$  e  $\beta$ , facilita a infiltração do *Trypanosoma* no cérebro.

Ao utilizar camundongos deficientes para TLR-9, estes foram capazes de controlar a infiltração das células T no cérebro e consequentemente a entrada oportunista do parasito. Nesse mesmo estudo, evidenciou-se que a infiltração de *T. b. brucei* no cérebro de camundongos é dependente da atuação da imunidade inata, sobre os receptores TLR das células T, e por consequência maior expressão de IFN- $\beta/\alpha$  e TNF (AMIN et al., 2012).

A modulação da resposta imune na infecção com o *Trypanosoma*, tem ação direta sobre outras doenças. Camundongos BALB/c imunizados com glicoproteína de oligodendrócitos de mielina e infectados com *T. b. brucei*, controlam a resposta auto-imune. Este fato foi associado à menor produção de IFN- $\gamma$  no linfonodo, ao menor número de células apresentadoras de antígeno no baço, além de baixos títulos de IgG anti-oligodendrócitos de mielina no soro (WALLBERG.; HARRIS, 2005).

O grupo de Radwanska mostrou que, em camundongos C57BL/6, após a resolução da infecção com *T. b. brucei*, houve perda da população de células B da zona marginal do baço. Observou-se que esses animais perderam a resposta de memória protetora adquirida anteriormente (antes da tripanossomíase) pelas vacinas de difteria e tétano. O *T. b. brucei* desabilita a capacidade responsiva das células B em produzir anticorpos específicos contra antígenos vacinais, sendo este um fator importante para o planejamento das campanhas de vacinação das pessoas que vivem em áreas endêmicas para Tripanossomíases (RADWANSKA et al., 2008)

#### 1.10 RELEVÂNCIA DO ESTUDO DA CO-INFECÇÃO *T. B. BRUCEI* / *L. MAJOR*

O ser humano, juntamente com todos os outros animais, está, ao longo da vida, exposto a diferentes espécies de fungos, bactérias, vírus e parasitos. O risco de contrair alguma infecção é algo que acompanha a existência da vida e a possibilidade de, simultaneamente, adquirir uma das co-infecções, é um fato comprovado.

A figura 1, mostra a distribuição de casos da LC no continente africano registrados em 2014. É notório que existem registros de casos na maioria dos países. Os países que fazem fronteira com o continente supramencionado também têm a presença do vetor transmissor da LC. Por diferentes interesses, ocorre o trânsito constante de pessoas nos países dentro e fora do continente. Tal movimento migratório favorece o transporte de diferentes patógenos.

A figura 2, mostra o mapa do continente africano, enfatizando, a distribuição de casos da Tripanossomíase humana, quer seja causada por *T. b. gambiense* ou *T. b. rhodesiense*, nos anos de 2000-2009. A doença do sono, por ser uma parasitose vetorial negligenciada, nos últimos 6 anos, não apresentou um controle eficiente. Conforme os dados atuais da OMS, em 2015, constataram-se a presença da mosca Tsé-tsé em 36 países, possível transmissora do *Trypanosoma brucei*. Estima-se que 65 milhões de pessoas correm risco de adquirir a doença do sono.

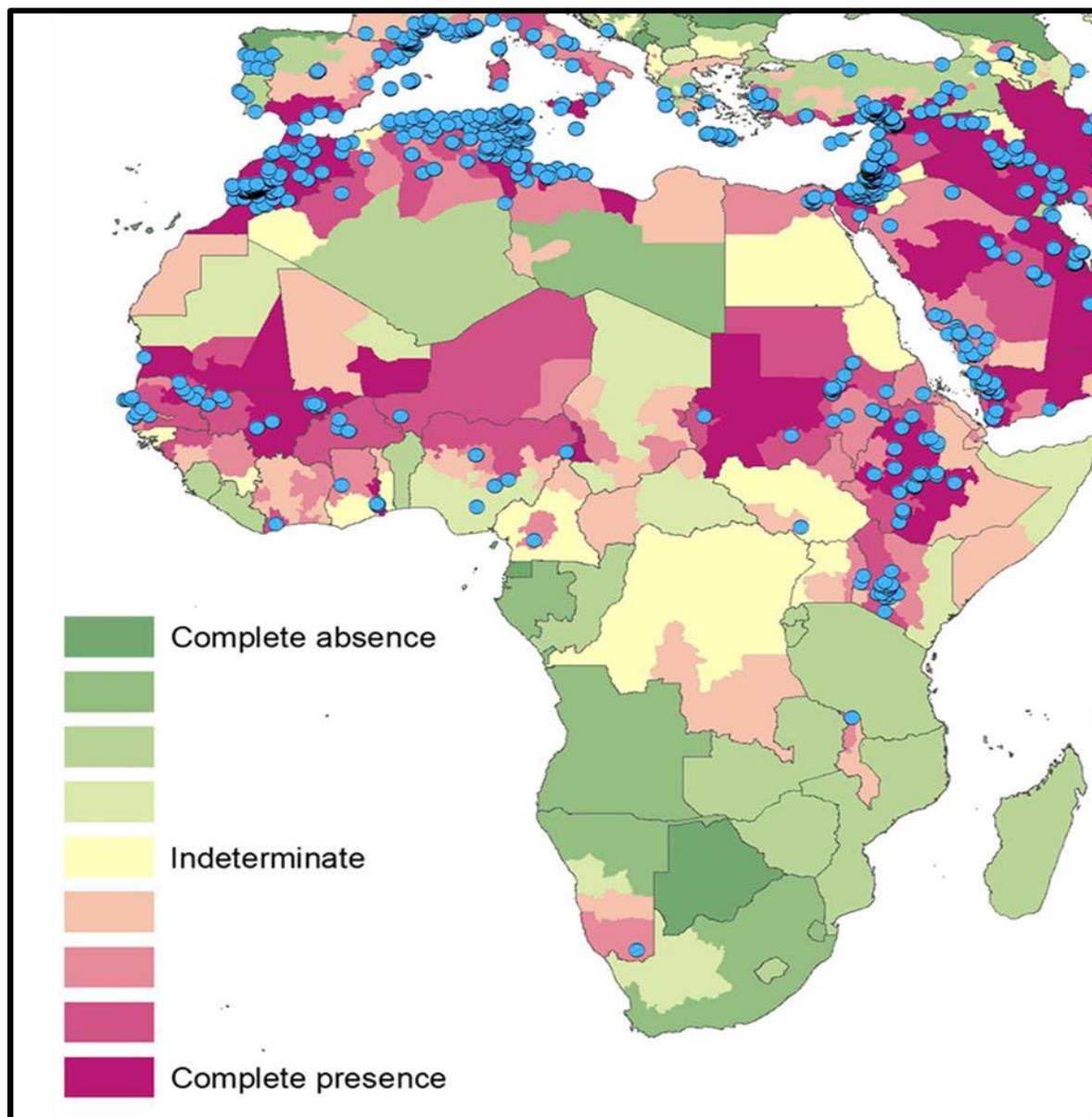
Ao analisar, em ambos os mapas, a distribuição dos casos de LC e a doença do sono (Fig.1 e 2), nota-se que, no continente africano, existem países com áreas com presença de ambas as parasitoses. O sistema imune está exposto a inúmeros agentes infecciosos e, muitas vezes, esses patógenos conseguem subverter os mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao seu próprio favor. Em alguns casos de co-infecções, o sistema imune, na tentativa de eliminar um patógeno, pode atenuar ou agravar indiretamente o estabelecimento do outro microrganismo. Assim, investigar os mecanismos que os patógenos utilizam para escapar do sistema imune é indispensável para adotar uma terapêutica correta e obter diagnósticos diferenciados.

Sabe-se que a destruição da *Leishmania* está associada a uma forte resposta do tipo Th1, com produção de IFN- $\gamma$ . Compreende-se que, em alguns momentos, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> podem desencadear mecanismos que influenciam o quadro da LC, exacerbando ou protegendo o hospedeiro da infecção. Entretanto, com relação à presença de um segundo patógeno, como no quadro de co-infecção, os dois microrganismos, são capazes de coordenarem as funções das células da resposta imune inata e adaptativa e estes fatores não foram completamente esclarecidos na LC.

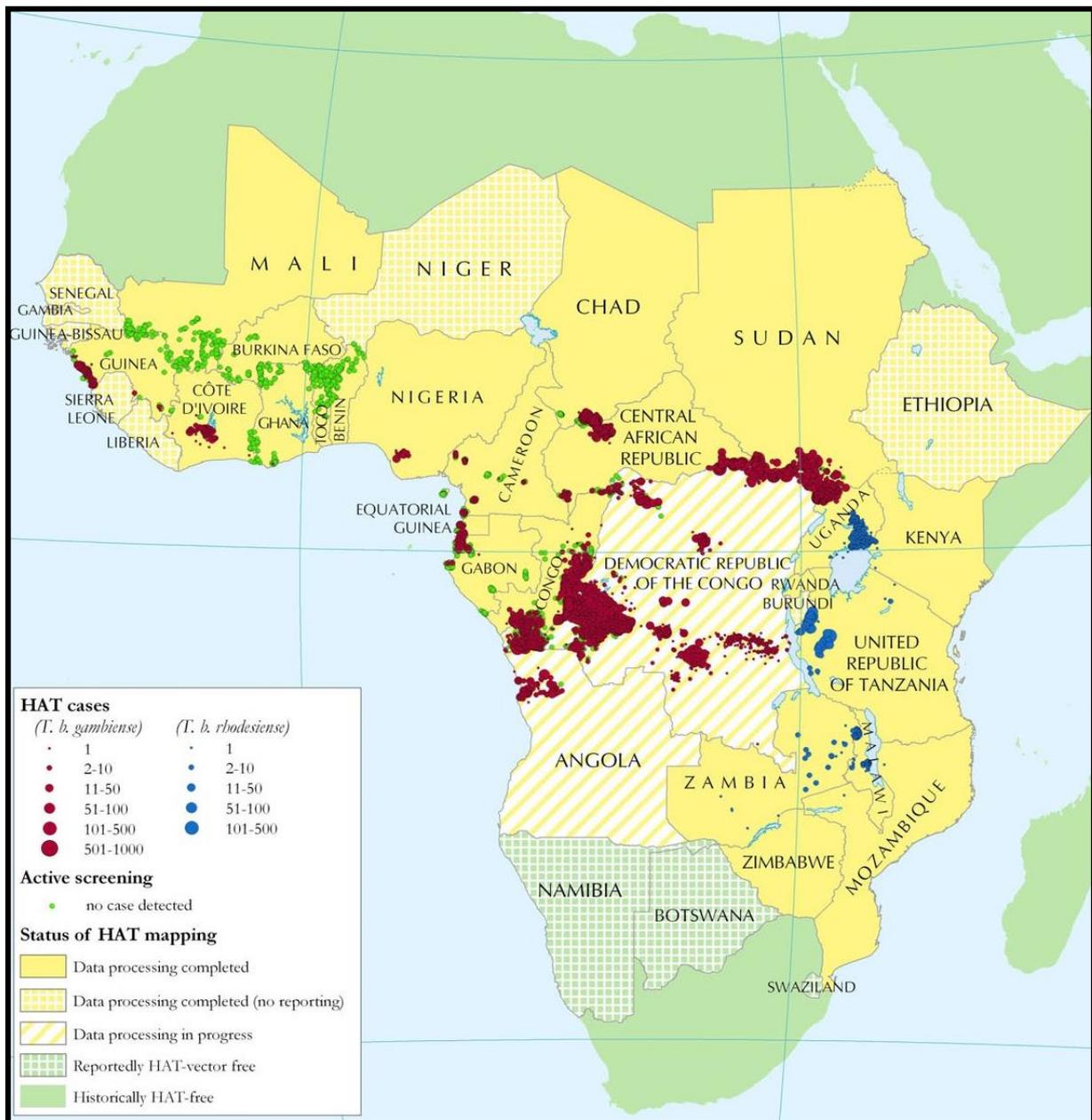
Na tripanossomíase, há um perfil de resposta imune diferente, quando compara-se à leishmaniose. Há uma ativa resposta do tipo Th2, com intensa produção de anticorpos devido

às variabilidades constantes das proteínas de superfície do parasito, a cada multiplicação. O quadro infeccioso é acompanhado da exacerbação da produção de citocinas com atividades pró-inflamatórias. As altas concentrações de IFN- $\gamma$  sistêmico têm mostrado serem relevantes para destruir o *T. brucei* por ativarem macrófagos a produzirem óxido nítrico.

Um dos objetivos deste estudo é mostrar, experimentalmente, o que acontece com a resposta imune na co-infecção com *L. major* e *T. b. brucei*, entendendo o mecanismo utilizado pelo sistema imunológico quando, simultaneamente, lida com ambas as parasitoses. Os resultados desta pesquisa permitem ampliar o conhecimento da resposta imune na infecção por *Leishmania major* transmitida naturalmente pelo vetor flebotomíneo, evidenciando a influência da resposta imune contra *T. b. brucei* na infecção pela *L. major*.



**Figura 1**– Distribuição da LC no continente africano, 2014. Consenso de evidência da doença: Verde - ausência completa: -100%. Púrpura - presença da doença: +100%. Círculos azuis- área com maior ocorrência da doença. Fonte: eLife. Pigott et al., 2014.



**Figura 2**– Número de casos de Tripanossomíase humana no continente africano, 2000-2009. Fonte: International Journal of Health Geographics, Simarro et al., 2010.

## 2 HIPÓTESE

O *T. b. brucei* modula a resposta imune das células T e como consequência a infecção causada pela *Leishmania major*.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a co-infecção com *T. b. brucei* influencia o curso da leishmaniose cutânea causada por *L. major*.

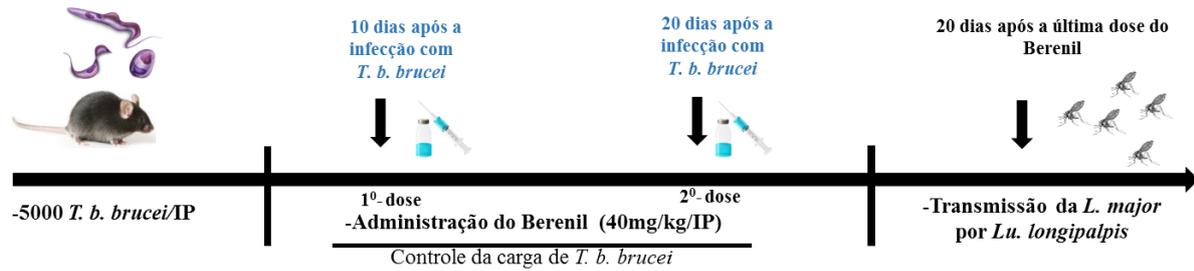
### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar o resultado da co-infecção com *T. b. brucei* sobre a carga parasitária e lesão da leishmaniose cutânea, após infecção pela *L. major* transmitida pela picada de *Lu. longipalpis*.

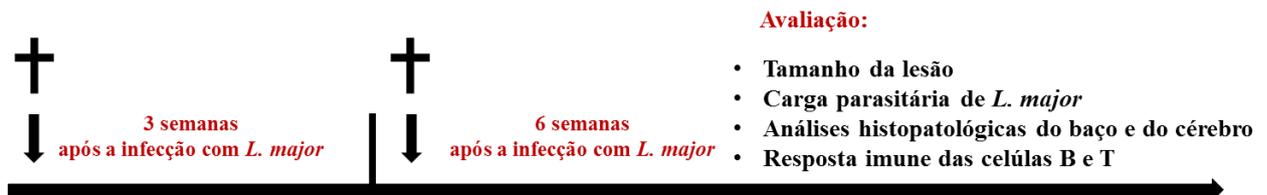
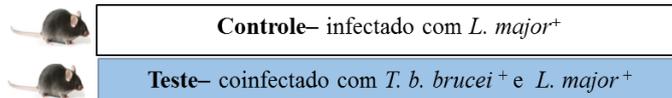
-Avaliar como a infecção com *T. b. brucei* influencia o perfil de citocinas no local da lesão causada pela *L. major*.

-Determinar como a infecção com *T. b. brucei* modula sistemicamente as células T e B, antes e após a infecção pela *L. major* transmitida pela picada de *Lu. longipalpis*.

#### 4-Desenho experimental



#### GRUPOS



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Os camundongos C57BL/6, fêmeas, com idade de 6 semanas, foram fornecidos pelo Charles River Laboratories (Wilmington- USA) e mantidos sobre os cuidados do biotério NIAID DIR Animal Care. Foram seguidas as instruções do guia de cuidados (NIH OACUARAC) para animais de laboratório. Os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela comissão de ética no uso de animais, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Animal Care- Rockville, Maryland, USA, protocolado com a numeração LMVR4E.

### 5.2 GRUPOS DE ANIMAIS AVALIADOS

Os ensaios foram realizados em camundongos, divididos em 2 grupos experimentais. Controle Negativo (infectados com *L. major*), Grupo Teste (infectados com *Trypanosoma brucei*, tratado com Berenil e, posteriormente infectados com *L. major*). Desse modo, em cada experimento realizado, tinham 5 animais por grupo. Vale ressaltar que todos os ensaios foram repetidos 3 vezes, totalizando-se 15 animais por grupo.

### 5.3 INFECÇÃO DOS ANIMAIS COM *TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI*

O parasito *Trypanosoma brucei brucei* (Antat 1.1), esta cepa, foi cedida pelo colaborador Stefan Magez (Laboratory for Cellular and Molecular Immunology, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium). Os parasitos foram isolados do baço de camundongo C57BL/6 infectados, durante 10 dias, com  $10^3$  do parasito. Para cada baço macerado, foi acrescentado 20mL RPMI (Sigma-Aldrich), posteriormente a suspensão de células foi centrifugada 1500rpm/10min/4C. O sobrenadante foi removido, ressuspendeu-se o sedimento em 1mL de RPMI e foram acondicionados a -70C, em alíquotas de 100uL.

No momento da infecção, os parasitos foram descongelados em temperatura ambiente, diluídos em 1mL do meio RPMI (Sigma- Aldrich) e contados em câmara de Neubauer. Cada animal do grupo teste (infectados com *Trypanosoma brucei brucei* e posteriormente infectados

com *L. major*), foram previamente infectados com 5000 *T. brucei brucei*/50uL pela via intraperitoneal.

Para avaliação da carga parasitária de *T. b. brucei* coletou-se sangue na veia caudal desses animais, 4 dias depois da infecção apenas com *T. b. brucei* e após a transmissão da *L. major*. A confirmação morfológica do *T. b. brucei* realizou-se usando-se o Panótico Rápido, uma técnica de coloração hematológica que permite a visualização de lobos nucleares das células. As lâminas com as extensões do sangue periférico dos animais, foram submersas por 5 segundos, em cada uma das soluções, seguindo esta sequência de triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1%. Em seguida foi contado o número de *T. b. brucei* no esfregaço sanguíneo destes animais, e calculado o número de *T. b. brucei* sistêmico durante o curso do experimento.

#### 5.4 PROTOCOLO TERAPÊUTICO, PARA CONTROLE DA CARGA DE *T. B. BRUCEI* NOS CAMUNDONGOS.

Os camundongos do grupo teste (co-infectados), 30 dias antes da transmissão natural com *L. major*, foram previamente infectados com 5000 *T. b. brucei* por via intraperitoneal (ip). Com o objetivo de controlar a carga de *T. b. brucei*, os animais do grupo teste foram tratados com o Aceturato de Diminazeno (Berenil), fabricado pela Sigma-Aldrich. A droga, foi diluída em água para injeção, na posologia de 40mg de Berenil/kg por camundongo. Os animais foram tratados com 100uL desta concentração, pela via intraperitoneal.

A terapêutica adotada foi a seguinte: primeira dose do tratamento com Berenil, 10 dias após a infecção com *T. b. brucei* e a segunda dose do Berenil, 18 dias após a infecção (ou seja, uma semana após a primeira dose). Este grupo teste foi mantido por 6 semanas após a co-infecção com *L. major*.

