

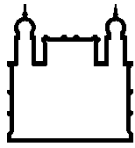
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E CURSO CLÍNICO NA
COINFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
Plasmodium berghei ANKA E *Leishmania major*

UYLA ORNELLAS GARCIA

Rio de Janeiro
Setembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

UYLA ORNELLAS GARCIA

Avaliação da resposta imune e curso clínico na coinfeção experimental por *Plasmodium berghei* ANKA e *Leishmania major*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof^a. Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes
Prof^a. Dra. Patrícia Cuervo Escobar

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2019

Ornellas Garcia, Uyla.

Avaliação da resposta imune e curso clínico na coinfeção experimental por *Plasmodium berghei* ANKA e *Leishmania major* / Uyla Ornellas Garcia. - Rio de Janeiro, 2019.
134 f.; il.

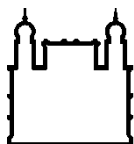
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Flávia Lima Ribeiro-Gomes.

Co-orientadora: Patricia Cuervo Escobar.

Bibliografia: f. 110-133

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

UYLA ORNELLAS GARCIA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E CURSO CLÍNICO NA COINFEÇÃO EXPERIMENTAL POR *Plasmodium berghei* ANKA E *Leishmania major*

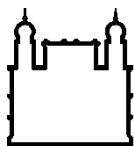
ORIENTADOR (ES): Prof^a. Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes
Prof^a. Dra. Patrícia Cuervo Escobar

Aprovada em: 02/ 09 / 2019

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Alda Maria da Cruz - **Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)
Prof^a. Dra. Fernanda Nazaré Morgado (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)
Prof^a. Dra. Mariana da Conceição de Souza (Farmanguinhos, FIOCRUZ)
Prof^a. Dra. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves (Instituto de Biofísica, UFRJ)
Prof. Dr. Eduardo Fonseca Pinto (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 02 de setembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais. É redundante dizer que sem eles eu não chegaria até aqui. Apesar dos 400 km de distância agradeço pelas horas de conversa ao telefone, pelas mensagens todos os dias e por acreditar no que eu escolhi pra mim. Em especial a minha mãe, que apesar de todas as dificuldades sempre acreditou mais em mim mais do que eu mesma.

À minha irmã, por me lembrar, todos os dias, que nunca devemos esquecer quem nós somos.

À minha orientadora, Dra. Flávia Lima Ribeiro-Gomes por há dois anos ter me recebido no laboratório e me aceitado como aluna. Agradeço a paciência no dia a dia e por ter me mostrado e ensinado que esse pode ser sim o melhor caminho, mas só depende da minha dedicação. Não é demais dizer que ela me ouviu quando precisei, me ajudou e me corrigiu sempre que necessário. Espero aprender e levar para vida todos os ensinamentos que tive nesses 2 anos e que terei nos próximos.

À minha coorientadora, Patrícia Cuervo Escobar, pela disponibilidade e paciência no mundo da Biologia Molecular.

À Nathalia, do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, por toda ajuda e paciência ao longo das inúmeras placas de qPCR.

Aos meus amigos da faculdade e de fora dela, por todos os encontros, jantares e horas de conversa sobre a vida na ciência e, por entenderem minha ausência nesses meses. À Juliana, Mariana, Alice, Guilherme, Ayke, Aló, Gabriel, Arthur, Octávio, Nathalie, Vicente e Luiza, obrigada por serem um pedacinho da minha família. Em especial a Juliana, pode ser a melhor amiga que a vida poderia ter me dado.

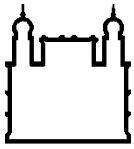
Aos meus amigos do laboratório, Hugo, Carolina, Bárbara, Guilherme e Rebecca, pelos dias, tardes e noites de apoio e carinho, dentro e fora do laboratório. Em especial ao Hugo, por ser uma das minhas melhores descobertas do mestrado.

Ao Immunoteam, Carina, Marcos e Lucas, obrigada por existirem. O mestrado não teria sido a mesma coisa sem vocês. Em especial, ao Lucas, por todos os dias dentro e fora do laboratório e por todos os sorvetes nesses últimos meses.

Aos demais alunos e pesquisadores do Laboratório de Pesquisa em Malária, obrigada pelo convívio diário.

As agências de fomento, FAPERJ e CNPq por todo o apoio financeiro.