Durante todo o experimento avaliou-se o número de *T. b. brucei* no sangue dos animais. Coletou-se, 2.5uL de sangue diretamente da veia caudal dos camundongos, diluiu-se em 500uL PBS e realizou-se a contagem direta dos parasitos na câmara de Neubauer utilizando-se o microscópio óptico.

## 5.5 ISOLAMENTO DA *L. MAJOR* PARA INFECÇÃO ARTIFICIAL

Para realização da infecção artificial dos flebotomíneos, utilizamos amastigotas de *L. major* (MHOM/IL/80/Friedlin) originalmente isoladas, da lesão de um paciente com LC de Israel) isoladas da pata de camundongo BALB/c. A pata foi lavada, uma vez em Iodine, e segunda vez, em Etanol 70%, e posteriormente lavada 5 vezes em PBS. Foi incisionada a derme, e macerada a pata em uma peneira de 40nm (Fisher Scientific, USA). Adicionou-se 40 mL de PBS, centrifugou-se a 3500rpm por 15min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento com as amastigotas, foi ressuspensão em 50µL de PBS. As amastigotas foram diluídas (1/1000) e contadas, em câmara de Neubauer, utilizando-se o microscópio óptico. As amastigotas foram aliqüotadas na concentração de 10<sup>8</sup>/mL e mantidas em uma solução de Glicerol 10%, no meio de cultura Schneider (LGC, São Paulo, BRASIL), suplementado com 30% de soro bovino fetal inativado (SBF), (Gibco, Carlsbad, CA, USA), e posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido.

## 5.6 INFECÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS ATRAVÉS DA ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL

Os flebotomíneos, *Lutzomyia longipalpis*, com idade entre 5 a 7 dias, foram obtidos de fêmeas da própria colônia do Laboratório do National Institutes of Health, Rockville, Maryland, USA. Foram seguidas as normas preconizadas de segurança do insetário (VMBS, LMVR, NIH). Para cada infecção artificial, foi necessário retirar da colônia em torno de 1200 flebotomíneos de *Lutzomyia longipalpis*.

As amastigotas, previamente estocadas no nitrogênio líquido, foram resuspensas e lavadas em 40mL PBS 1X, e em câmara de Neubauer (1:1000), foram contados os parasitos viáveis. Adicionou-se 5x10<sup>6</sup> amastigotas/mL ao sangue desfibrinado de coelho. Utilizou-se para cada mL de sangue, 30uL dos antibióticos, penicilina, 100 UI/ml, e de estreptomicina, 100 µg/ml, além de 2mM de L-glutamina a 25°C (Gibco, Carlsbad, CA, USA).

Os alimentadores, foram preparados, com membrana proveniente de pele de frango (*Gallusgallus domesticus*), com idade, de no máximo de 10 dias. Inicialmente, a membrana foi lavada com álcool à 70%, por um minuto e cinco vezes com PBS e em seguida, fixada na base inferior do alimentador artificial. Os alimentadores foram dispostos individualmente sobre recipientes que possuem na sua parte superior uma malha de tecido por onde ocorre a

alimentação dos flebotomíneos. Em seguida o sangue contendo as amastigotas, foi adicionado ao alimentador (aproximadamente 800 $\mu$ L/alimentador). Os alimentadores foram conectados a um equipamento de Banho-Maria, com temperatura mantida a 40°C. O sistema, com os flebotomíneos no insetário, foi mantido no escuro durante 3 horas.

Logo após a alimentação, todas as fêmeas, foram anestesiadas com CO<sub>2</sub>, e separadas, gentilmente, das não alimentadas. Apenas as fêmeas que tinham o seu intestino, visivelmente cheio de sangue, foram transferidas para novos recipientes, para acompanhamento da sobrevivência e avaliação da infecção.



Infeção artificial dos *Lu. longipalpis*

Alimentadores com sangue contendo *L. major*

**Figura 3-** sistema de alimentação artificial dos flebotomíneos.

Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.7 ESTIMATIVA DA CARGA DE *L. MAJOR* NO INTESTINO DO *LU. LONGIPALPIS*

Os flebotomíneos infectados foram mantidos em uma incubadora B.O.D, a 26°C com 80-90% de umidade e com uma dieta hiper saturada de açúcar a 30%. Nos tempos de 2, 5 e 8 dias, após a alimentação artificial, realizou-se a análise dos intestinos médio por dissecação, para a confirmação da presença, desenvolvimento e viabilidade da *Leishmania* no trato digestivo do vetor.

No oitavo dia após a infecção, horas antes da transmissão para os camundongos, foram dissecados de 10 a 15 intestinos, colocados individualmente, em 30 $\mu$ L de PBS e macerados. Separadamente em cada intestino, foram quantificados, a carga de *L. major*, e quantas destas eram metacíclicas.

## 5.8 TRANSMISSÃO DA *L. MAJOR* PARA OS CAMUNDONGOS E ESCORE DA ALIMENTAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os camundongos foram anestesiados com uma solução de 200uL de PBS, contendo 20% de Ketamina e 10% de Xilazina, pela via intraperitoneal. Depois de uma hora, após ter se iniciado a transmissão, com a finalidade, de se manter os animais contidos e confortáveis, até o fim do processo, foi realizado um reforço anestésico, com 50% (100uL/intramuscular), da dose utilizada inicialmente. Nos animais do grupo controle e teste, as orelhas esquerdas foram expostas, durante 2 horas, a picadas de 10 *Lu. longipalpis* infectados com *L. major*.

Após 2 horas, cada alimentador contendo os flebotomíneos, foram retirados e levados para o microscópio óptico invertido, para contagem das fêmeas alimentadas. Realizou-se, então o escore do repasto sanguíneo, com o objetivo de se identificar quantas fêmeas infectadas, possivelmente devem ter realizado a transmissão do parasito no momento da alimentação. Classificou-se a qualidade da alimentação considerando-se a quantidade de sangue no intestino como não alimentado (sem sangue), parcialmente alimentado (pouco) ou totalmente alimentado (repleto).



**Transmissão natural: orelha do camundongo sendo exposta, a picadas de *Lu. longipalpis* infectados com *L. major*.**

**Figura 4-** Transmissão natural da *Leishmania spp.*

Fonte: elaborado pelo autor.

## 5.9 MENSURAÇÃO DA LESÃO

A(s) lesão(ões) na orelha infectada foi monitorada, com um paquímetro digital (Thomas Scientific), a cada 2 semanas, durante 6 semanas. A maioria dos animais apresentou mais de uma lesão, então todas foram mensuradas e somadas.

#### 5.10 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *LEISHMANIA* POR DILUIÇÃO LIMITANTE

Após a eutanásia dos animais, foi retirado o linfonodo auricular drenante, esquerdo, da mesma orelha exposta, durante a transmissão natural com os flebotominéos infectados com *L. major*. A determinação da carga parasitária de *Leishmania* foi realizada 3 e 6 semanas após a transmissão da *L. major*. Individualmente, os linfonodos foram macerados com 200µL de meio Schneider completo (Sigma, St Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro bovino fetal, a 1% de 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100U/mL de estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Retirou-se 50µL do homogeneizado do linfonodo, e realizou-se as diluições seriadas que variaram de 1:2 à 1:100000 em placas de 96 poços contendo meio sólido NNN ágar sangue (Novy-MacNeall-Nicolle) (NICOLLE, 1909). As placas foram analisadas em microscópio invertido para verificação do aparecimento de formas promastigotas de *L. major* a partir do terceiro até o décimo dia de cultura. Neste período, as placas foram incubadas numa estufa BOD a 23°C. A carga parasitária dos linfonodos foi analisada, utilizando-se a técnica de diluição limitante descrita previamente por TITUS e colaboradores (1991).

#### 5.11 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

Os fragmentos dos tecidos (cérebro e baço) foram coletados após 10 dias da infecção com *T. b. brucei*, 3 e 6 semanas após a co-infecção com *T. b. brucei* e *L. major*. Os fragmentos foram fixados em formalina a 10% por 24 horas e processados pela técnica histológica de rotina para inclusão em parafina no setor de histotecnologia, da Infectious Disease Pathology Section (IDPS)/NIAID/DIR CMB- USA. Realizou-se microtomia com obtenção de cortes com 4-5 micrômetros de espessura que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (H&E), montados com auxílio de lamínula e Bálsamo do Canadá sintético. Os cortes histológicos foram posteriormente avaliados por microscopia ótica quanto à presença de alterações relevantes no quadro destas doenças. Todos os cortes foram analisados, juntamente com o Médico Veterinário e Patologista do IDPS, Dr. Ian Moore.

### 5.12 ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI- SLA

Os títulos de anticorpos anti-SLA (*Soluble Leishmania Antigen*) foram mensurados 10 dias após a infecção com *T.b.brucei* e 6 semanas após a co-infecção com *L.major*.

Para a realização dos ELISAs e detecção dos anticorpos anti-SLA, as placas foram sensibilizadas, com 50µL/poço, contendo 20µg de SLA/mL em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6. As placas de 96 poços, sensibilizadas foram incubadas durante à noite a 4°C. Pela manhã, foram realizadas três lavagens, com 300µl/poço, de PBS Tween 20 0,05% e os sítios inespecíficos foram bloqueados, utilizando-se 200µl/poço, de PBS Tween BSA (Albumina Bovina), contendo 4% de BSA por 2h a 37°C. Foram realizadas mais 3 lavagens com PBS Tween 0,05% (250µl/poço) e adicionou-se 50µL/poço dos soros diluídos 1/100 em PBS Tween 0,05% e incubou-se por 1h a 37°C. Após 6 lavagens com PBS Tween 0,05% (300µl/poço), adicionou-se 50µl/poço do anticorpo anti-imunoglobulina G (IgG) total de camundongo diluído a 1/1000 em PBS Tween 0,05% em BSA 4%, as placas foram incubadas por 1h a 37°C. Em seguida, os poços das placas foram lavados 9 vezes com PBS Tween 0,05% e incubadas com 100µl/poço do substrato p-nitrofenil fosfato na concentração de 1mg/mL (BD Biosciences) por 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura dos poços das placas foi realizada em um espectrofotômetro leitor de ELISA, em comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em Densidade Ótica (OD). Todas as amostras foram testadas em triplicatas, e todas as placas tiveram como controle soro de animais negativo e positivo para SLA.

### 5.13 ELISA PARA DETECÇÃO DE IGG ANTI- ANTAT1.1 LISADO, ANTAT 1.1 SVSG E MICROFILÁRIA.

Para confirmar se havia realmente uma reação cruzada entre os anticorpos induzidos pela infecção por *T. b. brucei*, títulos dos anticorpos foram mensurados em 3 momentos do experimento: antes da infecção com *T. b. brucei*, 10 dias após a infecção com *T. b. brucei* e 6 semanas após a co-infecção com *T. b. brucei* e *L. major*. Quantificou-se, os títulos de anticorpos anti AnTat1.1 Lisado (antígeno bruto total solúvel do parasito total) e Antat1.1 sVSG (uma proteína de superfície purificada), ambos oriundos do *Trypanosoma brucei brucei*. Utilizou-se no mesmo protocolo, um antígeno total de *Microfilária*, um outro parasito (não tripanossomatídeo).

Para a realização da ELISAs, para a detecção de anticorpos anti-AnTat1.1 Lisado e AnTat 1.1 sVSG, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com 10µg/mL de cada um dos antígenos separadamente em placas distintas. Ambos os antígenos, foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6, 100µL/poço, incubadas durante à noite a 4°C. Foram realizadas três lavagens, com 300µl/poço, de PBS Tween 0,1% e os sítios inespecíficos foram bloqueados, utilizando-se 200µl/poço, de PBS Tween com 0.5% de BSA, por 2h a 37°C. Foram realizadas mais 3 lavagens com PBS Tween 0,1% (250µl/poço) e adicionou-se 50µL/poço dos soros diluídos 1/50 em PBS Tween 0,1% e incubou-se 100uL/poço, por 2h/37°C. Após 3 lavagens com PBS Tween 0,1% (300µl/poço), adicionou-se 50µl/poço do anticorpo anti-imunoglobulina G (IgG) total de camundongo diluído a 1/1000 em PBS Tween 0,1% em BSA 0.5%, as placas foram incubadas por 1h/37°C. Em seguida, os poços das placas foram lavados 3 vezes com PBS Tween 0,1% e incubadas com 100µl/poço do substrato p-nitrofenil fosfato na concentração de 1mg/mL (BD Biosciences) por 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura dos poços das placas foi realizada em um espectrofotômetro de leitor de ELISA, em comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em Densidade Ótica (OD). Todas as amostras foram testadas em triplicata, e todas as placas tiveram como controle soro de animais negativo e positivo para os antígenos testados.

#### 5.14 EXTRAÇÃO DE RNA E PREPARO DO CDNA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS NA ORELHA

As células da orelha dos camundongos foram utilizadas para obtenção de RNA, para quantificar a expressão de genes das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF, IL-10, IL-4 e IL-2), no local da lesão. A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit obtido comercialmente Ambion kit (Lifetechnologie).

Após adicionar 10uL de 2-mercaptoethanol/mL ao tampão de lise, utilizou-se 1mL dessa solução para cada amostra (orelha). Em seguida, foram adicionados 300uL de EtOH 70%. As amostras, foram transferidas para uma coluna com filtro (Ambion Kit), e centrifugadas a 12000g por 30 segundos. Adicionou-se 350uL do Tampão de Lavagem-I, e foram centrifugadas a 12000g/30 sec. Sobre a membrana da coluna, foram adicionados 80uL do PureLink DNase mix e incubadas por 15min a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se à coluna, 500uL de tampão de lavagem II (com/EtOH) e centrifugou-se a 12000g por 30 segundos. Em seguida, adicionou-se, 30uL de água RNase-free no centro da coluna,

incubando-a por 1min a temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000g/2min. As amostras, foram mantidas no -70 °C até o momento do uso.

A síntese de cDNA foi realizada acrescentando-se 100ng de RNA a 4µL de qScript cDNA (SuperMix Superscript III, Invitrogen). A reação foi incubada no termociclador a uma temperatura de 25°C por 5 minutos, o próximo ciclo foi 42°C por 30min, posteriormente a temperatura de 85°C por 5 min. Em seguida as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

### 5.15 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL NA ORELHA

Os *primers* (oligonucleotídeos ou iniciadores) utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, EUA). O tamanho dos *primers* variou de 18 a 23 bases, a temperatura de anelamento ( $T_m$ , do inglês melting temperature) variou de 59°-61°C, o conteúdo de GC foi 40-60% e foram utilizados na concentração de 250nM. O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 90 a 110pb. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 384 poços, usando o reagente Perfect Master MIX (Roche Diagnostics), e o equipamento LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Os primers específicos dos genes analisados foram: IL-12/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ / IL-4/IL-10/IL-2. A curva standard de cada primer foi gerada como recomendada pelo fabricante. Os níveis de expressão dos genes de interesse alvo foram normalizados com os níveis de RNA endógenos da orelha de camundongos que não foram expostos a nenhum tipo de tratamento (controles).

### 5.16 CONTAGENS E LAVAGENS DAS CÉLULAS DO BAÇO

O baço foi macerado em peneiras com poros de 40µm com a ajuda de um êmbolo de seringa estéril. As células foram centrifugadas a 300g (10 min/4° C), e após descarte do meio, os eritrócitos foram lisados com ACK Lysis buffer (Lyfe technologies, USA), durante 5 minutos. As células foram lavadas novamente e ressuspensas em 5mL de meio completo de RPMI 1640 para contagem com o Trypan Blue Stain 0.4% (Gibco, Life Technologies, USA) em câmara de Neubauer.

### 5.17 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS B, DA ZONA MARGINAL DO BAÇO E **plasmócito**

Foi realizado um *pool* com as amostras de todos os baços de cada animal por grupo. Posteriormente, de cada grupo, retirou-se  $2 \times 10^6$  células, com o objetivo de se identificar as células da zona marginal do baço. Para isso, empregou-se citometria de fluxo, utilizando-se os anticorpos, CD23 (PerCP/Cy5.5, BioLegend) e CD21 (APC/Cy7, BioLegend), para as células da zona marginal do baço. Para as marcações dos plasmócitos utilizaram-se os anticorpos, CD138 (PE, BioLegend) e B220 (APC, BioLegend).

### 5.18 ENSAIO DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS NOS LINFÓCITOS POR CITOMETRIA

Suspensões celulares do baço, foram preparadas na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Em placas de 24 poços, distribuiu-se 1mL por poço, desta concentração. A seguir, adicionou-se individualmente as amostras de cada grupo (controle e teste), em poços individuais os seguintes estímulos:  $10 \mu\text{g/mL}$  de LJM-11 recombinante (A LJM-11 é uma proteína salivar oriunda do *Lutzomyia longipalpis*),  $50 \mu\text{g/mL}$  de SLA (*Soluble Leishmania Antigen*). Após 12 horas antes das células serem lavadas, para se iniciar a marcação,  $5 \mu\text{g/mL}$  de Concanavalina A (Con A), foram adicionados a cada poço, como controle positivo para proliferação de linfócitos. As culturas com os linfócitos foram incubadas por 24h a  $37^\circ \text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Quatro horas antes das 24 horas de incubação, foi adicionado  $3 \mu\text{g/mL}$  por poço de Brefeldin A (eBioscience, USA) em todos os poços.

### 5.19 FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS T E DOSAGENS DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Retirou-se  $2 \times 10^6$  células de cada poço (meio, ConA, LJM-11, SLA). As células de cada diferente abordagem experimental (estímulo), foram lavadas separadamente, em PBS 1X, 1400rpm por 5min e removido o sobrenadante. As células foram incubadas 2uL com o reagente Live/ Dead (Life Technologies) por 20 minutos, este reagente determina a viabilidade das células, distinguindo-as em vivas ou mortas. Posteriormente, foram lavadas com tampão Cell Staining (BioLegend), 1400rpm por 5min. Adicionou-se  $2 \mu\text{g}$  a cada  $10^6$  células de TruStain fcX/ anti-camundongo –CD-16/32 (BioLegend) por 10 min, com a finalidade de se bloquear a ligação imunoglobulina não específica para os receptores Fc, que são expressos principalmente

na superfície dos macrófagos, células NK, células B, granulócitos. Incubou-se, então, com os marcadores de superfície, CD-4 (PerCP, BD) e TCR- $\beta$  (APC- Cy7, BD), durante 30min a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com o tampão Cell Staining (BioLegend), 1400rpm por 5min, incubadas com 250 $\mu$ L de Cytotfix/Cytoperm por 20min. As células foram então lavadas com tampão PermWash 1800rpm por 8min, em seguida, removidos os sobrenadantes e colocados os anticorpos das marcações intracelulares: IFN- $\gamma$  (APC, eBioscience), IL-2 (PE-Cy7, BioLegend) e IL-10 (Pacific Blue, BioLegend). As células foram lavadas duas vezes com Perm Wash, 1800rpm por 8min. Para finalizar, as células foram lavadas e mantidas até o momento da leitura no tampão de Cell Staining. As células foram analisadas no aparelho MACSQuant (Miltenyi Biotec) e os dados foram analisados usando-se o programa FlowJo V10.

## 5.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Todos os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e desvio padrão. A análise estatística foi feita com o teste de Mann-Whitney, não paramétrico. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando  $p < 0.05$ , utilizando-se um intervalo de confiança de 95%.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARGA PARASITÁRIA DE *T. B. BRUCEI* NO SANGUE DOS ANIMAIS ANTES E APÓS A TRANSMISSÃO DA *L. MAJOR*

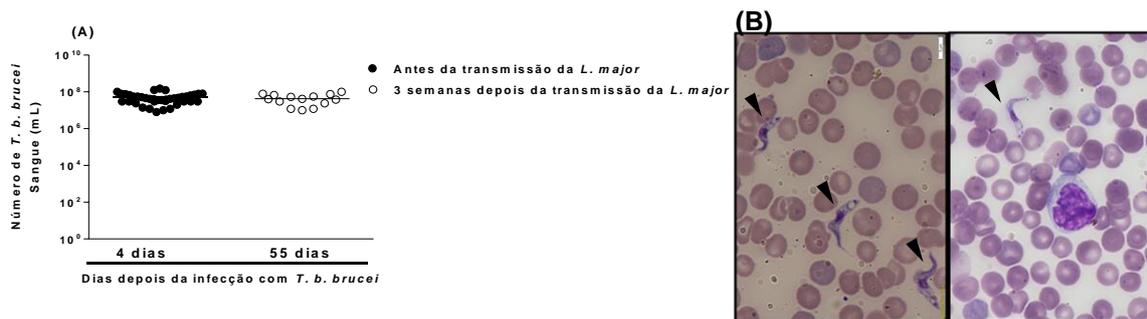
Os camundongos do grupo teste foram previamente infectados com  $5 \times 10^3$  de *T. b. brucei* por via intraperitoneal (IP). Com o objetivo de se verificar o número de *T. b. brucei* e provar a existência da co-infecção, coletou-se o sangue destes animais antes e após a co-infecção com *L. major*.

Quatro dias após a infecção, apenas com *T. b. brucei*, observou-se que a carga parasitária nos animais encontravam-se em torno de  $10^8$  *T. b. brucei*/mL de sangue (Fig.5A). Antes do início do tratamento, com a Aceturato de Diminazeno (Berenil), uma droga tripanossomicida, esperou-se dez dias após a infecção por *T. b. brucei*, tempo necessário para os parasitos se multiplicarem e disseminarem no cérebro.

Em seguida, com a finalidade de se manter os camundongos infectados com *T. b. brucei* e vivos, realizou-se nos animais o tratamento com o fármaco Berenil (40mg/Kg/IP), antes da transmissão com *L. major*. Os animais receberam a primeira dose do Berenil, 10 dias após a infecção com *T. b. brucei* e a segunda dose do Berenil, uma semana após a primeira dose.

Após 20 dias do tratamento com Berenil, foi realizada a transmissão natural com *L. major* na orelha destes animais. Para se assegurar da co-infecção ativa (*T. b. brucei* e *L. major*), coletou-se sangue para quantificação da carga do *T. b. brucei* na circulação sanguínea, 3 semanas após a transmissão com *L. major*. Observou-se que o número de *T. b. brucei* era em torno de  $10^8$  (Fig. 5A-B), evidenciando uma infecção ativa do parasito.

O tratamento com Berenil manteve estável a carga de *T. b. brucei* no sangue, 3 semanas após a transmissão com *Lu. longipalpis* infectado com *L. major*.



**Figura 5- Carga parasitária de *T. b. brucei* antes e após a transmissão de *L. major*.** Os animais foram infectados com  $5 \times 10^3$  de *T. b. brucei* pela via intraperitoneal. No tempo de 4 dias após a infecção com *T. b. brucei* (●) e 3 semanas após transmissão com *L. major* (○), foi coletado sangue destes animais para quantificação da carga de *T. b. brucei*. Número de parasitos no sangue, contagem direta no microscópio (A). Esfregaço sanguíneo, 3 semanas após a infecção com *T. b. brucei* (B). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

## 6.2 AVALIAÇÃO DA CARGA E VIABILIDADE DA *L. MAJOR* NO INTESTINO DO *LU. LONGIPALPIS*

Fêmeas de *Lu. longipalpis*, adultas, com idade entre 6 a 8 dias, foram infectadas artificialmente com  $5 \times 10^6$  de amastigotas de *L. major*. Estas fêmeas infectadas foram mantidas e alimentadas com açúcar 8 dias após a infecção correspondente ao dia da transmissão da *L. major* para os camundongos. Foram, então, dissecados e removidos 10 a 15 intestinos íntegros, com o objetivo de se avaliar, a carga de *L. major* no vetor. Analisou-se, no intestino, antes de cada transmissão, a qualidade da infecção da *L. major* no vetor, tais com posição anatômica do parasito (válvula estomodeu), viabilidade e morfologia do parasito e grau de infecção bacteriana no intestino.

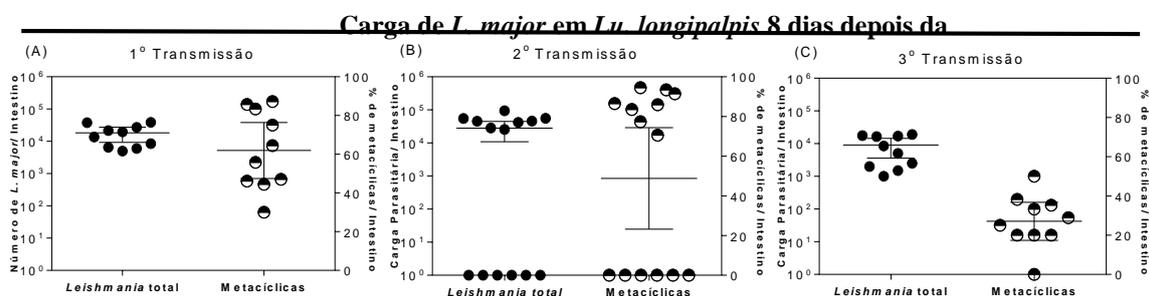
Foram realizadas transmissões distintas de *L. major* para os 3 experimentos individuais. Na primeira transmissão, observamos que todos os flebotomíneos estavam realmente infectados com uma carga de  $10^4$  *Leishmania*, e que 30 a 80% destes parasitos apresentavam morfologia de promastigotas metacíclicas (Fig - 6A).

No segundo grupo experimental, verificamos que 50% dos flebotomíneos estavam infectados com, aproximadamente,  $10^5$  parasitos de *L. major*. Contudo, destes, apenas 50% estavam aptos a realizar a transmissão com sucesso, pois apresentavam 80 a 100% de *Leishmania* em fase promastigota metacíclica no intestino (Fig-6B).

No terceiro e último grupo experimental, constatamos que todas as fêmeas estavam infectadas, em média, com  $10^3$  a  $10^4$  de *L. major*. Todavia, desta carga de parasitos, 20-50% eram promastigotas metacíclicas infectantes (Fig-6C).

É importante salientar, que as variações das cargas parasitárias vistas em cada infecção do vetor, é algo esperado e faz parte da rotina dos experimentos de transmissão natural. Tendo em vista que, as três infecções dos vetores (Fig-6 A,B,C), aconteceram separadamente, em momentos distintos, portanto, espera-se que carga total da *Leishmania* e a porcentagem de promastigotas metacíclicas, sejam heterogêneas e apresentem números variáveis no intestino de cada flebotomíneo e/ou experimento.

Esses resultados mostram, notoriamente, que, no dia da transmissão natural para os camundongos, os flebotomíneos estavam infectados com *L. major* na fase infectante, e que estas, promastigota metacíclicas, estavam viáveis para serem inoculadas, no momento do segundo repasto sanguíneo do vetor na orelha do animal.

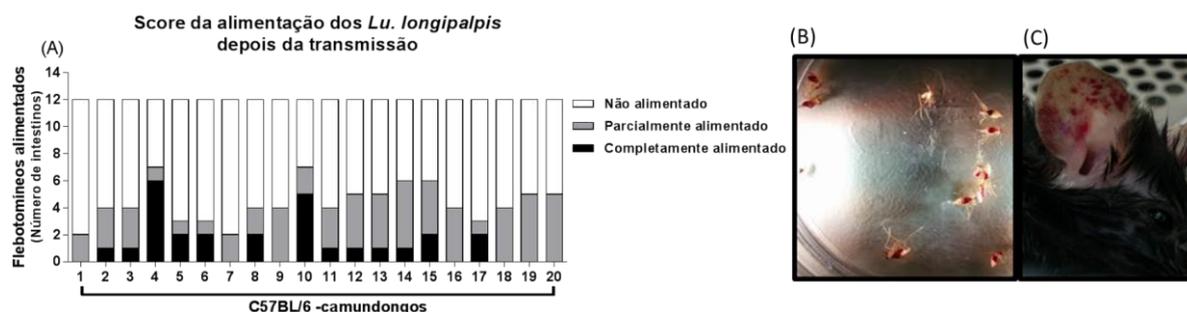


**Figura 6- Condições da pré transmissão do *Lu. longipalpis* infectado com *L. major*.** Carga parasitária de *L. major* (círculo preto) e porcentagem de promastigotas metacíclicas (círculo preto e branco) no intestino de *Lu. longipalpis*, horas antes de se realizar a transmissão para os camundongos (A) primeira, (B) segunda e (C) terceira transmissão.

### 6.3 AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO NATURAL DA *L. MAJOR* PELO *LU. LONGIPALPIS* PARA CAMUNDONGOS

Realizou-se a transmissão natural expondo a orelha de cada animal a 10 a 12 flebotomíneos infectados com *L. major*. Após 2 horas de exposição (por meio da alimentação), as fêmeas foram avaliadas para verificar-se quantas destas haviam se alimentado e, conseqüentemente, infectado o camundongo. Foi feito o *escore* da quantidade de sangue no intestino de cada fêmea, classificando-os como: intestino parcialmente alimentado (pouco sangue), completamente alimentado (cheio de sangue) ou não alimentado (Fig. 7A). Em todas as transmissões, obtiveram-se 70 a 100% de fêmeas alimentadas (Fig. 7B).

Concomitantemente, outro achado que evidência o sucesso da transmissão são as orelhas dos animais, com seus capilares sanguíneos dilatados e extravasados, mostrando que, realmente, as fêmeas realizaram o segundo repasto sanguíneo (Fig. 7C).



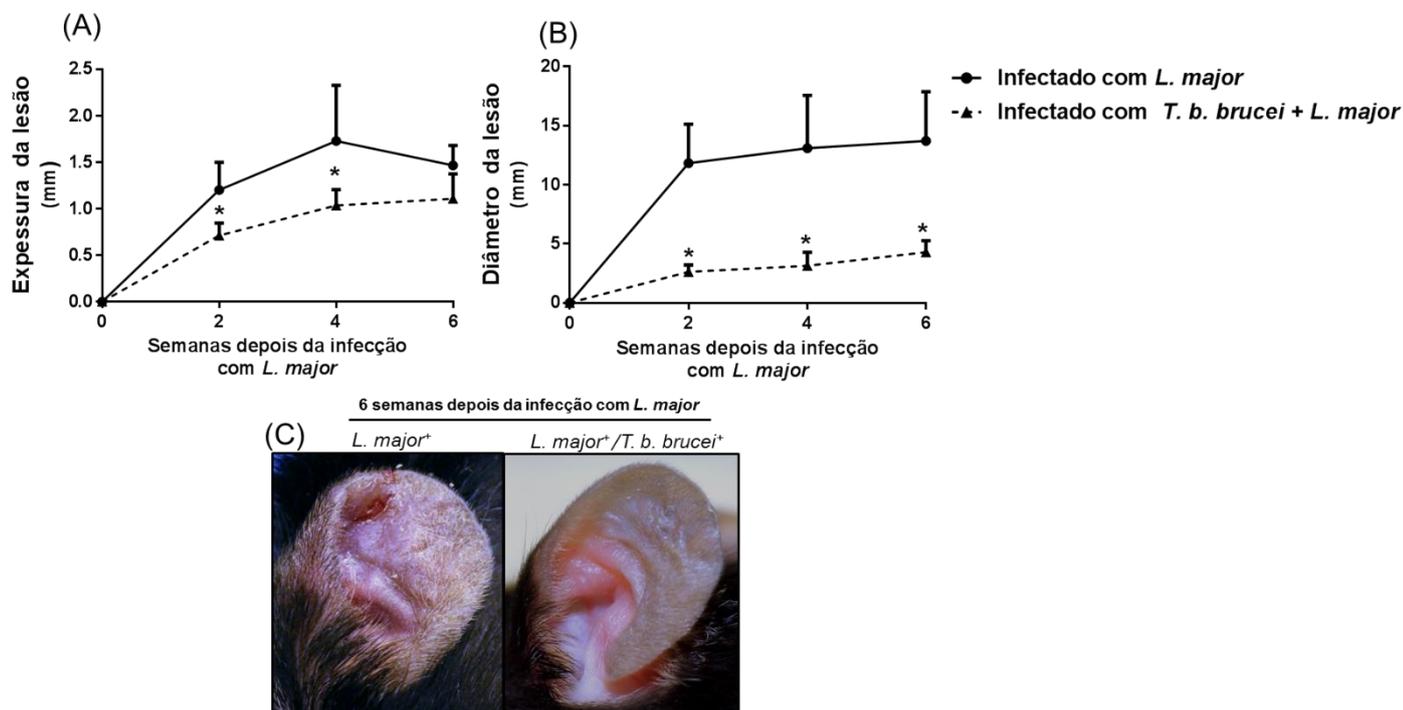
**Figura 7- Status pós transmissão do *Lu. longipalpis* infectado com *L. major*.** Escore do intestino das fêmeas de *Lu. longipalpis* após o segundo repasto sanguíneo, após a transmissão da *L. major* (A), cada barra representa um camundongo exposto a 12 flebotomíneos, onde as cores são o escore da quantidade de sangue no intestino: não alimentado (branco), parcialmente alimentado (cinza) e completamente alimentado (preto). Macroscopia das fêmeas alimentadas pós transmissão no camundongo (B). Orelha do camundongo C57BL/6, após ter sido exposta às picadas do *Lu. longipalpis* infectados com *L. major* (C). Dados representativos de 3 experimentos.

#### 6.4 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DA LESÃO NA ORELHA DOS ANIMAIS INFECTADOS COM *L. MAJOR*

Com a finalidade de se avaliar se a infecção com *T. b. brucei* poderia influenciar no controle ou exacerbação da patologia da Leishmaniose Cutânea, causada por *L. major*, mensurou-se a(s) lesão(ões) na orelha, a cada 2 semanas, totalizando 6 semanas. A maioria dos animais possuíam mais de uma lesão, pois, na transmissão, utilizou-se 10 a 12 flebotomíneos que ao se alimentaram, inocularam a *Leishmania* em diferentes partes da face interna da orelha.

No tempo mais inicial, 2 semanas após a infecção com *L. major*, observou-se uma menor espessura da lesão no grupo teste co-infectado com *T. b. brucei* e *L. major*. Este controle da espessura da lesão se manteve até 6 semanas após a infecção com *L. major* (Fig. 8A). Os animais co-infectados foram capazes de controlar o tamanho da lesão observada na leishmaniose cutânea, sendo estatisticamente significativa durante as 6 semanas, comparando-se ao grupo controle, apenas infectado com *L. major* (Fig. 8B-C).

Estes resultados evidenciaram que a infecção com *T. b. brucei* é capaz de sustentar o controle da lesão, causada por *L. major* em camundongos C57BL/6.



**Figura 8-** Espessura e diâmetro da lesão dos animais desafiados com *Lu. longipalpis* infectados com *L. major*. Os animais do grupo teste foram infectados com  $5 \times 10^3$  de *T. b. brucei* pela via intraperitoneal. Após 20 dias da segunda dose com Berenil, os animais infectados ou não com *T. b.*

*brucei* foram expostos a 12 *Lu. longipalpis* infectados com *L. major*, na orelha. Após a transmissão, a cada 2 semanas, durante 6 semanas, espessura(s) (A) e o(s) diâmetro(s) (B) e da(s) lesão(ões) foram mensuradas e somadas, nos camundongos infectados com *L. major* (●), e co-infectados com *T. b. brucei* e *L. major* (▲). Foto representativa da lesão na orelha, 6 semanas, após a transmissão da *L. major* (C). Os dados são cumulativos de 3 experimentos independentes (n=15 animais/grupo). \* p<0.05.

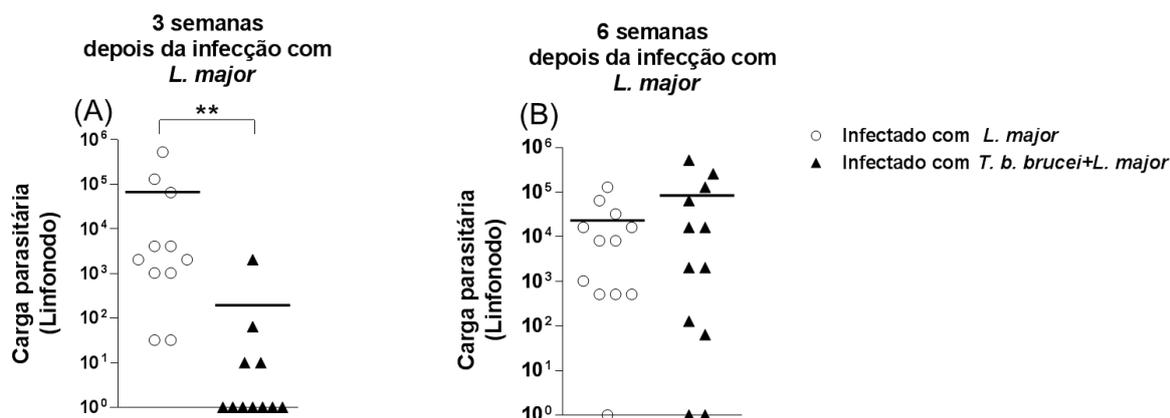
## 6.5 ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA DE *L. MAJOR* NO LINFONODO

Com o objetivo de se analisar se a co-infecção com *T. b. brucei* seria capaz de controlar a carga parasitária de *L. major*, removeu-se o linfonodo drenante auricular e realizou-se o ensaio de diluição limitante para a determinação do número de parasitos.

Após 3 semanas de ocorrida a transmissão da *L. major*, os resultados mostraram que o grupo dos animais infectados com *T. b. brucei* possuía uma carga de *Leishmania major* menor, equivalente a uma diferença de dois logaritmos ( $10^0$  a  $10^3$ ), e quando comparado ao grupo apenas infectado com *L. major* ( $10^1$  a  $10^5$ ), esta diferença foi estatisticamente significativa (Fig. 9A).

Entretanto, 6 semanas após a co-infecção, este controle no número de *Leishmanias* não foi observado. O número de *Leishmanias* no linfonodo, no grupo de animais co-infectados, igualou-se ao do grupo controle, apenas infectado com *L. major* (Fig. 9B).

Desse modo, concluímos que a infecção com a *T. b. brucei* é capaz de controlar, inicialmente, por 3 semanas, a carga parasitária de *L. major* no linfonodo, não sendo capaz de manter ou diminuir estes mesmos limiars tardiamente (6 semanas).