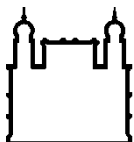
Aos membros da banca pela gentileza de aceitarem o convite.
E aos demais, por estarem comigo ao longo dessa trajetória.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

“A ciência se compõe de erros que, por
sua vez, são os passos até a verdade”.
Júlio Verne



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

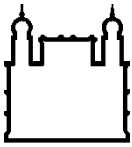
AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E CURSO CLÍNICO NA COINFEÇÃO EXPERIMENTAL POR *Plasmodium berghei* ANKA E *Leishmania major*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Uyla Ornellas Garcia

A coinfeção por diferentes parasitos é comumente observada na natureza e representa um complexo desafio para o entendimento do seu curso e consequências, em termos da resposta imune e desfecho clínico, no hospedeiro humano. A malária e leishmaniose são doenças negligenciadas, coendêmicas em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil. Atualmente, existem poucos estudos a respeito das coinfeções por *Plasmodium spp.* e *Leishmania spp.* no Brasil e no mundo, apesar da sua sobreposição geográfica. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os impactos que uma infecção pode ter sobre a resposta imune e a evolução clínica da outra. Para tal, dois desenhos experimentais foram desenvolvidos: (A) camundongos C57BL/6 foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e posteriormente coinfectados com *Leishmania major* e (B) camundongos C57BL/6 foram infectados primeiro com *L. major* e posteriormente coinfectados com *P. berghei* ANKA. Avaliamos o curso clínico de ambas as doenças por parâmetros como sobrevivência, peso, temperatura, parasitemia e o aparecimento de lesões (por *L. major*) na orelha dos animais. O perfil de recrutamento de células do sistema imune foi determinado por citometria de fluxo e a dosagem sistêmica de citocinas foi avaliada pelo Kit Cytometric Bead Array. Para o desenho experimental A observamos que a coinfeção com *L. major* não altera o curso clínico da infecção malárica. Embora tenhamos observado diferenças no percentual e total de células linfóides e/ou mielóides no baço entre os grupos. Ao avaliarmos a carga parasitária (por *L. major*) do linfonodo drenante da lesão dos animais coinfectados, observamos uma redução na mesma. Esta redução está relacionada à maior concentração de citocinas do perfil Th1 detectadas no soro dos animais coinfectados em relação aos animais infectados apenas com *L. major*. Assim, observamos que a progressão da infecção por *Leishmania* é diferente daquela vista durante a coinfeção e, portanto, a infecção com o *Plasmodium* poderia exercer uma influência no controle da proliferação do parasito *L. major*. Já no desenho experimental B, a coinfeção com o *P. berghei* ANKA apresenta um efeito benéfico no desenvolvimento da leishmaniose cutânea causada por *L. major*, diminuindo o tamanho da lesão causada por este parasito. Esta redução foi acompanhada por uma diminuição na carga parasitária das lesões e aumento no nível de citocinas séricas em animais coinfectados, os quais apresentaram um perfil mais pró-inflamatório (quando comparado à infecção somente com *L. major*), mediado por citocinas como IFN- γ e TNF- α . Foi verificada ainda uma redução no número total de células T (CD4⁺ e CD8⁺) e células mielóides no baço dos animais coinfectados quando comparado aos animais infectados apenas com *Plasmodium*, e que o recrutamento de linfócitos para a orelha diminuiu nos animais coinfectados em relação aos camundongos infectados apenas com *Leishmania*. Nossos dados sugerem que a coinfeção com *Plasmodium* ativa uma resposta imune que consegue controlar a proliferação de *L. major* em camundongos C57BL/6 resultando em uma menor carga parasitária e lesões menores nos animais coinfectados.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ****EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE AND CLINICAL COURSE DURING *Plasmodium berghei* ANKA and *Leishmania major* EXPERIMENTAL CO-INFECTION****ABSTRACT****MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY****Uyla Ornellas Garcia**