**Figura 9– Carga parasitária de *L. major* no linfonodo por LDA.** Os animais do grupo teste foram infectados com  $5 \times 10^3$  de *T. b. brucei* pela via intraperitoneal. Após 20 dias, depois da segunda dose com Berenil, os animais (Grupo Controle e Teste) foram expostos a 10 a 12 *Lu. longipalpis* infectados com *L. major*, na orelha. Nos tempos de 3 (A) e 6 (B) semanas após a transmissão da *L. major* foi

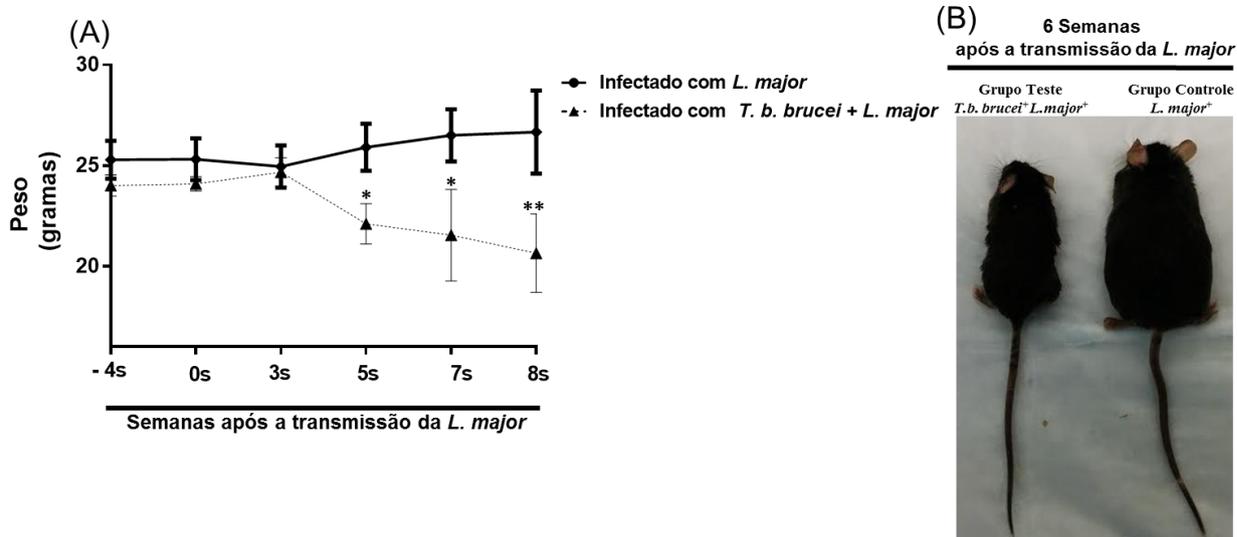
removido o linfonodo drenante auricular para quantificação do número de *Leishmania* dos camundongos infectados com *L. major* (○), e co-infectados com *T. b. brucei* e *L. major* (▲). Estes resultados são dados cumulativos de 3 experimentos. n=12 por grupo. p<0.01.

## 6.6 CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *T. B. BRUCEI* TEM INTENSA PERDA DE PESO

Neste estudo, observou-se que os animais infectados com *T. b. brucei* estavam clinicamente saudáveis e conseguiram manter o peso até a terceira semana após a transmissão da *L. major*. Entretanto, após 3 semanas de co-infecção, os animais apresentaram uma redução de peso acentuada.

Antes da co-infecção com *Leishmania*, a carga de *T. b. brucei* tinha sido controlada pelo tratamento com o Berenil. No entanto, 20 dias antes da transmissão com *L. major*, o uso da droga (Berenil) foi suspensa para não ocorrer influência no desenvolvimento da infecção por *L. major*. Acredita-se que esta intensa perda de peso nos animais foi causada devido a disseminação sistêmica e multiplicação do *T. b. brucei* em diferentes órgãos.

Observou-se que, após 3 semanas de co-infecção ocorre uma redução brusca do peso dos animais do grupo teste, em até 8 gramas (Fig-10A-B). A progressão da trypanossomíase, leva todos os animais ao óbito, após a oitava semana. O achado clínico da perda de peso acentuada, pode estar associado com a perda do controle da carga parasitária da *Leishmania* no linfonodo no tempo de 6 semanas, descrita anteriormente (Fig.10B)



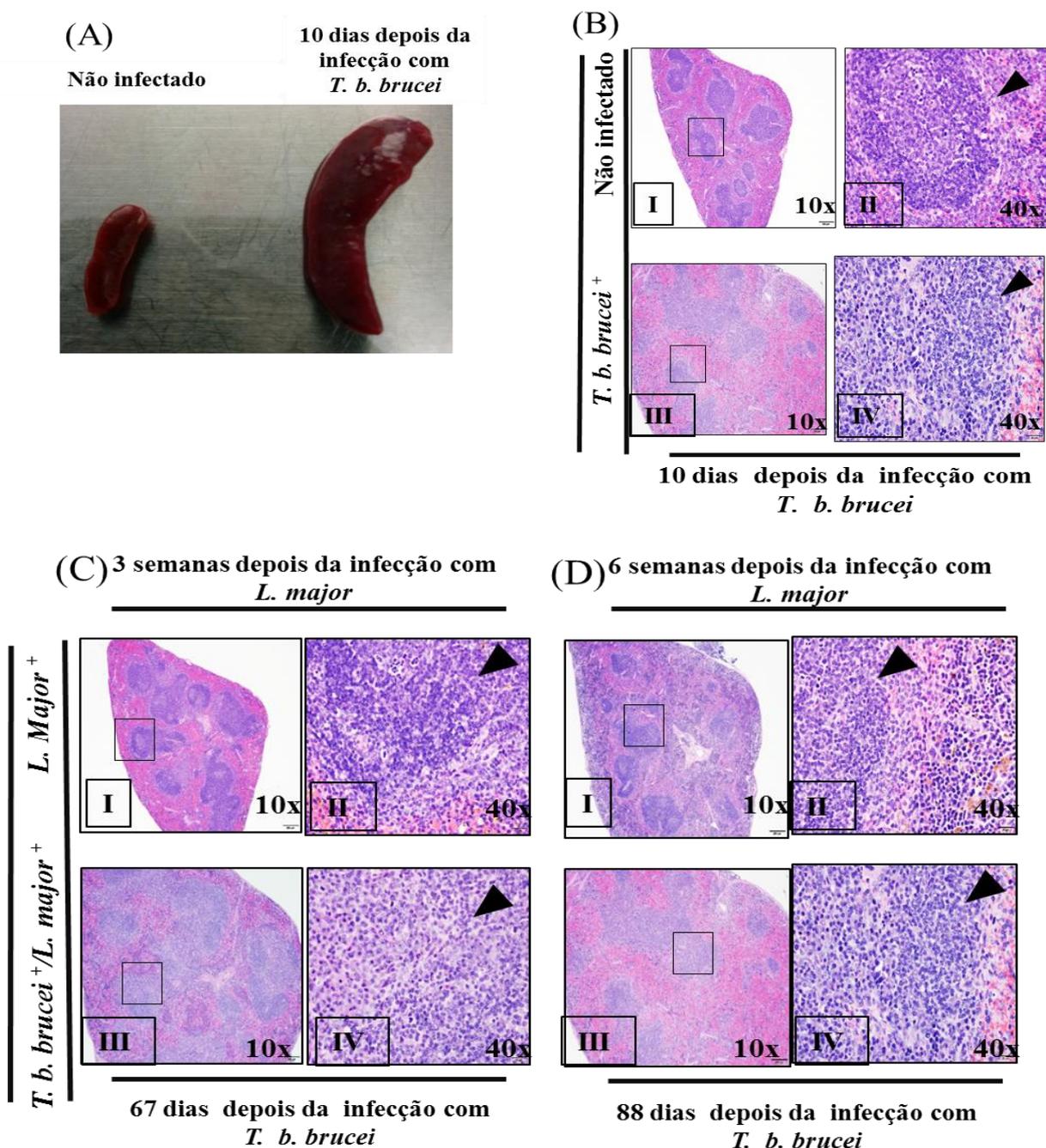
**Figura 10- Peso dos animais infectados com *T. b. brucei* e/ou *L. major*.** Os animais do grupo teste foram infectados com  $5 \times 10^3$  de *T. b. brucei* pela via intraperitoneal. Após 20 dias da segunda dose com Berenil, os animais (Grupo Controle e Teste) foram expostos a 10 a 12 *Lu. longipalpis* infectados com *L. major*, na orelha. Os animais foram pesados no período de 4 semanas antes e 8 semanas após a infecção com *L. major* (B). Os dados são cumulativos de 3 experimentos independentes (n=15 animais/Grupo). \*p<0.05, \*\*p<0.01. Foto representativa do estado corpóreo, 6 semanas após a transmissão da *L. major* (C).

## 6.7 ESPLENOMEGALIA E DESESTRUTURAÇÃO DO BAÇO APÓS A INFECÇÃO COM *T. B. BRUCEI*

Com objetivo de se evidenciar que os animais estavam com uma infecção ativa e disseminada com *T. b. brucei* e que isto afetava diretamente as células B do baço, realizou-se, nos camundongos, análise histopatológica dos fragmentos deste órgão. Este procedimento foi realizado nos tempos de 10 dias após a infecção com *T. b. brucei*, 3 e 6 semanas após transmissão com *L. major*.

Após a eutanásia dos camundongos, foi feita a análise microscópica do baço dos animais controle (não infectado ou infectado apenas com *L. major*). Notou-se que, nas análises, em todos os tempos avaliados, os animais apresentavam folículos organizados com grandes centros germinativos evidentes e a estrutura do baço conservada com os seus limites normais (Fig. 11B, C, D).

Por sua vez, em todos os animais que foram pré infectados com *T. b. brucei*, notou-se evidente esplenomegalia em todos os tempos analisados, acompanhada de desestruturação folicular, fibrose, além de infiltrado de células hematopoiéticas extra medular, vacuolização e apoptose, em toda a estrutura do baço (Fig.11B, C, D). Além disso, evidenciou-se esplenomegalia, nos grupos infectados com *T. b. brucei* a partir do décimo dia após a infecção (Fig.11A).



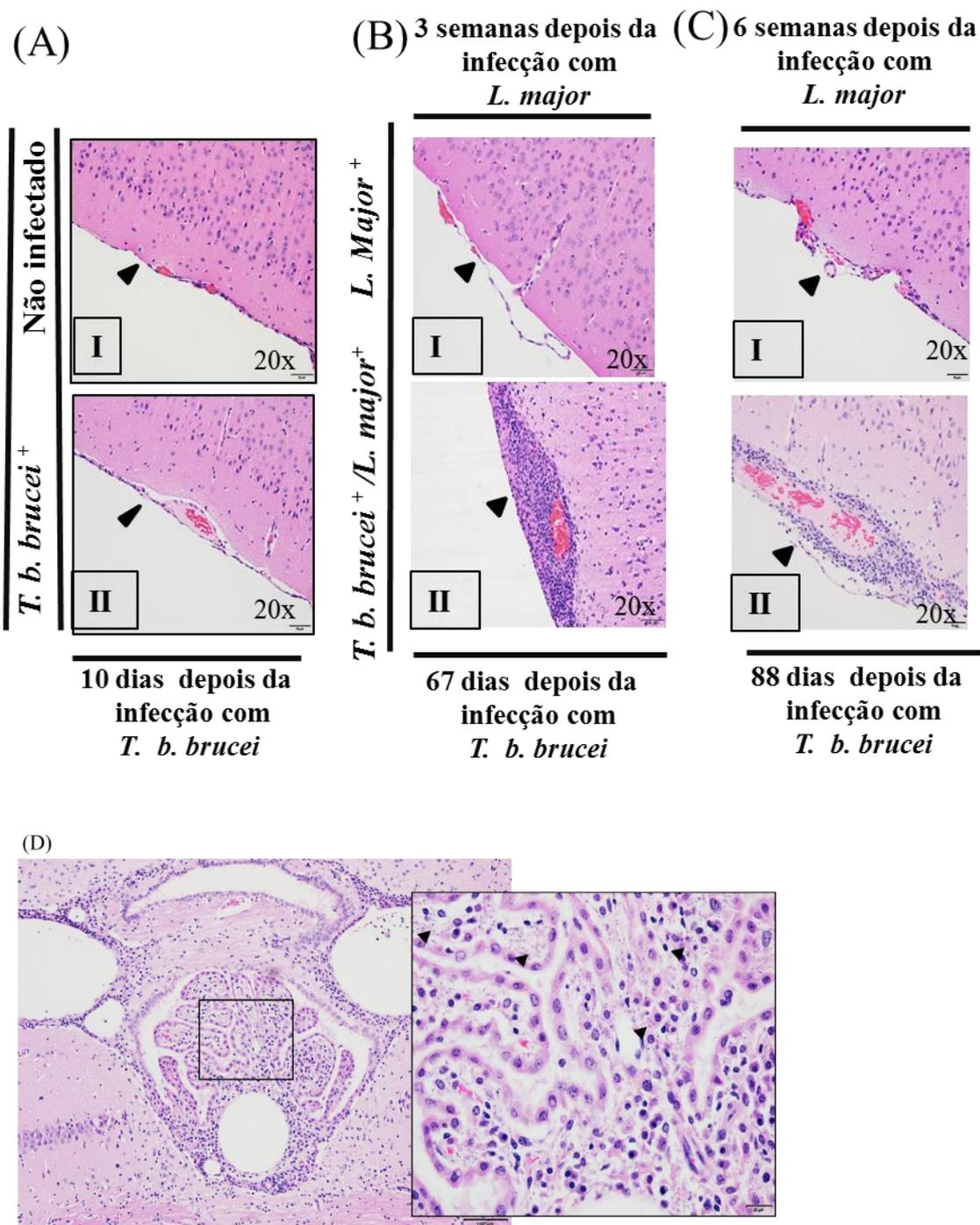
**Figura 11- Desestruturação esplênica após infecção com *T. b. brucei*.** Os animais do grupo teste foram infectados  $10^3$  *T. b. brucei*/intraperitoneal. Macroscopia do baço, do lado esquerdo órgão normal, animais não infectados e do lado direito esplenomegalia 10 dias após a infecção com *T. b. brucei* (A). Nos tempos de 10 dias após a infecção com *T. b. brucei* e 3 e 6 semanas, após a transmissão da *L. major*, foi removido o fragmento do baço e feita coloração com H&E. Folículo normal e tecido linfóide bem organizado, baço dos animais não infectados e/ou infectados com *L. major* B(I-II), C(I-II) e D(I-II). Desestruturação do folículo e tecido linfóide extensivamente desorganizado, baço dos animais infectados com *T. b. brucei* e/ou *L. major* B(III- IV), C(III-IV) e D(III-IV).

## 6.8 INFECÇÃO COM *T. B. BRUCEI* CAUSA ENCEFALITE TARDIAMENTE

Uma das evidências da disseminação sistêmica do *T. b. brucei* é o fato do parasito cruzar a barreira hematoencefálica e se alojar no sistema nervoso central. Neste estudo, coletou-se o cérebro inteiro dos animais, nos tempos iniciais e tardios da infecção com *T. b. brucei* para realizar-se a análise histopatológica.

Não observou-se, nenhum achado histopatológico anormal 10 dias após a infecção aguda com *T. b. brucei*. O córtex cerebral dos animais infectados mostrou-se igual aos dos animais do grupo controle, sem alterações (Fig. 12A).

Nos tempos tardios 67 dias após a infecção com *T. b. brucei* (3 semanas co-infectado com *L. major*), os cérebros dos animais apresentaram um quadro de encefalite aguda, com um intenso infiltrado neutrofílico nas meninges. Observou-se, no terceiro ventrículo dorsal, no plexo coróide, a presença de raros ou poucos *T. b. brucei* (Fig. 12B). No tempo mais tardio, 88 dias após a infecção com *T. b. brucei* (6 semanas co-infectado com *Leishmania*), observamos uma encefalite menos aguda, acompanhada de numerosos parasitos no plexo coróide (Fig. 12C).



**Figura 12- Encefalite após infecção com *T. b. brucei*.** Os animais do grupo teste foram infectados com  $10^3$  *T. b. brucei* por via intraperitoneal. Foi removido o fragmento do encéfalo e feita coloração com H&E. Nenhuma alteração patológica no cérebro dos animais controles não infectados ou animais do grupo com 10 dias de infecção com *T. b. brucei* (A-I,II). Meningoencefalite aguda, 3 semanas após transmissão da *L. major*, nos animais co-infectado com *T. b. brucei* e *L. major* (B-II). Meningoencefalite crônica, 6 semanas após transmissão da *L. major*, nos animais co-infectado com *T. b. brucei* e *L. major* (C-II). Microscopia do cérebro normal dos animais apenas infectados com *L. major* (B-I,C-I). Inclusões de *T. b. brucei*, no plexo coróide no encéfalo, 6 semanas após a transmissão da *L. major* (D).

## 6.9 INFECÇÃO COM *T. B. BRUCEI* INDUZ UMA ATIVAÇÃO POLICLONAL DE ANTICORPOS

Com o objetivo de se avaliar se o controle da lesão na co-infecção, *T. b. brucei* e *L. major* estava associado à reação cruzada entre os antígenos dos Tripanosomatídeos, testou-se os soros dos animais para diferentes antígenos antes e depois das co-infecções.

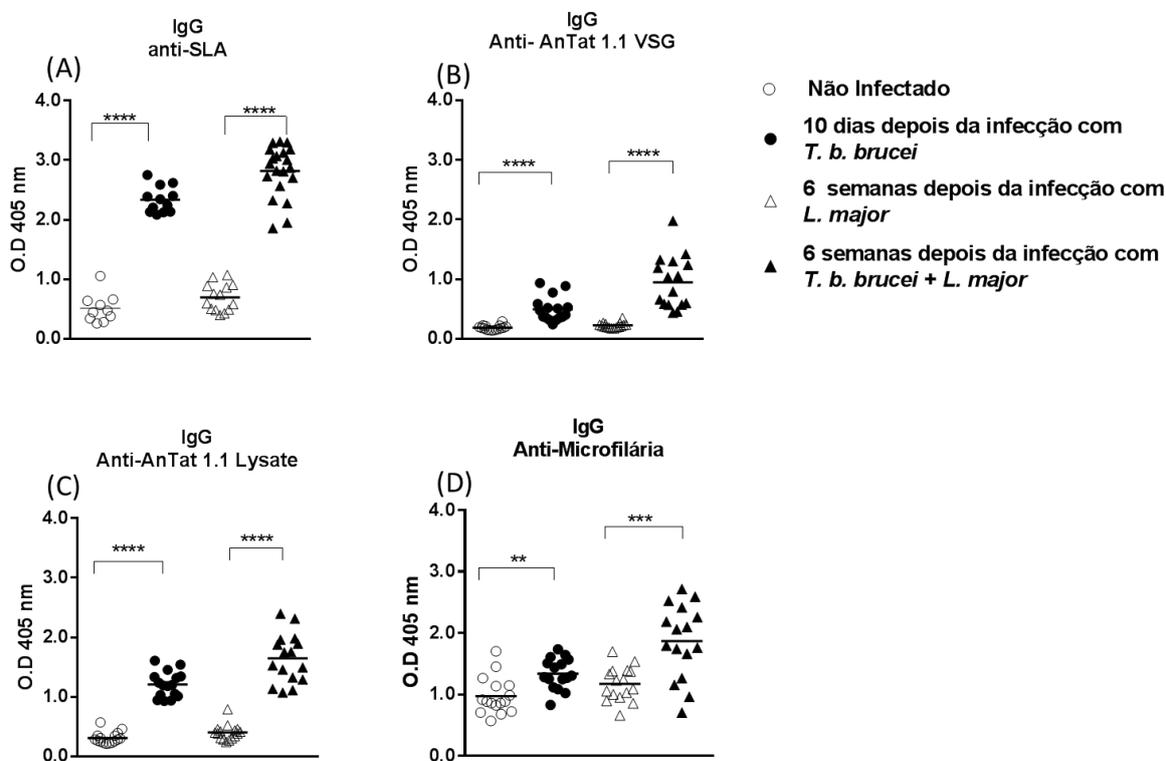
O primeiro ponto avaliado, 10 dias após a infecção com *T. b. brucei* (não infectado com *L. major*), os soros desses animais possuíam altos títulos de anticorpos IgG, reconhecendo os antígenos (SLA) da *L. major* (Fig. 13A). Vale ressaltar que, até então, esses animais nunca tinham sido infectados ou expostos a nenhum antígeno da *Leishmania spp.* Seis semanas após infecção com *L. major*, os títulos de anticorpos anti-SLA encontravam-se com uma concentração 3 vezes superior ao grupo controle ou apenas infectado com *L. major* (Fig. 13A).

No intuito de se excluir a possibilidade de reação cruzada entre os antígenos trypanossomatídeos, decidiu-se testar os soros destes animais com outros antígenos do *T. brucei spp.* O próximo ensaio foi investigar se a produção de IgG, anteriormente capturada contra os antígenos da *Leishmania* (SLA), eram específicas ou apenas uma exacerbação de anticorpos policlonais não específicos.