Co-infection with different parasites is commonly observed in nature and represents a complex challenge for understanding its course and consequences, in terms of immune response and clinical outcome, in the human host. Malaria and leishmaniasis are neglected diseases, co-endemic in various regions of the world, including Brazil. There are currently few studies on *Plasmodium spp.* and *Leishmania spp.* in Brazil and worldwide, despite their geographical overlap. In this context, the objective of this study was to evaluate the impacts that one infection may have on the immune response and the clinical evolution of the other. For this purpose, two experimental designs were developed: (a) C57BL/6 mice were infected with *Plasmodium berghei* ANKA and subsequently co-infected with *Leishmania major* and (b) C57BL/6 mice were first infected with *L. major* and subsequently co-infected with *P. berghei* ANKA. We evaluated the clinical course of both diseases by parameters such as survival, weight, temperature, parasitemia and the appearance of lesions (by *L. major*) in the ear of the animals. The recruitment profile of immune system cells was determined by flow cytometry and the systemic cytokine dosage was evaluated by the Cytometric Bead Array Kit. For experimental design A, we observed that coinfection with *L. major* does not alter the clinical course of malarial infection. Although we observed differences in the percentage and total of lymphoid and/or myeloid cells in the spleen between the groups. When we evaluated the parasitic load (by *L. major*) of the draining lymph node of the lesion of the co-infected animals, we observed a reduction in it. This reduction is related to the higher concentration of Th1 profile cytokines detected in the serum of co-infected animals compared to animals infected with *L. major* only. Thus, we observed that the progression of *Leishmania* infection is different from that seen during coinfection and therefore *Plasmodium* infection could exert an influence on the control of *L. major* parasite proliferation. In experimental design B, *P. berghei* ANKA coinfection has a beneficial effect on the development of cutaneous leishmaniasis caused by *L. major*, reducing the size of the lesion caused by this parasite. This reduction was accompanied by a decrease in the parasite burden of the lesions and an increase in serum cytokine levels in co-infected animals, which had a more pro-inflammatory profile (when compared to infection with *L. major* only), mediated by cytokines such as IFN- γ and TNF- α . There was also a reduction in the total number of T cells (CD4⁺ and CD8⁺) and myeloid in the spleen of co-infected animals compared to *Plasmodium*-infected animals, and that ear lymphocyte recruitment decreased in co-infected animals compared to mice infected with *Leishmania* only. Our data suggest that *Plasmodium* coinfection activates an immune response that can control *L. major* proliferation in C57BL/6 mice resulting in lower parasitic burden and minor lesions in co-infected animals.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Malária	20
1.1.1 Epidemiologia	20
1.1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp	22
1.1.3 Malária cerebral	25
1.1.4 Resposta imune.....	27
1.1.5 Modelos experimentais de malária	32
1.2 Leishmanioses	35
1.2.1 Epidemiologia	35
1.2.2 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	37
1.2.3 Leishmaniose cutânea	39
1.2.4 Resposta imune.....	42
1.2.5 Modelos experimentais na leishmaniose cutânea	46
1.3 Coinfecção	48
2 OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo geral	52
2.2 Objetivos específicos	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Animais	53
3.2 Parasitos	53
3.3 Infecção experimental	53
3.3.1 <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	53
3.3.2 <i>Leishmania major</i>	54
3.4 Desenho experimental	54
3.4.1 Desenho experimental A.....	54
3.4.2 Desenho experimental B.....	55
3.5 Avaliação do curso da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA-GFP	56

3.6	Determinação e mensuração da lesão após infecção por <i>L. major</i> -RFP	57
3.7	Dosagem e avaliação dos níveis de citocinas séricas.....	57
3.8	Processamento do tecido do baço, orelha e linfonodo auricular drenante.	58
3.8.1	Processamento do baço (obtenção de esplenócitos).	58
3.8.2	Processamento da orelha.....	58
3.8.3	Processamento do linfonodo auricular drenante.....	59
3.9	Avaliação da carga parasitária na orelha e linfonodo auricular drenante	59
3.10	Imunofenotipagem das subpopulações de células mieloides e linfoides no baço, orelha e linfonodo drenante	61
3.11	Análise da expressão gênica de citocinas no linfonodo auricular drenante e orelha.....	61
3.12	Análise estatística	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	Resultados do desenho experimental A: Impacto da coinfeção com <i>L. major</i> em animais previamente parasitados por <i>P. berghei</i> ANKA	66
4.1	Discussão dos resultados do desenho experimental A	77
4.2	Resultados do desenho experimental B: Impacto da coinfeção com <i>P. berghei</i> ANKA em animais previamente parasitados com <i>L. major</i>	79
4.3	Discussão dos resultados do desenho experimental B	100
5	DISCUSSÃO FINAL	105
6	CONCLUSÕES	108
6.1	Desenho experimental A.....	108
6.2	Desenho experimental B.....	109
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
8	ANEXOS	134
8.1	Licença do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA).....	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Países com casos autóctones em 2000 e seu <i>status</i> de endemicidade em 2017.	20
Figura 2. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.....	23
Figura 3. Representação do sequestro de eritrócitos infectados pelo <i>Plasmodium falciparum</i> na microvasculatura.....	26
Figura 4. <i>Status</i> de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2015.....	36
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp	38
Figura 6. Desenho experimental A. Camundongos infectados com <i>P. berghei</i> ANKA e posteriormente coinfetados com <i>L. major</i>	55
Figura 7. Desenho experimental B. Camundongos infectados com <i>L. major</i> e posteriormente coinfetados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	56
Figura 8. Mensuração do tamanho da lesão da orelha de camundongos infectados por <i>Leishmania major</i> , com auxílio de um paquímetro digital.....	57
Figura 9. Análise da sobrevivência de animais coinfetados com <i>P. berghei</i> ANKA e <i>L. major</i>	67
Figura 10. Efeito da infecção com <i>L. major</i> em animais previamente parasitados com <i>P. berghei</i> ANKA.	68
Figura 11. Percentual e número total das subpopulações linfóides presentes no baço dos animais mono e coinfetados com <i>P. berghei</i> ANKA e <i>L. major</i>	71
Figura 12. Percentual e número total das subpopulações mielóides presentes no baço dos animais mono e coinfetados com <i>P. berghei</i> ANKA e <i>L. major</i>	72
Figura 13. Análise da carga parasitária nos animais inoculados com <i>L. major</i> durante o curso da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA.....	73
Figura 14. Percentual e número total das subpopulações de células mielóides presentes na orelha dos animais mono e coinfetados com <i>P. berghei</i> ANKA e <i>L. major</i>	75
Figura 15. Dosagem de citocinas séricas em animais monoinfectados e coinfetados com <i>Plasmodium</i> spp e <i>Leishmania</i> spp	76
Figura 16. Análise da sobrevivência de animais coinfetados com <i>L. major</i> e <i>P. berghei</i> ANKA.. ..	80