Os antígenos do *T. b. brucei* selecionados foram o AnTat 1.1 Lisado (antígeno bruto solúvel do parasito total) e Antat 1.1 sVSG (uma proteína de superfície da membrana purificada). Ao se avaliar o soro destes mesmos animais, 6 semanas após a infecção com *L. major* (não infectados com *T. b. brucei*), não observou-se nenhuma produção de anticorpos contra ambos os antígenos. A titulação dos anticorpos desses animais apresentou a mesma concentração daquela encontrada no soro dos animais controle negativo não infectado (Fig. 13B,C).

Para ter certeza da não existência de uma reação cruzada entre os antígenos, testou-se os soros contra o antígeno bruto total de Microfilária, um nematódeo, com antígenos distintos, filogeneticamente distante da família dos Trypanossomatídeos. Observamos que os animais infectados com *T. b. brucei*, em todos os pontos testados, possuíam anticorpos anti-microfilária, antígenos aos quais eles nunca haviam sido expostos (Fig. 13D). Todavia, o grupo apenas infectado com *L. major*, não possuía anticorpos contra estes antígenos.

Concluimos que a infecção com *T. b. brucei* resulta em uma a exacerbação da produção de anticorpos policlonais, que se liga a antígenos de diferentes patógenos.



**Figura 13– Avaliação da resposta imune humoral anti-SLA pela quantificação de anticorpos no soro por ELISA, na infecção com *T. b. brucei* e/ou co-infecção com *L. major*.** Os soros dos animais foram testados para os antígenos SLA (A), Antat 1.1 sVSG (B), AnTat 1.1 lisado (C) e Microfilária (D). Os símbolos representam os grupos de animais nos tempos de: (o) antes de qualquer infecção, (●) 10 dias após a infecção com *T. b. brucei*, (△) 6 semanas após a infecção com *L. major*, (▲) 6 semanas de co-infecção com *T. b. brucei* e *L. major*. Estes resultados são dados acumulativos de 3 experimentos por grupo, n=10-15.

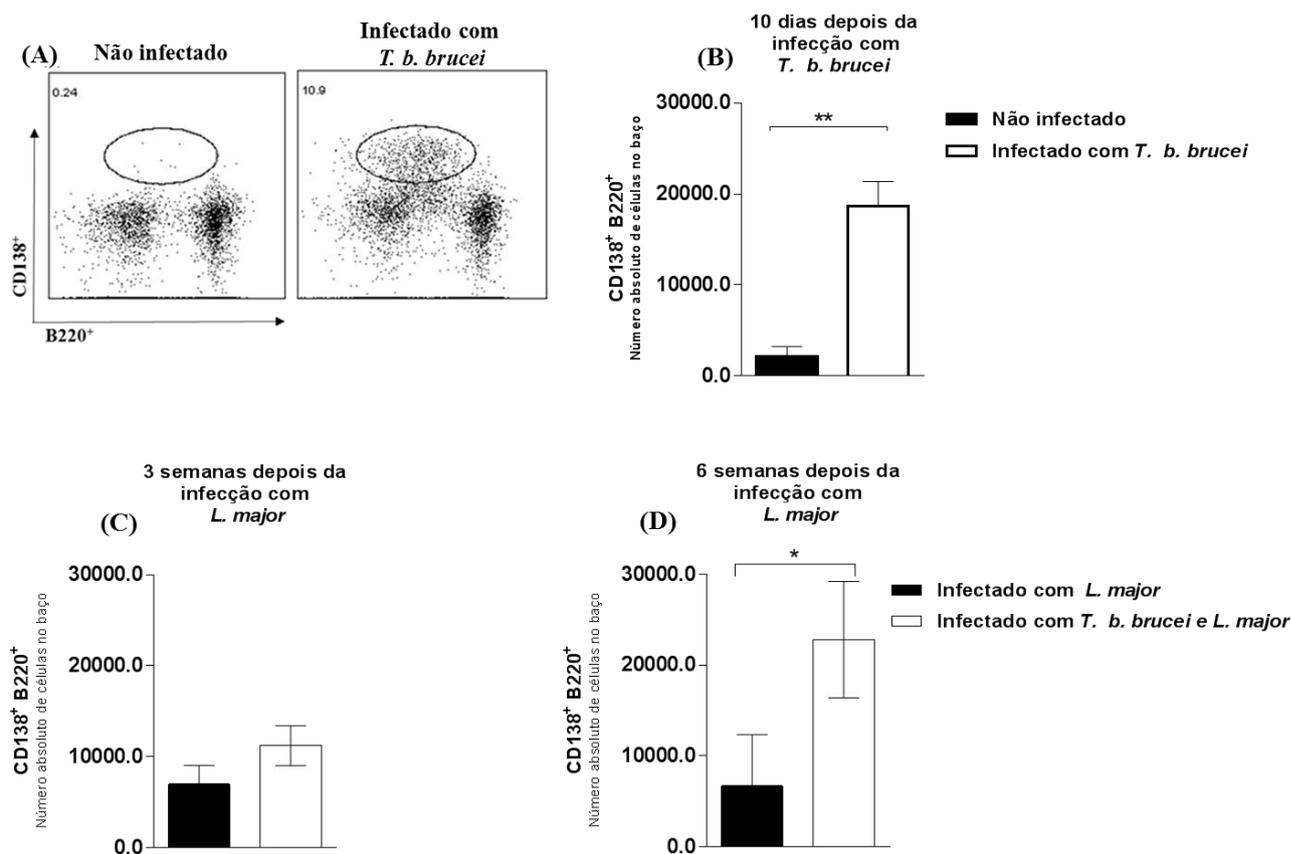
(\*\*, p<0.01) (\*\*\*, p<0.001), (\*\*\*\*p<0.0001).

## 6.10 INFECÇÃO COM *T. B. BRUCEI* CAUSA EXPANSÃO POLICLONAL DOS PLASMÓCITOS.

Os dados descritos anteriormente mostraram que os animais infectados com *T. b. brucei* produzem anticorpos policlonais não específicos, que reconhecem antígenos a que não foram expostos anteriormente. Com o objetivo de se avaliar se a população de plasmócitos do baço estava hiper estimulada, utilizaram-se os marcadores de superfície CD138<sup>+</sup> e B220<sup>+</sup>.

Observou-se que 10 dias após a infecção apenas com *T. b. brucei*, os animais apresentaram um aumento da população dos plasmócitos, em torno de 7 vezes comparado ao grupo controle (Fig. 14 A, B). Depois da co-infecção com *L. major*, em 3 semanas houve um leve aumento no grupo teste, mas isso não foi estatisticamente significativo (Fig. 14C). Neste período, o número de *T. b. brucei* havia sido controlado pelo tratamento com Berenil.

No último tempo avaliado, 6 semanas após a co-infecção, novamente houve um aumento relevante desta população, quando comparado ao grupo controle (Fig. 14D). Ao longo da infecção, com a persistência e aumento do número do *T. b. brucei*, ocorre um aumento dos plasmócitos, causando alta produção de anticorpos policlonais inespecíficos. Esses resultados demonstram mais uma vez que a parasitemia por *T. b. brucei* causa linfopiose esplênica compensatória, causando a produção de anticorpos policlonais, capazes de reconhecerem antígenos de outros patógenos.



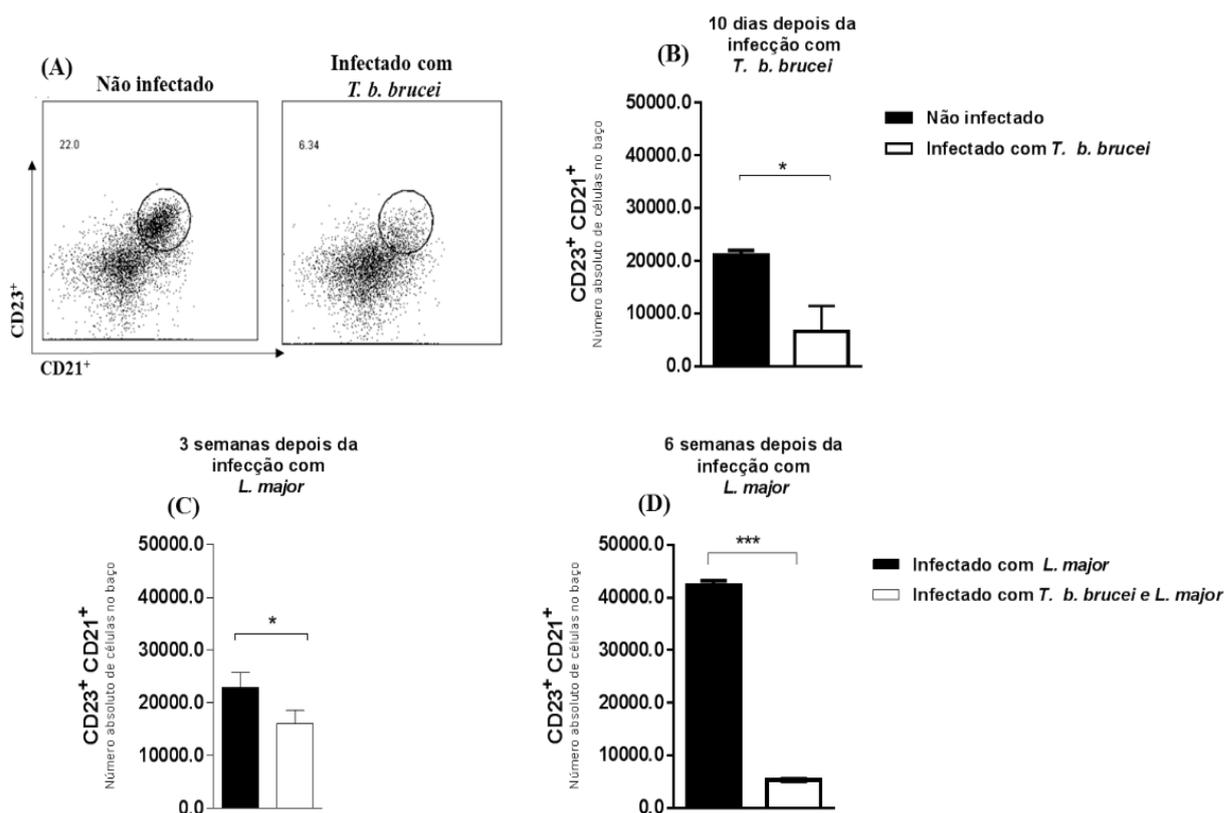
**Figura 14-Alterações nos plasmócitos do baço durante a infecção com *T. b. brucei*.** As células derivadas do baço ( $2 \times 10^6$ ), foram lavadas e identificadas como plasmócitos, através dos marcadores de superfície CD138<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>, posteriormente foram analisadas usando FACS. O dot plot, CD138<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> é representativo de cada grupo, 10 dias antes e após a infecção com *T. b. brucei* (A). Número absoluto dos plasmócitos, 10 dias depois da infecção com *T. b. brucei* (B), 3 e 6 semanas após a infecção com *L. major* (C-D). Os resultados foram obtidos do pool de 5 animais/grupo, em 3 experimentos distintos. (\*,  $p < 0.05$ ) (\*\*,  $p < 0.01$ ).

### 6.11 *T. B. BRUCEI* CAUSA A PERDA DAS CÉLULAS B DA ZONA MARGINAL DO BAÇO

Avaliou-se também o perfil das células B da zona marginal do baço (B MZ), na presença dos parasitos *T. b. brucei* e *L. major*. Caracterizou-se esta população B MZ, com os marcadores CD23<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup>.

No primeiro tempo avaliado, 10 dias após da infecção com *T. b. brucei* (sem *Leishmania*), houve uma drástica redução (10 mil) da porcentagem das células B MZ, em relação aos controles não infectados, e isso foi estatisticamente significativo (Fig. 15A/B).

Ademais, observou-se que 3 semanas após a transmissão de *L. major* no grupo co-infectado com *T. b. brucei*, ocorreu um aumento das células B ZM, de 10 mil para 18 mil células, pois neste período, ainda o número de *T. b. brucei* estava sendo controlado pelo Berenil (Fig 15C). Vale acrescentar que a perda desta população celular acentua-se para menos de 10 mil, 6 semanas após a co-infecção, devido a multiplicação do *T. b. brucei* (Fig. 15D).



**Figura 15 – Alterações nas células B da zona marginal do baço durante a infecção com *T. b. brucei*.** As células derivadas do baço ( $2 \times 10^6$ ), foram lavadas e identificadas como células B da Zona Marginal, através dos marcadores de superfície CD23<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup>, posteriormente foram analisadas usando FACS. O dot plot, CD23<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup> é representativo de cada grupo, 10 dias antes e após a infecção com *T. b. brucei* (A). Número absoluto das células B da Zona Marginal, 10 dias após a infecção com *T. b. brucei* (B), 3 e 6 semanas após a infecção com *L. major* (C-D). Os resultados foram obtidos do pool de 5 animais/grupo, em 3 experimentos distintos. (\*,  $p < 0.05$ ) (\*\*\*,  $p < 0.001$ ).

## 6.12 PERFIL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA ORELHA POR RT-PCR, DEPOIS DA INFECÇÃO COM *T. B. BRUCEI* E/OU *L. MAJOR*

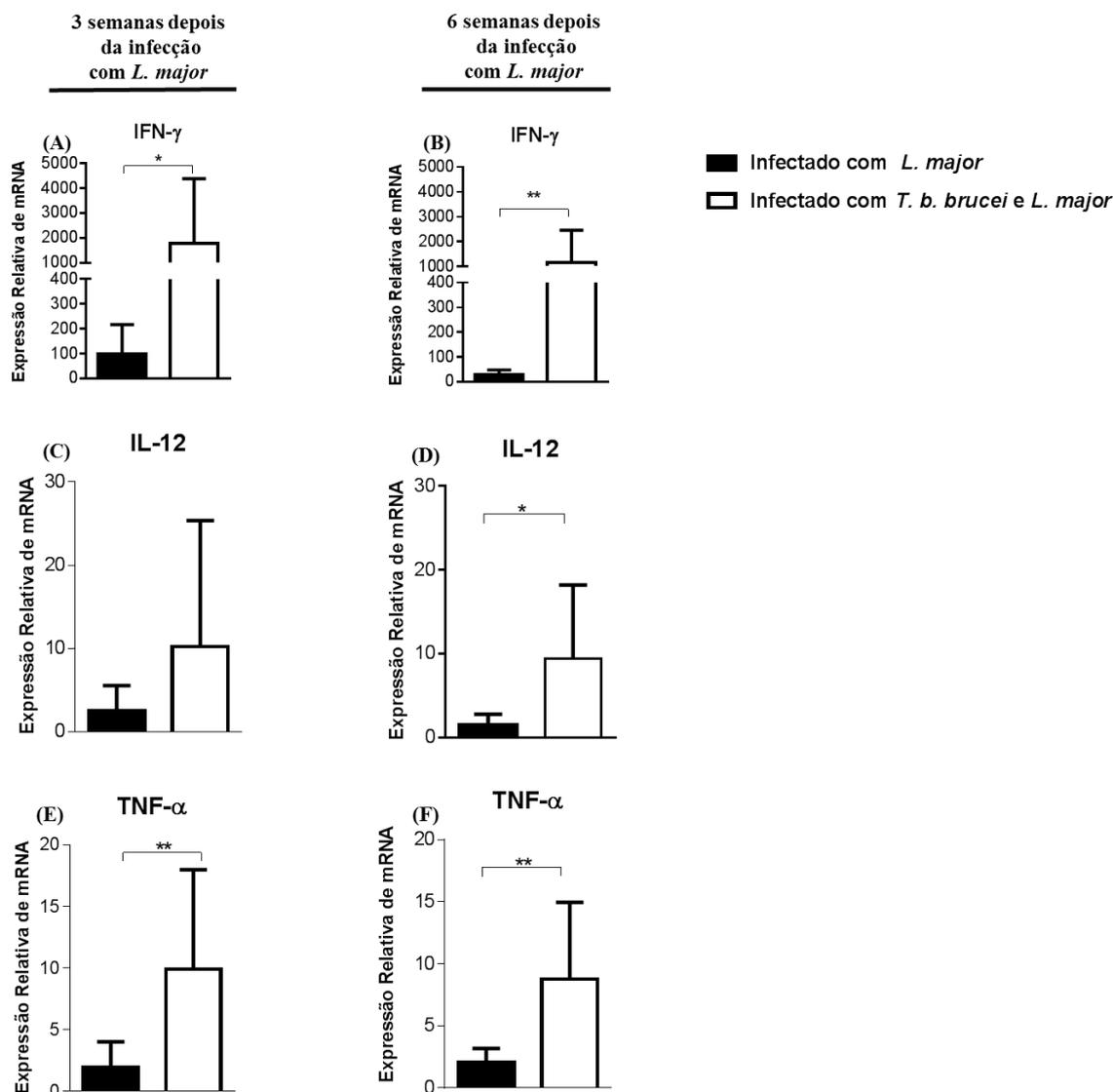
Quantificou-se a expressão relativa dos genes das citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ ). A análise foi avaliada na orelha exposta à transmissão de *L. major* no local da(s) lesão(ões). Dessa forma, observou-se que os camundongos do grupo teste, co-infectados com *T. b. brucei* e *L. major*, expressaram concentrações superiores das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , quando comparado ao grupo controle apenas infectado com *L. major*.

Ao analisar a produção da citocina IFN- $\gamma$ , nos pontos de 3 e 6 semanas após a infecção com *L. major*, observou-se que os animais co-infectados apresentaram concentração superior ao redor de 20 vezes em relação ao grupo controle infectado apenas com *L. major* (Fig. 16 A-B).

Ao ser avaliada a expressão da citocina IL-12, notou-se que também encontrava-se elevada, na terceira semana, no grupo co-infectado, mas não foi constatada diferença estatística, devido à variabilidade de concentrações entre os animais (Fig. 16C). Entretanto, após 6 semanas, a expressão de IL-12 foi estatisticamente maior, permanecendo elevada (Fig. 16D).

Quando analisou-se a expressão de TNF- $\alpha$ , observou-se que os animais do grupo co-infectado apresentaram maior produção desta citocina (3 a 5 vezes maior) nos tempos analisados (Fig. 16 E,F).

Estes dados demonstram que a infecção ativa com *T. b. brucei* leva a desestruturação das células B da zona marginal do baço.