Figura 17. Efeito da coinfeccção com <i>P. berghei</i> ANKA em animais previamente parasitados com <i>L. major</i>	81
Figura 18. Percentual e número total das subpopulações de células linfoides presentes no baço dos animais mono e coinfectados com <i>L. major</i> e <i>P. berghei</i> ANKA.	83
Figura 19. Percentual e número total das subpopulações de células mieloides presentes no baço dos animais mono e coinfectados com <i>L. major</i> e <i>P. berghei</i> ANKA.	84
Figura 20. Efeito da infecção com <i>P. berghei</i> ANKA no desenvolvimento da lesão cutânea em animais previamente infectados com <i>L. major</i>	86
Figura 21. Efeito da coinfeccção com <i>P. berghei</i> ANKA no desenvolvimento da lesão cutânea em animais previamente infectados com <i>L. major</i>	87
Figura 22. Análise da carga parasitária nos animais inoculados com <i>P. berghei</i> ANKA durante o curso da infecção por <i>L. major</i>	88
Figura 23. Percentual e número total das subpopulações linfoides presentes na orelha dos animais mono e coinfectados com <i>L. major</i> e <i>P. berghei</i> ANKA.....	89
Figura 24. Percentual e número total das subpopulações celulares presentes na orelha dos animais mono e coinfectados com <i>L. major</i> e <i>P. berghei</i> ANKA.....	91
Figura 25. Percentual e número total das subpopulações linfoides presentes no linfonodo auricular drenante dos animais mono e coinfectados com <i>L. major</i> e <i>P. berghei</i> ANKA.....	93
Figura 26. Percentual e número total de células CD11b ⁺ presentes no linfonodo auricular drenante dos animais mono e coinfectados com <i>L. major</i> e <i>P. berghei</i> ANKA.	94
Figura 27. Dosagem de níveis de citocinas no soro de animais monoinfectados e coinfectados com <i>Plasmodium</i> spp e <i>Leishmania</i> spp.....	96
Figura 28. Expressão gênica de citocinas na orelha.	98
Figura 29. Expressão gênica de citocinas no linfonodo auricular drenante (dLN).	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos experimentais murino de infecção por <i>Plasmodium</i> spp.....	34
Tabela 2. Principais formas clínicas de leishmaniose tegumentar e as espécies causadoras da doença.	40
Tabela 3. Infecção experimental com <i>Leishmania</i> spp. em diferentes linhagens de camundongos.....	47
Tabela 4. Método de diluição limitante (número de poços positivos vs número de parasitos por ml).....	60
Tabela 5. Anticorpos utilizados para fenotipagem das células dos diferentes tecidos	61
Tabela 6. Genes analisados, função do gene e sequências de primers.	62
Tabela 7. Reação da Síntese de cDNA.....	63
Tabela 8. Mistura de reação para qPCR	64
Tabela 9. Perfil térmico da reação de qPCR	64
Tabela 10. Perfil térmico da curva de melting	64
Tabela 11. Genes normalizadores e de interesse selecionados para orelha e linfonodo auricular drenante (dLN).	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CTL	do inglês <i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
GAPDH	do inglês <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	do inglês <i>Green fluorescent protein</i>
HIV	do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>
I.D	Intradérmica
I.P	Intraperitoneal
IFN- γ	do inglês <i>Interferon gamma</i>
IL	Interleucina
iNOS	do inglês <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
I.P	Intraperitoneal
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
<i>Lm</i>	<i>Leishmania major</i>
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
mAb	do inglês <i>Monoclonal antibodies</i>
MCE	Malária cerebral experimental
MHC	do inglês <i>Major histocompatibility complex</i>
MS	Ministério da Saúde
MSP	do inglês <i>Major surface protease</i>
NO	do inglês <i>Nitric oxide</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>PbA</i>	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PBS	do inglês <i>Phosphate buffer saline</i>
PfEMP1	do inglês <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
PS	do inglês <i>Phosphatidylserine</i>
qPCR	do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
RFP	do inglês <i>Red fluorescent protein</i>