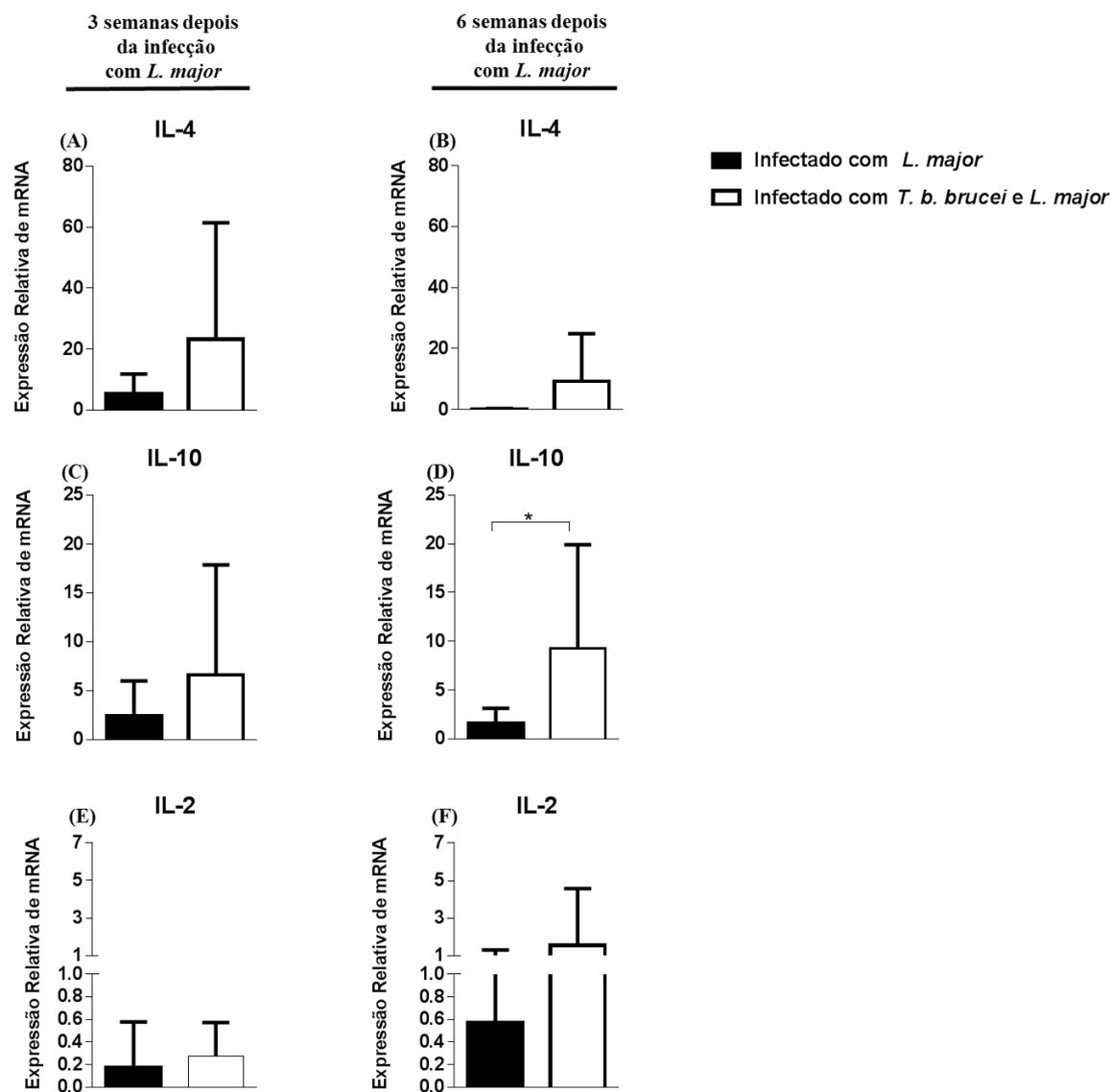


**Figura 16– Avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatórias na orelha após a transmissão da *L. major* por PCR em tempo real.** Nos tempos de 3 e 6 semanas após a transmissão da *L. major*, os animais foram eutanasiados, coletou-se as orelhas para extração de RNA e avaliação da expressão dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , nos tempos de 3 (A,C,E) e 6 (B,D,F) semanas após a transmissão da *L. major*. As citocinas foram avaliadas utilizando-se como medida a quantificação da expressão relativa do gene, empregando-se, como controle, a expressão dos genes dos camundongos não infectados. Os valores obtidos são referentes à quantidade de vezes que houve aumento na expressão desses genes nos animais infectados e/ou co-infectados, em relação à média dos animais não infectados. n=12-15. (\*, p<0.05) (\*\*, p<0.01).

### 6.13 PERFIL DE OUTRAS CITOCINAS NA ORELHA POR RT-PCR, DEPOIS DA INFECÇÃO COM *T. B. BRUCEI* E/ OU *L. MAJOR*

Explorou-se também, no local da lesão a expressão dos genes das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10. Constatou-se que as citocinas IL-4 e IL-2 foram predominantemente nos animais do grupo co-infectados, em ambos os tempos analisados, mas isto não foi estatisticamente

significante (Fig.17 A, B, E, F). Entretanto só foi estatisticamente significativa para a citocina anti-inflamatória IL-10, no tempo de 6 semanas após a transmissão da *L. major* (Fig. 17D).



**Figura 17 – Avaliação da expressão de citocinas na orelha após a transmissão da *L. major* por PCR em tempo real.** Os camundongos foram infectados com *T. b. brucei* e/ou *L. major*. Nos tempos de 3 e 6 semanas após a transmissão da *L. major*, os animais foram eutanasiados, coletou-se a orelha para extração de RNA e avaliação da expressão dos genes das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , nos tempos de 3 (A,C,E) e 6 (B,D,F) Nos tempos de 3 e 6 semanas após a transmissão da *L. major*. As citocinas foram avaliadas utilizando-se como medida a quantificação da expressão relativa do gene, empregando-se, como controle, a expressão dos genes dos camundongos não infectados, como controle negativo. Os valores obtidos são referentes à quantidade de vezes que aumentou a expressão desses genes nos animais infectados e/ou co-infectados, em relação à média dos animais não infectados. n=12-15. (\*, p<0.05) (\*\*, p<0.01). n=12-15.

#### 6.14 INFECÇÃO COM *T. B. BRUCEI* INDUZ UMA INTENSA RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA

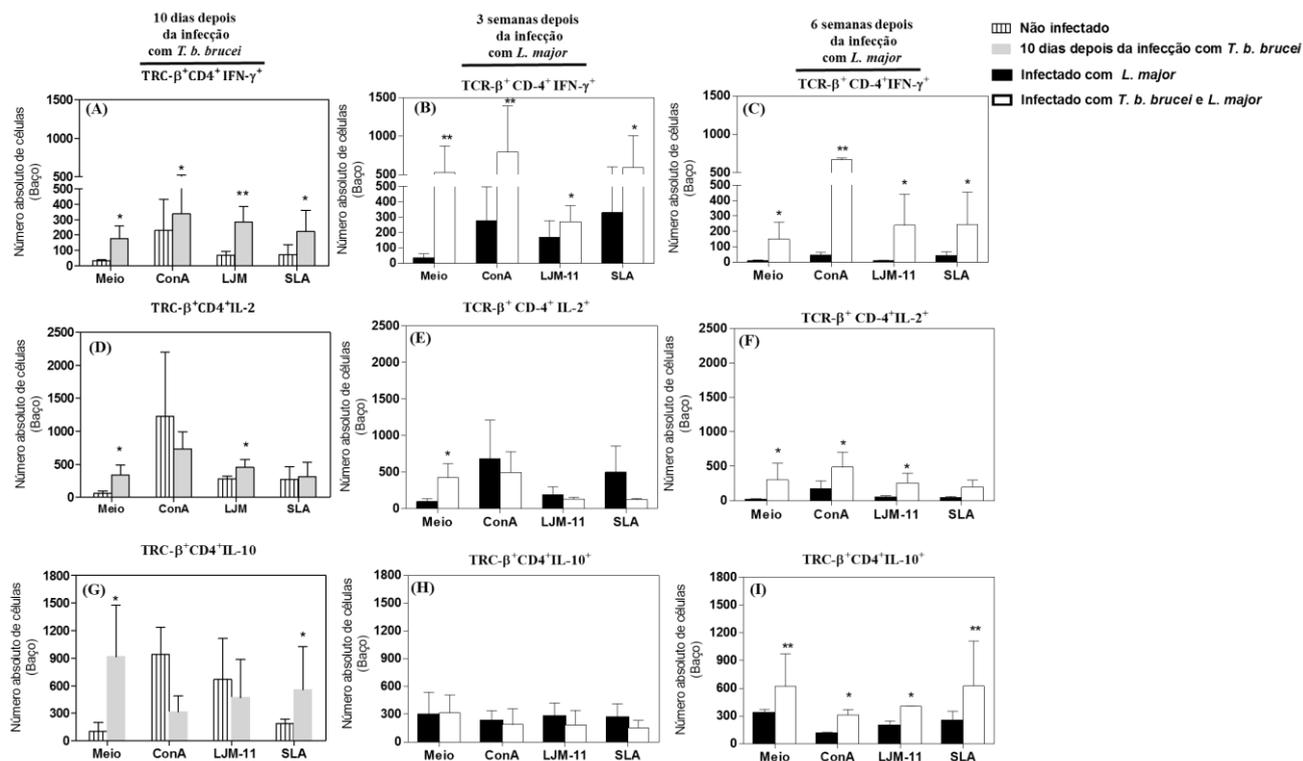
Conforme os resultados anteriormente descritos, os animais co-infectados com *Trypanosoma* apresentaram intensa resposta imune local (orelha). Concomitantemente, avaliou-se se a resposta imune sistêmica poderia estar ativada e, também se seria responsável pela diminuição da lesão na Leishmaniose Cutânea.

Coletou-se o baço destes animais antes e depois da infecção com *T. b. brucei* e/ou *L. major*. As células foram estimuladas com o SLA, antígeno total da *L. major* e LJM-11 uma proteína recombinante da saliva de *Lu. longipalpis*. Utilizou-se LJM-11, com o objetivo de se verificar se antes e depois dos animais terem sido expostos às picadas dos flebotomíneos, a resposta imune sistêmica contra este antígeno salivar seria específica.

A quantificação das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2 por linfócitos T, no baço dos animais após 10 dias de infecção com *T. b. brucei*, resultou em uma elevada expressão inespecífica destas citocinas após estimulação com LJM11 e SLA (Fig. 18A e D).

O outro achado consiste no fato de que essas células, apenas no meio de cultura, sem nenhum estímulo antigênico, também apresentaram um número elevado de linfócitos expressando as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10 (Fig. 18A,D,G). Destacou-se, após 3 semanas da co-infecção com *L. major*, um aumento na frequência de linfócitos produzindo IFN- $\gamma$  (Fig. 18B). Ao analisar-se, o IFN- $\gamma$  após 6 semanas, observou-se um leve decréscimo desta citocina, entretanto, os níveis continuaram prevalecendo em relação ao grupo controle apenas infectado com *L. major* (Fig. 18C). Por sua vez, a citocina IL-2 apresentou um aumento significativo em relação ao grupo controle no tempo mais tardio, 6 semanas após a co-infecção (Fig. 18F).

Neste estudo, ficou evidente que a expressão de IL-10 aumentou quando a infecção com *T. b. brucei* estava no ponto mais tardio da co-infecção (Fig. 18I).



**Figura 18 – Infecção com *T. b. brucei* induz uma resposta imune, do tipo Th-1-** Os linfócitos do baço ( $5 \times 10^6$ ) de camundongos foram estimulados com SLA ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), LJM-11 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), ConA ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou cultivados sozinhos (Meio), durante 24h/37°C/5%CO<sub>2</sub>. As células foram coletadas, lavadas e marcadas para, os linfócitos TCR-β<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> produtores de: IFN-γ (A, B, C), IL-2 (D,E,F) e IL-10 (G,H,I) e avaliadas por citometria de fluxo. Estas populações, foram analisadas, nos tempos de 10 dias após a infecção com *T. b. brucei*, 3 e 6 semanas após a transmissão da *L. major*. Os resultados estão apresentados como número absoluto de células que expressam os marcadores em questão e como média  $\pm$  SEM. Os resultados foram obtidos do *pool* de 5 animais/grupo, em 3 experimentos distintos. (\*,  $p < 0.05$ ) (\*\*,  $p < 0.01$ ).

## 7 DISCUSSÃO

A leishmaniose cutânea (LC) e a doença do sono (DS) são infecções parasitárias graves que tem se expandido geograficamente, atingindo populações em vários países e causando repercussões na saúde coletiva e economia (WHO, 2015). Ambas as doenças são transmitidas por vetores, atingem o ser humano e diferentes espécies de animais. Por serem zoonoses e possuírem ciclo digenético, torna-se mais desafiador entender os aspectos da doença e executar medidas profiláticas voltadas para homem, animais domésticos e controle do vetor.

Na África, existem países com áreas endêmicas para LC e DS. O mapeamento global dessas doenças tropicais negligenciadas mostra que os moradores das regiões atingidas correm risco constante de adquirirem ambas as enfermidades, sinalizando a possibilidade de casos de co-infecções (FRANCO et al., 2014; POGGOT et al., 2014). É complicado eliminar ou proteger os animais selvagens e domésticos que são reservatório destes parasitos. Aproximadamente 8,5 milhões de Km<sup>2</sup>, em 37 países no continente africano estão infestados com a mosca Tsé-tsé - o vetor transmissor do *Trypanosoma brucei spp* (ALLSOPP et al., 2001).

Desse modo, no intuito de evitar a disseminação das parasitoses LC e DC, pesquisas no campo das ciências biológicas buscam esclarecer questões, tais como patogêneses, terapias, vacinação, diagnósticos, ambientes propícios ao vetor, resposta imune, dentre outros fatores relacionados à doença. Apesar de ambos os parasitos serem da família Trypanosomatidae, possuem ciclo biológico, indução da resposta imune e mecanismos de sobrevivência no hospedeiro, ou reservatório, completamente distintos.

Pensando sobre a realidade destas Trypanosomíases no continente africano, o presente estudo avaliou se a co-infecção com *T. b. brucei* pode modular as células T e B, e consequentemente, influenciar no curso da *L. major* na leishmaniose cutânea transmitida pela picada de *Lu. longipalpis* em camundongos C57BL/6.

Inicialmente, foi investigado se, de fato, os animais haviam sido infectados com o *T. b. brucei* e se os números dos parasitos tinham se multiplicado quando comparado ao inóculo inicial de 10<sup>3</sup> de *T. b. brucei* utilizado. Tripomastigotas, na infecção aguda, multiplicam-se rapidamente por divisão binária no sangue, linfonodo e fluído espinhal. Constatou-se no nosso estudo que, quatro dias após a infecção, todos os animais apresentavam, na corrente sanguínea, 10<sup>8</sup> do parasito, confirmando uma infecção ativa com *T. b. brucei*.

A partir da constatação de que já havia uma infecção ativa, os animais foram tratados, duas vezes, com Aceturato de Diminazeno (Berenil), 10 dias após a infecção com *T. b. brucei*. Dessa forma, os animais vivos foram mantidos com uma carga parasitária baixa, embora ativa, do *T. b. brucei*. A literatura mostra que camundongos infectados com *T. brucei spp*, sem nenhuma intervenção terapêutica estabelecida, vão a óbito em torno de 30 dias, devido à intensa disseminação sistêmica das tripomastigotas do *T. brucei* (KEITAY et al., 1987).

O fármaco Berenil tem sido uma das drogas de escolha, no tratamento da doença do sono em humanos, animais de produção e de laboratório. Entretanto, a eficácia da droga, dependerá da cepa do *T. brucei spp*, da carga parasitária inoculada, resposta imune do hospedeiro e principalmente do tempo de infecção antes do início do tratamento com o Berenil. Se o tratamento com Berenil for estabelecido em tempo hábil, antes do *T. brucei spp* atravessar a barreira hematoencefálica, as chances de se obter a cura serão maiores. Jennings et al evidenciaram que ao se infectar camundongos diretamente em um órgão ou sangue com *T. b. brucei*, apenas os animais tratados com Berenil, em até 3 dias pós-infecção, obtinham a cura. Contudo, quando o *T. b. brucei* foi inoculado diretamente no cérebro desses animais, o relapso da infecção aconteceu, independente do tratamento com o Berenil (JENNINGS et al., 1979).

Em camundongos, a dose resposta do Berenil em relação ao tempo de infecção é variável. Dados da literatura mostraram que, animais infectados com *T. b. brucei* permaneceram curados após o tratamento com uma única dose de Berenil (5mg/kg). A cura desses animais só foi possível porque a terapêutica foi estabelecida entre 3 a 7 dias após infecção com *T. b. brucei*. Nesse mesmo estudo, outro grupo de animais infectados com *T. brucei*, foi tratado com uma dose alta de Berenil (40mg/Kg) mais tardiamente, entre 14 a 21 dias após a infecção (JENNINGS e GRAY, 1983). Esses últimos animais não obtiveram a cura, apenas a carga parasitária foi controlada até 40 dias, não sendo possível detectar a presença do *T. b. brucei* no sangue. Mesmo prolongando o tratamento, aplicando seis vezes a dose de 40mg/Kg de Berenil a cada 21 dias, o grupo continuou mostrando relapsos da presença do parasito no sangue após 30 dias. Mesmo recebendo doses máximas de Berenil, como 160mg/Kg, não foi possível eliminar o parasito.

No estudo presente, os animais receberam duas doses de 40mg/Kg de Berenil, 10 dias após a infecção. Trinta e um dias após a primeira dose, os animais apresentavam uma carga de *T. b. brucei* ( $10^8$ ) no sangue, similar à carga presente antes do tratamento. Apesar do medicamento ser extensivamente utilizado no tratamento de humanos e animais naturalmente

infectados com *T. brucei spp*, diante dos resultados do experimento realizado e comparando-os com outros estudos, mostrou-se que o tratamento com Berenil tem limitações na obtenção da cura asséptica por não atravessar a barreira hematoencefálica em camundongos infectados experimentalmente com *T. brucei spp*.

Os animais previamente infectados com *T. b. brucei* (grupo teste), e os não infectados (controle), foram expostos à transmissão natural da *L. major* por *Lu. longipalpis*. Escolheu-se esse método porque com a picada do vetor, no momento da inoculação da *Leishmania spp* na pele, são injetados, juntos, as proteínas da saliva, exosomes, microbioma do intestino e PSG (Gel Secretado pela Promastigota). Todo este conjunto de componentes do vetor influencia o desfecho da virulência da *Leishmania* no hospedeiro, diferente da infecção artificial, utilizando agulha. A transmissão natural da *Leishmania* para os camundongos, realizada neste estudo, mimetizou o que acontece na natureza.

Nas avaliações das três infecções artificiais realizadas no presente estudo, a maioria dos flebotomíneos possuía em seu intestino, uma carga de  $10^2$  a  $10^6$  promastigotas metacíclicas de *Leishmania*. No entanto, Kimblin e colaboradores ao realizarem infecção com o vetor, avaliaram a carga da *Leishmania* na orelha do camundongo, após a transmissão da *L. major* por apenas um único *Phlebotomus duboscqi* infectado. Constatou-se que flebotomíneos infectados com baixo e alto número de *L. major* no intestino, foram capazes de transmitir respectivamente 600,  $10^3$  a  $10^6$  parasitos (KIMBLIN et al., 2008).

Nossos resultados do *score* da quantidade de sangue no intestino de cada fêmea de *Lu. longipalpis* foi um fator que evidenciou o sucesso da transmissão da *Leishmania* para o camundongo. A maioria das fêmeas foram classificadas como parcialmente alimentadas, ou seja, o intestino não estava repleto de sangue. Estudos com vetores revelaram que em fêmeas altamente infectadas, as *Leishmanias* secretam o gel PSG, formando uma barreira física parcial (*plug*) na válvula estomodeu do intestino médio anterior do vetor. O gel PSG, pode promover a cronicidade da infecção causada pela *Leishmania*, mesmo em linhagens de camundongos considerados capazes de controlar a doença. Além disso, o gel PSG muda o comportamento do vetor devido à maior dificuldade em deglutir o sangue, realizam mais tentativas, aumentando a probabilidade da *Leishmania* ser regurgitada e inoculada na pele (revisado por ROGERS., 2012). Tal observação foi vista em nosso estudo, fêmeas alimentadas parcialmente, estavam presentes no dia da transmissão da *L. major* para os animais utilizados. Não testamos, mas

acreditamos que o gel PSG impediu que o vetor se alimentasse e não ficasse com o intestino repleto de sangue

Dando continuidade ao presente estudo, para avaliar se a co-infecção com *T. brucei* poderia influenciar a LC, decidiu-se usar camundongos C57BL/6, que são uma linhagem considerada resistente à LC. A literatura relata que, ao se inocular com agulha até  $10^7$  de *L. major* em C57BL/6, esses animais desenvolvem lesões cujas características clínicas são clássicas da LC, principalmente no tempo de 6 semanas (revisto por SACKS.; NOBEN-TRAUTH., 2002). Entretanto, os camundongos conseguem, sem intervenções, resolver a lesão espontaneamente. Entre 10 a 12 semanas, observa-se a cura e se tornam mais resistentes a uma nova infecção pela *Leishmania* (SACKS e NOBEN, 2002).