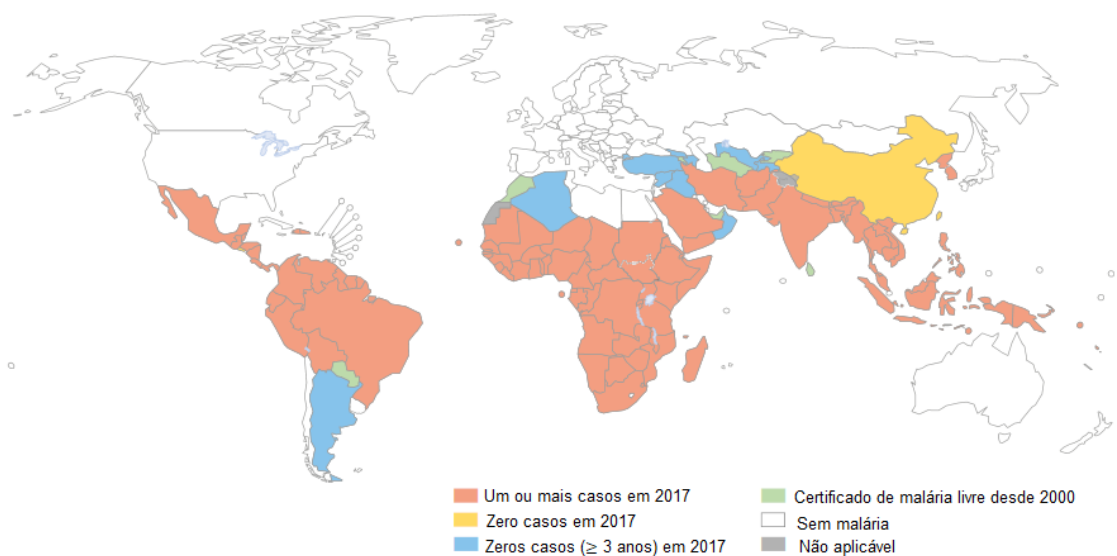
SIVEP	Sistema de informação de vigilância epidemiológica
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
SFB	Soro Fetal Bovino
TNF- α	do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TGF- β	do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
μ L	Microlitro

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

1.1.1 *Epidemiologia*

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e um grave problema de saúde pública. Segundo o *World Malaria Report* (2018), foram notificados 219 milhões de casos em 91 países e 435 mil mortes em 2017, concentradas principalmente em 17 países da África como Nigéria e República Democrática do Congo, e na Índia (OMS, 2018) (Figura 1). Países como Quirguistão e Sri Lanka foram certificados como livres de malária no ano de 2016 (OMS, 2018). Nas Américas, a transmissão da malária ocorre em pelo menos 21 países e foram totalizadas 630 mortes no ano de 2017 (OMS, 2018).



WHO: World Health Organization, 2018.

Figura 1. Países com casos autóctones de malária em 2000 e seu *status* de endemidade em 2017. Mapa representativo das áreas endêmicas para malária. Na legenda em vermelho, áreas com um ou mais casos autóctones notificados em 2017; em amarelo, áreas com zero casos em 2017; em azul, áreas com zero casos há mais de 3 anos em 2017; em verde; áreas certificadas sem malária desde 2000; em branco, áreas sem malária e em cinza, áreas sem dados fornecidos. Todos os países da Região Européia relataram zero casos autóctones em 2016 e novamente em 2017. Em 2017, a China e El Salvador registraram zero casos autóctones. Fonte: OMS, 2018.

O Brasil é responsável por mais de 50% do total de casos de malária nas Américas (OMS, 2018). De acordo com dados do Sivep-Malária e SINAN foram notificados no Brasil, em 2018, 194.271 casos de malária. Destes, 193.534 casos foram notificados na região da Amazônia Legal Brasileira que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Quando comparados os casos notificados no mesmo período (janeiro a fevereiro) de 2017 e 2018, observou-se um aumento de 56% ocorrência de malária autóctone nas regiões endêmicas. Fora da região da Amazônia Legal, o número de casos autóctones reportados vem aumentando nas regiões Sul e Sudeste, onde a malária humana havia sido erradicada há mais de 50 anos (BRASIL *et al.*, 2017). Os últimos surtos fora da Amazônia Legal ocorreram nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso e Paraná, onde condições como presença do vetor, população susceptível e condições ecológicas e geográficas, favoreceram o surgimento dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A malária humana é causada por 6 espécies de *Plasmodium*, sendo eles: *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. simium* (SUTHERLAND *et al.*, 2010, AHMED & COX-SINGH., 2015; WHO, 2019). Este foi recentemente descrito como uma espécie de transmissão zoonótica, encontrada na Mata Atlântica do Rio de Janeiro (BRASIL *et al.*, 2017). As diversas espécies de *Plasmodium* apresentam diferenças em relação a sua distribuição geográfica, gravidade patológica e biologia. O *P. falciparum* é a espécie predominante no continente Africano, e encontrado também em outras regiões tropicais e subtropicais. É considerada a espécie de maior impacto na saúde pública devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, além da resistência a fármacos (GARCIA, 2010). Já o *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo. Encontrada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, é a principal causa de malária fora da África, afetando regiões da Ásia e das Américas (GARCIA, 2010; CARLTON *et al.*, 2011). Juntos, o *P. falciparum* e o *P. vivax*, suscitam mais de 90% de todas as infecções maláricas.

A transmissão da malária é feita por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. No mundo, o principal vetor é o *Anopheles gambiae*, espécie encontrada na África e que já existiu no Nordeste brasileiro de onde foi erradicada no início da década de 1940 (KILLEEN *et al.*, 2002). No Brasil, a espécie de maior importância é

o *Anopheles darlingi*, distribuída em grande parte do território nacional e muito suscetível à infecção por diferentes espécies de *Plasmodium*. Outra espécie relevante é o *Anopheles aquasalis*, encontrado em áreas litorâneas devido a sua preferência por água salobra, além de áreas de solo rico em cloreto de sódio, como no interior do Nordeste (DEANE, 1948; ZIMMERMAN, 1992; SINKA *et al.*, 2010).

1.1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium* spp

O *Plasmodium* apresenta diferentes formas evolutivas durante o seu ciclo biológico no hospedeiro invertebrado e vertebrado, o que justifica a complexidade do seu ciclo. Apesar da variedade de espécies de *Plasmodium*, seus ciclos biológicos mantêm pontos em comum.

No hospedeiro vertebrado, o ciclo (Figura 2) se inicia no momento do repasto sanguíneo. Mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* inoculam na derme, juntamente com a saliva, os esporozoítos, a forma infectante do *Plasmodium*. Estes evadem do local, penetrando ativamente os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos (AMINO *et al.*, 2006).

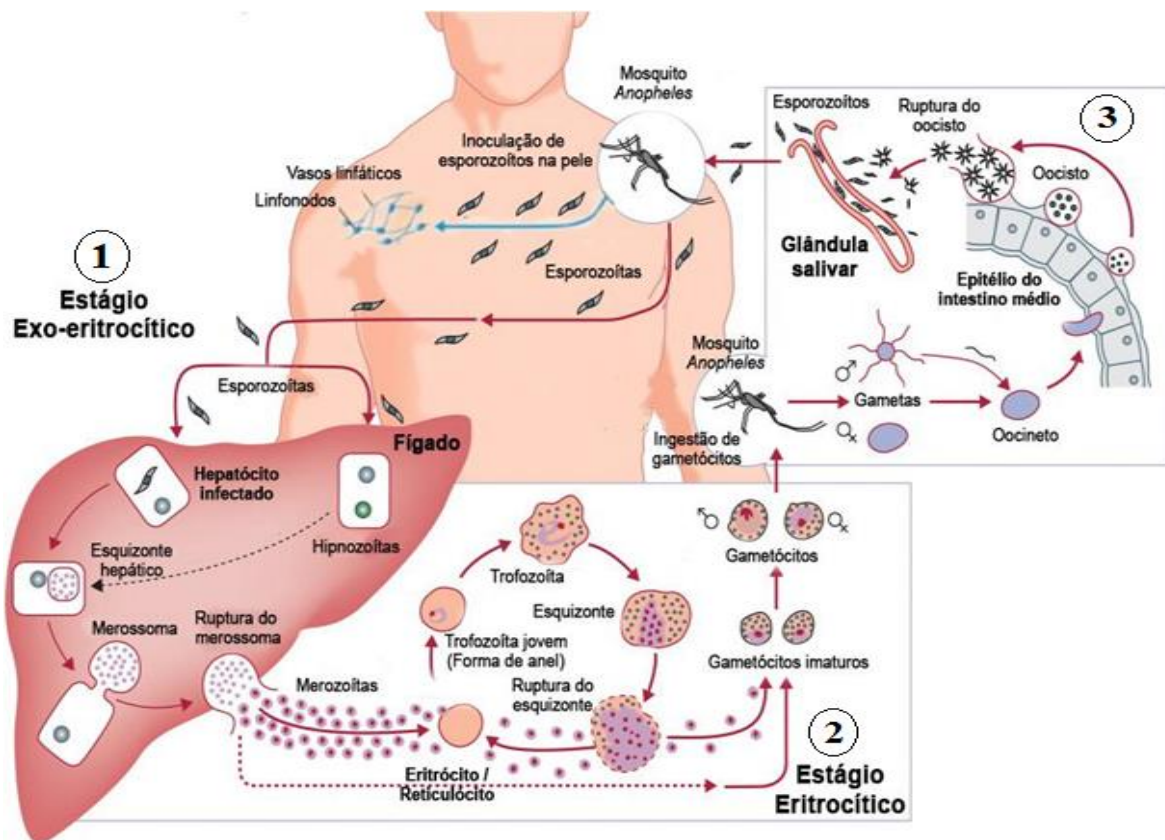


Figura 2. Ciclo biológico do *Plasmodium* spp. 1) Estágio exo-eritrocítico, iniciado com a inoculação de esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado e infecção dos hepatócitos (fase assintomática da doença). 2) Estágio eritrocítico, com a ruptura dos merossomos e liberação de formas merozoítas na corrente sanguínea, ocorre a invasão dos eritrócitos/reticulócitos (fase sintomática da doença). 3) Ciclo no hospedeiro invertebrado, com a ingestão de gametócitos após o vetor realizar seu repasto sanguíneo em um indivíduo infectado. Fonte: Adaptado de García-Basteiro *et al.*, 2012.