Após a transmissão natural da *L. major* na orelha dos animais, durante 6 semanas, mensurou-se o tamanho da(s) lesão(ões). Observou-se que os camundongos pertencentes ao grupo co-infectado com *T. b. brucei* não desenvolveram lesão, ou mostraram apenas um leve aumento inicial da úlcera na orelha. Completamente oposto foi observado nos animais infectados apenas com *L. major*, sendo as lesões maiores, mais inflamadas, edemaciadas, hiperêmicas, com crostas ao redor e algumas secreções purulentas.

Após ter observado, em experimentos distintos e repetidos, que na co-infecção com *Trypanosoma* existe diminuição na lesão causada pela *L. major*, decidiu-se investigar se esse achado refletia-se no controle da carga parasitária de *Leishmania*. A co-infecção com *T. b. brucei* foi capaz de diminuir a carga parasitária da *Leishmania* no linfonodo auricular drenante, no tempo de 3 semanas após a transmissão natural. Além disso, em 3 semanas, o número de *L. major* no grupo teste (co-infectados), era praticamente zero na maioria dos animais, e poucos camundongos apresentaram  $10^3$  parasitos. Isso equivalia a 50% da carga parasitária de *Leishmania* no grupo controle. Entretanto, 6 semanas após a co-infecção, esse controle do número de *Leishmania* foi perdido, equiparando-se ao do grupo controle.

Poucos trabalhos na literatura relatam o efeito das co-infecções experimentais nas leishmanioses em geral. Camundongos C57BL/6 previamente infectados com o vírus da coriomeningite ou com a bactéria *Listeria monocytogenes*, apresentaram exacerbação da lesão mas sem aumento da carga de *L. major*, quando comparado ao grupo controle. Nesse mesmo estudo, observou-se que o aumento da lesão no grupo co-infectado, foi devido ao intenso infiltrado de monócitos e neutrófilos no local da lesão. Além disso, a presença do vírus ou da

bactéria, induziu significativo aumento da frequência das células TCD8 de memória, maior liberação de granzima B e expressão do receptor NKG2D. Nesse mesmo estudo, ao se utilizar anticorpo bloqueador para o receptor NKG2D, houve uma diminuição da lesão, sugerindo que as células TCD8 de memória podem agravar a patologia da lesão na LC, através do mecanismo dependente de NKG2D (CROSBY et al., 2014).

Resultados similares mostrando exacerbação da lesão foram obtidos na co-infecção com *Schistosoma mansoni* e *L. major*, todavia acompanhado com aumento da carga parasitária da *Leishmania*. Camundongos C57BL/6 quando previamente infectados com *Schistosoma mansoni*, apresentaram aumento na secreção IL-4 e diminuição da produção de IFN- $\gamma$ , NO e TNF- $\alpha$ , conseqüentemente houve inibição das atividades macrofágicas, gerando retardamento da resolução da lesão e aumento da carga parasitária da *L. major*. Com os resultados obtidos do experimento realizado na presente pesquisa e outros trabalhos publicados por diferentes grupos, é possível inferir que os resultados nas co-infecções da leishmaniose cutânea são bastante variáveis (FLAMME et al., 2002).

Nossos resultados mostraram que os animais co-infectados perderam o controle da carga de *Leishmania* porque, sistemicamente, o *T. b. brucei* disseminou-se, não sendo mais possível controlar a doença, após 6 semanas, esses animais foram a óbito. Vale ressaltar que houve tentativas para se manter os animais vivos por mais tempo, mas após a infecção com *Leishmania*, estes não foram mais tratados com o Berenil, pois é uma droga tripanossomicida, e poderia ter influência sobre o quadro clínico da LC. Camundongos sem nenhuma intervenção terapêutica estabelecida, foram a óbito devido à intensa disseminação sistêmica do *T. b. brucei*. Um dos fatos que confirmam este dado foi a perda de peso corporal dos animais co-infectados ao longo do estudo. Neste trabalho, todos os animais de ambos os grupos (Controle/Teste) foram monitorados quanto ao seu peso, antes e após a transmissão da *L. major*. Notou-se nos animais, 3 semanas após a co-infecção com *T. b. brucei* e *L. major*, a sintomatologia da Nagana, com intensa perda de peso acompanhada de letargia, inapetência e abdômen agudo. Acredita-se que o aumento da carga de *Leishmania* no tempo de 6 semanas, está diretamente associada a sintomatologia observada.

Igualmente, confirmou-se que a morte dos animais resultou da disseminação do *T. b. brucei*, pois ao verificarmos as amostras histopatológicas do tecido cerebral observou-se que os animais que foram infectados com *T. b. brucei* por 10 dias, não apresentavam nenhuma alteração histopatológica no cérebro. Entretanto os roedores infectados com *L. major* nos

tempos de 3 semanas após a transmissão da *L. major* (67 dias com *T. b. brucei*), evidenciaram poucas inclusões do *T. b. brucei* no terceiro ventrículo dorsal, no plexo coroide. Após 6 semanas da transmissão da *L. major* (88 dias com *T. b. brucei*), mostraram encefalite crônica e presença de numerosos *T. b. brucei*.

Keita e colaboradores (1997), com o objetivo de avaliar as alterações no cérebro, fenômeno de grande ocorrência na tripanossomíase africana humana, desenvolveram um modelo experimental que sobreviveu até um ano infectado com *T. b. brucei*. Eles observaram que, 3 a 4 semanas após a infecção, o cérebro, dos camundongos apresentavam células inflamatórias mononucleares no plexo coroíde e meninges. Entre 3 e 4 meses, obtiveram resultados similares aos do presente estudo - animais com meningite suave a generalizada e perivascularite no parênquima. Os camundongos que foram mantidos após 3 meses, apresentaram severa meningite, numerosas células mononucleares presentes nos espaços perivascular e parênquima, astrocitose e desordens neurológicas. É importante mencionar que, neste mesmo estudo, foi possível manter, por um ano, os camundongos infectados e vivos, porque foram tratados com Suramin (Moranyl) a cada relapso do parasito no sangue, diferente do presente estudo, onde os animais apenas receberam o tratamento antes da transmissão da *L. major*. A droga Suramin é similar ao Berenil, não possuindo a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e destruir os *T. brucei spp* presentes no cérebro (KEITA et al., 1997).

O alojamento do *T. brucei spp* no parênquima cerebral é a patogenicidade mais grave e a principal causa da morte na tripanossomíase africana humana e animal. Estudos recentes, realizados por Amin (2012) e outros pesquisadores, têm esclarecido que as células T são as responsáveis por facilitar os mecanismos de travessia do *T. brucei spp* na barreira hematoencefálica, permitindo o parasito alcançar o cérebro. A imunidade inata é responsável por estimular a sinalização da via TLR-MyD88, que por sua vez aumenta os níveis de secreção das citocinas como IFN- $\alpha/\beta$ , TNF-  $\alpha$ , e dos receptores promotores da infiltração das células T e *T. brucei spp* no parênquima cerebral (AMIN et al., 2012).

No presente estudo, as análises histopatológicas do tecido esplênico constituem outro dado que confirma que a infecção pelo *T. b. brucei* estava disseminada, ocasionando o óbito dos animais 6 semanas após a transmissão da *L. major*. Todos os camundongos do grupo co-infectado mostraram esplenomegalia, acompanhada de alterações citológicas características/típicas da Nagana, tais como desestruturação folicular, fibrose, infiltrado de células hematopoiéticas extra medular, vacuolização e apoptoses no baço.

O grupo de Radwanska publicou dados que corroboram com os achados da atual pesquisa. Mostraram que a infecção com *T. b. brucei* em camundongos causa extensiva remodelagem da micro-arquitetura do baço, com considerável perda das várias populações das células B. Concluíram que a desestruturação esplênica, após infecção com *T. b. brucei*, acarreta na diminuição da capacidade de resposta protetora por anticorpos contra agentes infecciosos, diminuição da população de células B responsáveis pela resposta de memória, além de inibir a resposta induzidas por vacinas correlacionadas a outros patógenos (RADWANSKA et al., 2008).

Nossos resultados, entretanto, evidenciam que os animais co-infectados com *T. b. brucei* conseguem controlar a carga parasitária da *Leishmania major* no linfonodo, nos tempos iniciais de 3 semanas, embora após 6 semanas este fato não é mais evidenciado. Acredita-se que a perda ocorreu devido à disseminação do *T. b. brucei*, acentuando o quadro da doença Nagana, na qual os animais ficaram tão debilitados que não foi possível manter o controle da *Leishmania*. Deve-se ressaltar que os animais do grupo co-infectado, mesmo doentes, mantinham um controle do tamanho da lesão na LC causada por *L. major*, quando comparados aos animais infectados apenas com *L. major*.

Diante dos resultados desse experimento, decidiu-se investigar como o *T. b. brucei* modula a resposta imune, conferindo proteção contra a patologia da LC. A princípio, suspeitou-se que a origem da proteção refletida pela diminuição da lesão na LC estava relacionada ao fato de ambos os parasitos, *Leishmania* e *Trypanosoma*, serem da família Trypanosomatidae. Assim, poderia existir uma similaridade entre os antígenos e isso estaria causando uma reação cruzada e, como consequência, a proteção.

É sabido que as glicoproteínas variantes de superfície (VSG) do *Trypanosoma* são as principais proteínas de membrana do parasito na fase sanguínea no hospedeiro. Dados da literatura, mostram que as promastigotas de *Leishmania donovani* possuem uma glicoproteína de membrana plasmática, chamada p63, que apresenta similaridade com a VSG. Anticorpos anti-VSG reconhecem a proteína p63 de *Leishmania*, mostrando a existência de reação cruzada entre os antígenos (BORDIER et al., 1986).

Considerando-se esse achado e a possível similaridade entre os antígenos, investigou-se, inicialmente, se o SLA, antígeno total solúvel da *Leishmania*, possuía similaridade com as proteínas do *T. b. brucei*, capazes de serem reconhecidos por reação cruzada dos anticorpos.

Constatou-se que todos os animais infectados com *T. b. brucei* (não infectados com *L. major*) apresentaram resposta imune humoral com a produção de IgG anti-SLA de *Leishmania major*. Os soros dos animais infectados apenas com *Leishmania* não apresentavam anticorpos que reconhecessem, por reação cruzada, nenhum dos antígenos do Trypanosoma AnTat 1.1 Lisado (antígeno bruto solúvel do parasito total) e Antat 1.1 sVSG (uma proteína de superfície da membrana purificada).

Ao se testar os soros desses animais, infectados com *T. b. brucei*, contra antígeno total de Microfilária - um parasito filogeneticamente diferente da família trypanosomatidae - também observou-se reconhecimento destas proteínas pelos anticorpos presentes nos animais infectados pelo Trypanosoma. Assim, nos animais infectados com *T. b. brucei*, as diferentes respostas imunogênicas detectadas pelos títulos de anticorpos anti-antígenos não expostos, não podem ser justificadas por reação cruzada entre os antígenos dos parasitos testados. O *T. b. brucei*, induz uma ativação policlonal de linfócitos B, induz alta produção de anticorpos que possuem especificidade variada, reagindo com as proteínas de diferentes patógenos, sem exposição prévia. Acreditamos que, por este motivo, os animais do nosso estudo, apresentaram títulos de anticorpos, que reconheciam os antígenos bruto total da *Leishmania* e *Microfilária*.

Sabe-se que um único plasmócito pode produzir milhares de anticorpos, secretando-os, em grandes quantidades, na circulação. A síntese de anticorpos diminui, gradativamente, somente se o estímulo for removido. Diante dos resultados do experimento, hipotetizou-se que, talvez, estivesse acontecendo produção exagerada de anticorpos não específicos. Portanto, decidiu-se caracterizar e quantificar os plasmócitos com os marcadores de superfície CD138<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>. Observou-se que, em todos os tempos analisados, a população de plasmócitos estava em números maiores no grupo infectado com *T. b. brucei*. Após evidenciar este dado, pode-se concluir que o aumento da população dos plasmócitos levou à produção de anticorpos policlonais, capazes de reconhecerem os antígenos de *Leishmania* e *Microfilária*. Resultados semelhantes foram observados por Magez e colaboradores, quando realizaram experimentos em camundongos. Após serem infectados com *T. b. brucei* por 10 dias, houve um aumento da população dos plasmócitos no baço e, aos 17 dias, uma leve redução. Essa população celular sofre flutuações de acordo com os relapsos da parasitemia no sangue (RADWANSKA et al., 2008).

Buscando entender como esses animais co-infectados estavam controlando a lesão da LC, avaliou-se o perfil das citocinas no local na lesão, exatamente na orelha exposta à

transmissão da *Leishmania*. Em relação às citocinas, sabe-se que, na leishmaniose cutânea experimental murina, existem duas respostas bem distintas, as quais determinam o curso da infecção pela *Leishmania*. Uma das respostas mediadas por células Th1 é caracterizada pela secreção das IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 que levam à destruição do parasito e resolução da infecção. A resposta induzida por células Th2 e Treg inibem a resposta celular do tipo Th1, promovendo a sobrevivência do parasito, ocorrendo o progresso da doença. Estas populações celulares podem criar um microambiente, secretando citocinas tais como IL-4, IL-13, TGF- $\beta$  e IL-10, que estimula respostas humorais, favorecendo a sobrevivência da *Leishmania* (LIEW et al., 1990; PASSWELL et al., 1994.; GHORESCHI et al., 2010).

Ao avaliarmos a resposta imune local na orelha, constatou-se que o grupo co-infectado possuía maior expressão de IFN- $\gamma$ . Atribuiu-se o controle patológico da lesão, até 6 semanas, e o controle da carga de *L. major* no linfonodo, até 3 semanas, às altas concentrações de IFN- $\gamma$ , induzidas pela presença do *T. b. brucei*. Essa é a uma das citocinas mais importante que está correlacionada ao controle e resistência de ambas as tripanossomíases, leishmanioses e a doença do sono. Além das leishmanioses e Trypanosomiasis Africanas, outras doenças têm mostrado que a ausência do IFN- $\gamma$  está relacionada à suscetibilidade e progressão dessas células. Patógenos, tais como *Mycobacterium tuberculosis* (BARNES et al., 1993), *Mycobacterium leprae* (YAMAMURA et al., 1991) *Listeria monocytogenes* (ELSE et al., 1994), *Candida albicans* (ROMANI et al., 1991) e influenza vírus (GRAHAM et al., 1994), possuem um prognóstico responsivo melhor quando a resposta celular é do tipo Th-1, com produção de IFN- $\gamma$ .

O trabalho de Hertz e seu grupo demonstraram que a resistência da Trypanosomiasis Africana depende de IFN- $\gamma$ . Os pesquisadores infectaram duas linhagens de camundongos com *T. b. rhodesiense*, camundongos (C57BL-6) que são resistentes, por terem um perfil de citocinas Th1, e animais susceptíveis (C3H) por produzirem citocinas com perfil Th2. Após a infecção, os camundongos resistentes, responderam com alta produção de IFN- $\gamma$  e IL-2. Já os camundongos susceptíveis produziram baixa concentração de IFN- $\gamma$  e alta de IL-4. Ao realizar a transferência de células do baço dos animais resistentes para os camundongos susceptíveis, esses conseguiram controlar a parasitemia, com uma forte resposta celular Th-1 (HERTZ et al., 1998). Um estudo de Shi e colaboradores mostrou que ao se infectar camundongos BALB/c com uma cepa virulenta de *T. brucei spp*, os animais foram a óbito em apenas oito dias. Correlacionaram a morte dos animais com excessiva síntese de IFN- $\gamma$  pelas células TCD4<sup>+</sup>. Ao

infectar camundongos parcialmente deficientes para células TCD4<sup>+</sup>, houve menor produção de IFN- $\gamma$  e IL-10, os animais controlaram melhor a parasitemia e sobreviveram mais tempo. Concluíram que o excesso de IFN- $\gamma$ , sem o equilíbrio com IL-10, causa a morte dos animais (SHI et al., 2006).

No decorrer do estudo, a partir da constatação das pesquisas anteriormente realizadas, avaliou-se a resposta imune sistêmica no baço dos camundongos utilizados. Constatou-se que a infecção com *T. b. brucei* manteve alta a produção da citocina inflamatória-IFN- $\gamma$ , antes e depois da transmissão com a *L. major*. O nível alto de IFN- $\gamma$  sistêmico parece ser o fator protetor relevante que estava presente no momento em que esses animais foram expostos às picadas dos flebotomíneos para a transmissão da *L. major*. O sistema imune desses animais já estava previamente ativado. Acreditamos que esta alta produção de IFN- $\gamma$  circulante foi capaz de controlar, inicialmente, a carga parasitária da *L. major*. Resultados em modelos experimentais, mostraram que o controle da replicação da *Leishmania* é dependente da produção IFN- $\gamma$ , que é o mediador principal para ativação dos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos infectado. Entretanto, em humanos o excesso de IFN- $\gamma$ , exacerba a inflamação da LC (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; SACKS, 2006).

Observou-se que, nos tempos avaliados, a concentração maior de IFN- $\gamma$  sistêmico foi no período de 3 semanas após a transmissão da *L. major*, exatamente no momento em que os animais co-infectados possuíam menor número de *Leishmanias* no linfonodo. Os achados da pesquisa são compatíveis com a literatura, que sustenta a associação da produção de IFN- $\gamma$  com a proteção nas leishmanioses. Um estudo recente mostrou que camundongos deficientes na produção de IL-12 apresentavam menor produção da citocina IFN- $\gamma$  e, consequentemente, maior carga parasitária no linfonodo e lesão exacerbada causada pela *L. major* (ASHOK et al., 2014). O grupo do pesquisador Phillip Scott publicou, este ano, um estudo interessante sobre a importância do IFN- $\gamma$  na LC em camundongos. Eles mostraram que a população de células TCD4<sup>+</sup> de memória específica anti-*Leishmania* residentes na pele, quando transplantadas em outros camundongos, agem via o receptor CXCR3, recrutando mais células TCD4<sup>+</sup> circulantes produtoras de IFN- $\gamma$  para o local da lesão, resultando em melhor controle da *L. major* (GLENNIE et al., 2015). Recentemente evidenciou-se que, a infecção cutânea prévia com *Leishmania major* é capaz de fornecer uma proteção heteróloga contra a infecção visceral com *Leishmania infantum*. Essa proteção foi associada a uma frequência robusta da presença das

células T CD4 Ly6C (+) T-bet produtoras de IFN- $\gamma$ , na derme e de forma sistêmica, induzidas previamente pela infecção por *L. major*. Minutos após o desafio com *L. infantum*, essa população celular já estava ativa, presente no local do inóculo (ROMANO et al., 2015).

Resultados semelhantes aos que foram encontrados na presente pesquisa, sobre a capacidade protetora do IFN- $\gamma$ , foram vistos na leishmaniose cutânea em humanos. Pacientes com LC que apresentavam, polimorfismo no alelo do gene IL2RA possuíam menor resposta na produção de IFN- $\gamma$  e baixa ativação das células T regulatórias FOXP3<sup>+</sup>. Observou-se que foram mais suscetíveis ao desenvolvimento da úlcera causada por *L. braziliensis*. Esse resultado é mais um indício de que o IFN- $\gamma$  aumenta a imunidade anti-*Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2015). O grupo de Brodskyn, publicou dados corroborativos sobre o papel protetor do IFN- $\gamma$  em humanos infectados com *L. braziliensis*. A cocultura de macrófagos infectados e células T CD4<sup>+</sup> aumentou fortemente a morte do parasito, mediada por IFN- $\gamma$ . Tais resultados foram completamente revertidos ao se utilizar anticorpos anti-IFN- $\gamma$  (SANTOS et al., 2013). Além disso, tem sido relatado que indivíduos moradores de áreas endêmicas para LC e que estão infectados, mas considerados sub-clinicamente assintomáticos, possuem linfócitos circulantes que quando estimulados com SLA produziram altos níveis de IFN- $\gamma$ . Acredita-se que IFN- $\gamma$  é o responsável pelo controle da infecção nesses pacientes (FOLLADOR et al., 2002).

No presente estudo, observou-se que, 6 semanas após a transmissão da *L. major*, os animais co-infectados com *T. b. brucei*, apesar de manterem o controle patológico do tamanho da lesão, perderam o controle da carga parasitária da *Leishmania*. Acredita-se que a não sustentação, tardiamente, da proteção da carga de *Leishmania*, ocorreu devido a disseminação do *T. b. brucei* e ao aumento sistêmico da população das células TRC- $\beta$ +CD4<sup>+</sup>, produtoras de IL-10. Isto contribui diminuindo a capacidade microbicida do macrófago e facilitando o crescimento e replicação da *Leishmania*.

A IL-10 pode suprimir a ação das células T durante a fase inicial da infecção e facilitar a multiplicação da *Leishmania*. Rocha e colaboradores avaliaram a resposta imune linfoproliferativa de pacientes com LC, infectados mais recentemente (menos de 60 dias de infecção) e tardiamente (mais de 60 dias de infecção). Os pacientes com uma infecção mais recente apresentaram níveis de IL-10 cinco vezes maiores que os pacientes que acima de 60 dias infectados. Acredita-se que IL-10, no início da infecção, favorece o estabelecimento da *Leishmania* (ROCHA et al., 1999). As atividades leishmanicida de macrófagos humanos

contra *L. major*, é inibida de modo mais potente pela ação da IL-10 do que pela IL-4, e isso ocasiona a diminuição da produção de óxido nítrico (VOULDOUKIS et al., 1997).

Vale ressaltar que as proteínas salivares do vetor da *Leishmania*, no momento da inoculação podem induzir a produção de IL-10 e agravar a disseminação da doença. Abdeladhim et al., (2011) mostraram que indivíduos que moram em áreas endêmicas para LC, e estão constantemente sendo expostos aos antígenos da saliva no momento das picadas de *Phlebotomus papatasi*, tem altos níveis de células TCD8<sup>+</sup> produzindo IL-10, contra a saliva. Os autores postularam que o excesso de IL-10 facilita a infecção da *Leishmania*. Recentemente, foi publicado que indivíduos naturalmente expostos à saliva de *Lutzomyia intermedia*, têm resposta imune com predominante produção de IL-10 pelas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, e que estas células são responsáveis por aumentar o risco de se adquirir LC (CARVALHO et al., 2015).

Acreditamos que a citocina IL-10 desempenhou um papel importante na patogênese da LC, pois teve a capacidade de diminuir o efeito pró-inflamatório do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e conseqüentemente pode ter controlado a exacerbação inflamatória da úlcera. Pesquisas anteriores publicaram evidências sobre a ação da IL-10, as quais corroboram com os nossos resultados. Comparando-se os níveis de IL-10, em cultura de células de pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose cutânea mucosa, observou-se que ambos os grupos produziam concentrações similares de IL-10. Todavia, os pacientes com leishmaniose cutânea mucosa, apresentavam na lesão, menos receptores para IL-10 quando comparados ao grupo com LC. Concluiu-se que a baixa expressão dos receptores de IL-10 nos pacientes com leishmaniose cutânea mucosa é diretamente associada com o perfil inflamatório e citotóxico intenso no quadro clínico desses pacientes (FARIA et al., 2005).

Assim, os resultados obtidos por outros grupos de pesquisa, avaliando a resposta imune na LC em animais e humanos, corroboram com os dados obtidos no presente estudo e mostram que a resposta imune celular do tipo Th-1, com predominância de IFN- $\gamma$ , é indispensável para o controle da lesão e carga parasitária da *Leishmania spp.* Entretanto a magnitude da inflamação que estas células geram na lesão, foi modulada pela participação da citocina IL-10. O presente estudo evidenciou que, o *T. b. brucei* induziu uma resposta imune o suficiente para proteger os camundongos contra a lesão da LC causada pela *L. major*.

## 8 CONCLUSÃO

A infecção ativa com *Trypanosoma brucei brucei* protegeu os animais da lesão da leishmaniose cutânea até seis semanas e também controlou a carga parasitária até 3 semanas após o desafio com *Leishmania major*. Esta proteção observada, foi associada a ativação não específica das células T efectoras, as quais induziram uma resposta inflamatória intensa, principalmente com altos níveis de IFN- $\gamma$  no local da lesão e sistêmico. A presença da IL-10 influenciou os efeitos destas células, evitando os danos teciduais, os quais são inerentes a proteção contra infecção por *L. major*.

## REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, M. et al. Human Cellular Immune Response to the Saliva of *Phlebotomus papatasi*. Is Mediated by IL-10-Producing CD8<sup>+</sup> T Cells and Th1-Polarized CD4<sup>+</sup> Lymphocytes. **PLoS Negl. Trop.** v. 5, n.10, p. 1345, oct. 2011.
- ABUBAKR, O. A. A. et al. Visceral leishmaniasis-hepatitis B/C coinfections: a rising necessity to triage patients for treatment. **Ann. Saudi Med.**, v. 34, n. 2, p. 143-146, mar-apr. 2014.
- ACHCAR, F.; KERKHOVEN, E. J.; BARRETT, M. P. *Trypanosoma brucei*: meet the system. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 20, p. 162-169, jul. 2014.
- AKILOV, O. E.; KHACHEMOUNE, A.; HASAN, T. manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol. Clin.**, v. 46, n. 2, p. 132-142, feb. 2007.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.; R.RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.**, v. 112, Pt 18, p. 2993-3002, sep. 1999.
- ALLSOPP, R. Options for vector control against trypanosomiasis in Africa. **Trends in Parasitol.**, v. 17, n. 1, p. 15–19, 2001.
- AMIN, D. N. et al. Distinct Toll-like receptor signals regulate cerebral parasite load and interferon  $\alpha/\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ -dependent T-cell infiltration in the brains of *Trypanosoma brucei*-infected mice. **J. Infect. Dis.**, p. 320-32, jan. 2012.
- ASHOK, D. et al. Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 44, n. 5, p.1422-432, mar. 2014.
- BARNES, P. F. et al. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 3482, 1993
- BARRAL, A. et al. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, n. 7, p.474-479, jul. 1995.
- BEIL, W.J. et al. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 52, n. 135– 142, 1992
- BELKAID, Y. et al. CD8<sup>+</sup> T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 15, n. 168, p. 3992-4000, apr. 2002.
- BIHL, F. et al., antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells are required for NK cell activation in vivo upon *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 15, n. 185, p. 2174-2181, 2010.
- BOGAART, V. E. et al. *Leishmania donovani* infection drives the priming of human monocyte-derived dendritic cells during Plasmodium falciparum co-infections **Parasite Immunol.**, v. 37, n.9, p. 453-469, sep. 2015.
- BORDIER, C. et al. *Leishmania* and *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycosphospholipid membrane anchor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, n. 16, p. 5988–5991, aug. 1986.

BOURREAU, E. et al. LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. **Infect. Immun.**, v.70, n. 6, p. 3122-3129, jun. 2002.

BRYCESON, A. D. M. et al. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. Effects of immunosuppression and antigenic competition on the course of infection with *leishmania enriettii* in the guinea-pig. **Clin. Exp. Immunol.**, v.10, n. 2, p. 305-335, feb. 1972.

CARVALHO, A.M. et al. Interleukin 10-Dominant Immune Response and Increased Risk of Cutaneous Leishmaniasis After Natural Exposure to *Lutzomyia intermedia* Sand Flies. **J. Infect. Dis.**, v. 212, n. 1, p. 157-165, jun. 2015.

COLLER, S. P.; PAULNOCK, D. M. Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors. **J. Leukoc. Biol.**, v. 70, n. 1, p. 142-148, jul. 2001.

COUPPIÉ, P. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 558-560, nov. 2004.

CROSBY, E. J. et al. Engagement of NKG2D on Bystander Memory CD8 T Cells Promotes Increased Immunopathology following *Leishmania major* Infection. **PLOS.** v.10, n. 2, feb. 2014.

CROSBY, E. J. et al. Lymphocytic Choriomeningitis Virus Expands a Population of NKG2D+CD8+ T Cells That Exacerbates Disease in Mice Coinfected with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 195, n. 7, p. 3301-3310, oct. 2015.

DANIELA, R. F. et al. Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 12, p. 7853–7859, 2005.

DAVARPANAH, M.; RASSAEI, M.; SARI ASLANI F. Presentation of AIDS with Disseminated Cutaneous and Visceral Leishmaniasis in Iran. **Case Rep. Infect. Dis.** ,Article ID 563851, may 2015.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Ther.**, v. 22, n. 6, p. 491-502, nov.-dec. 2009.

DEBUS, A. et al. High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania major* are interleukin-4 dependent. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 12, p. 7215-7218, 2003.

DESQUESNES, M. et al. Biomed *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed. Res. Int.**, 2013

DINCER, E. et al. Potential Animal Reservoirs of Toscana Virus and Coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 4, p. 690–697. 2015.

DOMINGUEZ-PINILLA, N.; BARO-FERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ-GRANADO, L. I. Hemophagocytic lymphohistiocytosis secondary to Epstein Barr virus and *Leishmania* co-infection in a toddler. **Postgrad. Med.**, v. 61, n.1, p. 44-55, jan.-mar. 2015.

- ELSE, K. J. et al. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 347, 1994.
- FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 31, n. 8, p. 432-9, aug. 2009.
- FLAMME, L. A.; SCOTT, P.; PEARCE, E. J. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. **Parasite Immunol.**, v. 24, n. 7, p. 339-345, 2002.
- FOLLADOR, I. et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v.1, n. 34, p.54-58, may. 2002.
- FRANCO, J. R. et al. Epidemiology of human African trypanosomiasis. **Clin. Epidemiol.**, v. 6, p. 257–275, 2014.
- GLENNIE, N.D. et al. Skin-resident memory CD4+ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. **JEM**, v. 212, n. 9, p. 1405-1414, jul. 2015.
- GRAHAM, M. B.; BRACIALE, V. L.; BRACIALE, T. J. Influenza virus-specific CD41 T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1273, 1994.
- GUILLIAMS, M. et al. Experimental expansion of the regulatory T cell population increases resistance to African trypanosomiasis. **J. Infect. Dis.**, v.198, n.5, p. 781-791, sep. 2008.
- GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 21, n. 106, p. 6748-6753, apr. 2009.
- HANRAHAN, O. et al. VOORHEIS, H.P. The glycosylphosphatidylinositol-PLC in *Trypanosoma brucei* forms a linear array on the exterior of the flagellar membrane before and after activation. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 6, jun. 2009.
- HERTZ, C. J.; FILUTOWICZ, H.; MANSFIELD, J. M. Resistance to the African trypanosomes is IFN-gamma dependent. **J. Immunol.**, v. 161, n. 12, p. 6775-6783, 1998.
- HURDAYAL, R. et al. Deletion of IL-4 receptor alpha on dendritic cells renders BALB/c mice hypersusceptible to *Leishmania major* infection. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 5, p-187-199, 2013.
- JENNINGS, F. W. et al. The brain as a source of relapsing *Trypanosoma brucei* infection in mice after chemotherapy. **Int. J. Parasitol.**, v. 9, n. 4, p. 381-384, aug. 1979.
- JENNINGS, F. W.; GRAY, G. D. Relapsed parasitaemia following chemotherapy of chronic *T. brucei* infections in mice and its relation to cerebral trypanosomes. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v. 7, p. 147-154, 1983.
- JIMENEZ, F. et al. CCR2 plays a critical role in dendritic cell maturation: possible role of CCL2 and NF-kappa B. **J. Immunol.**, v.15, n.184, p.5571-5581, 2010

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.86, n. 3, p. 426-33, Mar 2012.

KANE, M. M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.166, n. 2, p.1141-1147, 2001.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 11, n. 98, p. 604-615, jul. 2011.

KEITA, M. et al. *Trypanosoma brucei brucei*: a long-term model of human African trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis, and neurological disorders. **Exp. Parasitol.**, v. 85, n. 2, p. 183-192, feb. 1997.

KENNETH JUNIOR, R. de C. Conceitos de Saúde/Doença e a Produção Acadêmica. **PHYSIS: Rev. Saúde Col.**, Rio de Janeiro, v.17, n. 1, p. 9-13, 2007.

KIMBLIN, N. et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 22, n. 105, p. 10125-10130, 2008.

KRAWCZAK, F. S. et al. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 48, n. 1, p. 64-68, jan./feb. 2015.

KROPF, P. et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 4, p.1920-1928, 2004

KROPF, P. et al. Expression of Th2 cytokines and the stable Th2 marker ST2L in the absence of IL-4 during *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 11, p. 3621–3628, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J. J; SILVEIRA, F. T. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 4, p. 702-703, 1987.

LASKAY, T.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 9, p. 2237-2241, 1993.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes—Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiol.**, v. 11, n. 5, p. 210–214, maio. 2003.

LAUFS, H. et al. Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, 2002.

LAWYER, P.G. et al. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, n. 1, p. 31-43, 1990.

LESSA, H. A. et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 2, p. 87-89, aug. 2001.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, v. 145, n. 12, p. 4306-4310, 1990.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.18, n. 89, p. 3136, sep. 2014.

LIU, G. et al. Signaling Is Crucial for Survival of Mice Infected with African Trypanosomes via Preventing Lethal Effects of CD4+ T Cells and IFN- $\gamma$ . **PLoS Pathog.**, v. 29, n.1 1, p. 7, jun. 2015.

MACLEAN, L. M. et al. Focus-specific clinical profiles in human African Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 4, p. 12. Dec. 2010.

MAHBOUDI, F. et al. Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species levels by PCR. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 34, n. 10, p. 756-758, 2002.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of murine macrophages. **Curr. Protoc. Immunol.**, Chapter 14, Unit 14.2, nov. 2008.

MÜLLER, I. et al. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. **Int. Immunol.**, v. 3, n. 6, p. 587-597, jun. 1991.

MUNDER, M. et al. L-Arginine deprivation impairs *Leishmania major*-specific T-cell responses. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 8, p. 2161–2172, aug. 2009.

MURUGAIYAN, G. et al. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v. 15, n. 183, p. 2435-2443, aug. 2009.

NASHLEANAS, M.; KANALY, S.; SCOTT, P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. **J. Immunol.**, v. 160, n. 11, p. 5506-5513, 1998.

NOBEN-TRAUTH, N. et al. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 15, n. 170, p. 5152-5158, 2003.

NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W. E.; AND SACKS, D. L. IL-4- and IL- 4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. **J. Immunol.**, v. 162, p. 6132–6140, 1999.

NOVAIS, F. O. et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 7, p. 504, 2013.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 34, n. 12, p. 551-561, dec. 2012.

OLIVEIRA, P.R. et al. IL2RA genetic variants reduce IL-2-dependent responses and aggravate human cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 15, n. 194, p. 2664-2672, feb. 2015.

PASSWELL, J. H. et al. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 75, n. 4, p. 277-284, 1994.

PAULNOCK, D. M.; FREEMAN, B. E.; MANSFIELD, J. M. Modulation of innate immunity by African trypanosomes. **Parasitology**, v. 137, n. 14, p. 2051-2063, dec. 2010

PEREIRA, L. I. et al. Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 3, p. 378-383, sep. 2009 .

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n. 9, p. 1290–1296, sep. 2009.

PETERS, N.C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v.15, n. 321, p. 970-974, 2008.

PIGOTT, D. M. et al. Global Distribution Maps of the Leishmaniasis. **eLife**, v. 10. p. 7554, 2014.

PIMENTA, P. F. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly mid-gut. **Parasitology**, v.115, p. 359-369, 1997.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, E. M.; SACKS, D. L. The comparative fine structure and surface glycoconjugative expression of three life stage of *Leishmania major*. **Exp Parasitol.**, Ed: 72, 1991. p.191-197.

PIRES, M. Q. et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n. 2, mar.-abr, 2014.

QUINONES, M. et al. Preformed membrane associated stores of interleukin (IL)-12 are a previously unrecognized source of bioactive IL-12 that is mobilized within minutes of contact with an intracellular parasite. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 4, p. 507-516, 2000

RADWANSKA, M. et al. Trypanosomiasis-induced B cell apoptosis results in loss of protective anti-parasite antibody responses and abolishment of vaccine-induced memory responses. **PLoS Pathog.**, v. 30, n. 4, p. 5, may. 2008.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol Res.**, v. 31, n. 1, p. 143-148, 1998.

RIBEIRO-GOMES, F.L. et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, 2004.

RITTER, U. et al. The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes Infect.**, v. 6, n. 6, p. 559-565, 2004

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitol.**, v. 25, n. 11, p. 505–510, nov. 2009.

RITTER, U; OSTERLOH, A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. **Microb. Immunol.**, v.,196, n.,1, p. 51-59, mar. 2007.

ROGERS M. E. The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. **Front Microbiol.**, v. 3, n. 23, p. 40, 2012.

ROMANI, L. S. et al. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. **Infect. Immun.**, v. 59, 4647, 1991.

ROMANO, A. et al. Cutaneous Infection with *Leishmania major* Mediates Heterologous Protection against Visceral Infection with *Leishmania infantum*. **J. Immunol.**, v. 15, n. 195, p. 3816-3827. Oct. 2015.

RONET, C. et al. *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice. **J. Immunol.**, v. 80, n. 7, p. 4825-4835, 2008.

RONET, C. et al. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. **P. J. Immunol.**, v. 184, n. 2, p. 886-894, 2010

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 11, p. 845-858, nov. 2002.

SANTOS, C. S. et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN $\gamma$ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **Invest. Dermatol.**, v. 133, n. 6, p. 1533-1540, jun. 2013.

SARAIVA, B. E. M. Chandes in lipophospholycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in the *Phebotomus papatasi*. **Parasitology**, v. 111, p. 275-287, 1995.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **Lancet Infect. Dis.**, v. 6, n. 6, p. 342-349, jun. 2006.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **J. Vector Borne Dis.**, v. 45, n. 4, p. 255-272, dec. 2008.

SHI, M. et al. Experimental African Trypanosomiasis: A Subset of Pathogenic, IFN- $\gamma$ -Producing, MHC Class II-Restricted CD4 T Cells Mediates Early Mortality in Highly Susceptible Mice1. **J. Immunol.**, v. 76, p. 1724-1732, 2006.

SILVA, R. S. et al. ; An atypical *Toxoplasma gondii* genotype in a rural Brazilian dog co-infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis* **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 48 n. 2, mar.-apr. 2015.

STEBUT, V. E. et al. 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.**, v. 19, n. 188, p. 1547-1552, oct. 1998.

SUTHERLAND, C. S. et al. A Literature Review of Economic Evaluations for a Neglected Tropical Disease: Human African Trypanosomiasis (“Sleeping Sickness”). **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 9, p. 2, feb. 2015.

TAVARES, N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection *in vitro*: the role of LTB4 derived from human neutrophils. **J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 210, p. 656-666, aug. 2014.

TEIXEIRA, C. et al. Characterization of the early inflammatory infiltrate at the feeding site of infected sand flies in mice protected from vector-transmitted *Leishmania major* by exposure to uninfected bites. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 24, n. 8, p. 2781, apr. 2014.

UZONNA, J. E.; JOYCE, K. L.; SCOTT, P. J. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. **Exp. Med.**, v. 7, n. 199, p. 1559-1566, jun. 2004.

WÅLLBERG, M.; HARRIS, R. A. Co-infection with *Trypanosoma brucei brucei* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in DBA/1 mice through induction of suppressor APCs. **Int. Immunol.**, v. 17, n. 6, p. 721-728, jun. 2005.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunol. Res.**, v. 41, n.1, p. 15-25, 2008.

WANG, Z. E. et al. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1367–1371, 1994.

WHO FACT SHEET. **The World Health Report.** n. 259, 2015.

YAMAMURA, M. K. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, p. 277, 1991.

ZANDBERGEN, G. V. et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **J. Immunol.**, 2004.

ZAPH, C. et al. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nat. Med.**, v. 10, n. 10, p. 1104-1110, oct. 2004.