Os esporozoítos que chegam aos vasos sanguíneos migram para o fígado, aderem-se às células endoteliais dos sinusóides hepáticos e iniciam o “gliding”, movimento em forma de deslizamento. Desta forma eles atravessam a barreira sinusal e uma vez no parênquima hepático, migram de forma ativa através de diversos hepatócitos (ISHINO *et al.*, 2004; MEYER *et al.*, 2008). Após atravessarem algumas destas células, os esporozoítos aderem-se em determinados hepatócitos e iniciam a formação do vacúolo parasitóforo. Neste, entram em processo de diferenciação e multiplicação por reprodução assexuada (esquizogonia exo-eritrocítica), onde o esporozoíto se transforma de uma forma ativa a uma forma replicativa, o trofozoíto exo-eritrocítico (ISHINO *et al.*, 2004). Como resultado desta fase há o desenvolvimento de esquizontes hepáticos, repletos de merozoítos no seu interior. Segundo Sturm e cols., (2006), os hepatócitos parasitados entram em

processo de morte celular e destes originam vesículas cheias de merozoítos, denominadas merossomos.

Quando atingem a corrente sanguínea, os merossomos liberam merozoítos que invadem os eritrócitos rapidamente e iniciam a fase eritrocítica e sintomática da doença (MOTA *et al.*, 2001; STURM *et al.*, 2006). A entrada dos merozoítos em eritrócitos é feita de forma ativa envolvendo uma série de interações específicas em diferentes etapas, como: reconhecimento e adesão do merozoíto à membrana do eritrócito; a reorientação apical do merozoíto em direção à membrana do eritrócito; a formação de uma junção entre o cone apical do parasito e a membrana celular do eritrócito; e por último, ocorre a invaginação da membrana do eritrócito com o movimento ao redor do merozoíto, quando o parasito se encontraria dentro da célula e envolto pelo vacúolo parasitóforo (MARKUS, 2011). No vacúolo, os merozoítos se diferenciam em trofozoítas, que por sua vez, multiplicam-se (esquizogonia eritrocítica) dando origem aos esquizontes sanguíneos, repletos de merozoítos. Essas formas são liberadas após ruptura do eritrócito e invadem novas células, repetindo o ciclo eritrocítico por diversas vezes.

Durante o ciclo eritrocítico, alguns merozoítos sanguíneos diferenciam-se em formas sexuadas, gametócitos masculinos ou femininos. Estes gametócitos, ao serem ingeridos pelo vetor, dão continuidade ao ciclo sexuado do parasito (esporogônico) no hospedeiro invertebrado. No interior do estômago do inseto, são formados os gametas feminino e masculino, que ao se fundirem originam uma forma móvel denominada oocineto. Após atravessar o epitélio intestinal do mosquito, o oocineto aloja-se na membrana basal e desenvolve-se em oocisto (KROTOZKI, 1985). No interior do oocisto ocorre a diferenciação e divisão nuclear do parasito que resulta na formação de milhares de esporozoítos. O ciclo esporogônico dura de 10 a 12 dias e depende da espécie do *Plasmodium* e da temperatura externa, já que a temperatura ótima para o desenvolvimento do parasito está entre 22-30°C (22°C para *P. malariae*, 25°C para *P. vivax* e 30°C para *P. falciparum*). No caso de temperaturas abaixo dos 15°C ou acima dos 38°C, a transmissão fica comprometida (ABRANTES & SILVEIRA, 2009). Os esporozoítos liberados na hemolinfa migram para as glândulas salivares do mosquito que, ao realizar novo repasto sanguíneo, inocula essas formas no hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo.

A ruptura dos esquizontes eritrocitários está associada aos episódios febris, entre outros sintomas, como calafrios, sudorese, cefaleia e dores musculares. Essa sintomatologia é observada na maioria dos pacientes, mas em alguns casos, pode evoluir para manifestações graves como a malária pulmonar, anemia grave e a malária cerebral, seguido ou não de óbito (LACERDA-QUEIROZ *et al.*, 2008; ASHLEY *et al.*, 2018).

1.1.3 Malária cerebral

A malária cerebral (MC) é uma complicação da doença causada principalmente pelo *P. falciparum*. Pode se desenvolver rapidamente após episódios iniciais de febre com duração de 2 a 3 dias. É considerada uma encefalopatia difusa, onde o paciente apresenta sonolência e confusão mental, podendo cursar ou não com crises convulsivas generalizadas ou focais. Esses sintomas podem progredir rapidamente, levando a um aumento da pressão intracraniana, hemiparesia, ataxia e podendo evoluir para coma que pode durar algumas horas ou até mesmo dias (de SOUZA *et al.*, 2009; Gomes, 2011; DVORIN, 2017). Além desses sinais, sintomas como mal-estar, dor de cabeça, vômitos e diarreia estão associados. Essa síndrome ocorre em 1% dos indivíduos infectados e apresenta taxas de mortalidade de 6,1% em crianças e 35,6% em adultos (BERNABEU; SMITH, 2017; DONDORP *et al.*, 2008).

A fisiopatologia da MC ainda é pouco conhecida. Existem duas grandes teorias para explicar a patogênese da MC humana. A teoria da obstrução mecânica sugere que a MC é uma consequência direta do sequestro dos eritrócitos, em sua maioria parasitados, leucócitos e plaquetas na microvasculatura do cérebro, que acarreta na obstrução do fluxo sanguíneo e hipóxia cerebral (WASSMER & GRAU, 2017).

Na malária cerebral experimental, a adesão de leucócitos à vasculatura cerebral é frequentemente observada. Imagens *in vivo*, utilizando microscopia intravital, de animais C57BL/6 infectados com *P.berghei* ANKA demonstraram o acúmulo de agregados de leucócitos e plaquetas em vênulas cerebrais pós-capilares associados com disfunção do endotélio, extravasamento vascular, sinais neurológicos e coma (SAPARNA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015).

Na malária cerebral humana, o sequestro de eritrócitos parasitados no endotélio (Figura 3) ocorre pela interação de antígenos do parasito localizados na superfície de hemácias parasitadas, PfEMP1 (*P. falciparum* encoded erythrocyte membrane protein 1) e receptores como ICAM-1, CD36, E-selectina e VCAM-1, presentes na superfície de células endoteliais (PAIN *et al.*, 2001; WASSMER & GRAU, 2017). Uma dessas moléculas de adesão, a ICAM-1, apresenta ainda um papel controverso na interação leucócito/endotélio na promoção da disfunção cerebral durante a malária grave experimental (SOUZA *et al.*, 2015).

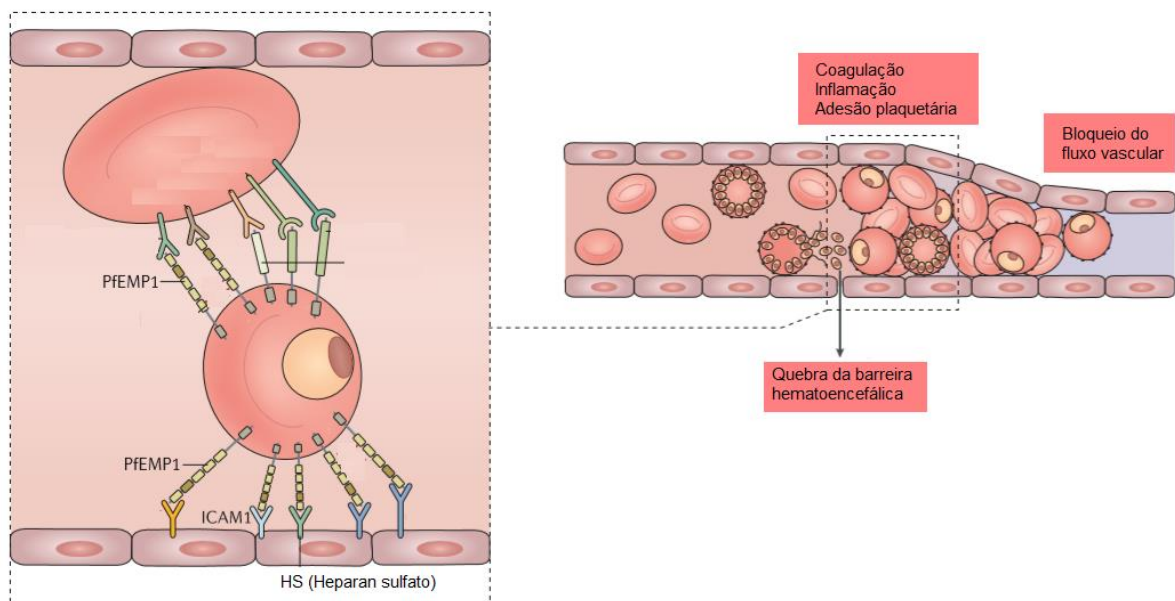


Figura 3 Representação do sequestro de eritrócitos infectados pelo *Plasmodium falciparum* na microvasculatura. Ligação de eritrócitos infectados aos receptores como ICAM-1, CD36 e HS expressos pelas células endoteliais da microvasculatura cerebral. Os eritrócitos infectados e não infectados também interagem formando rosetas. Esse processo de agregação celular contribui para a inflamação, adesão de plaquetas e interrompe o fluxo sanguíneo no cérebro. Fonte: Adaptado de WAHLGREN *et al.*, 2017.

Segundo Ramos e *cols.*, (2013) ao estudar camundongos deficientes em diferentes isoformas de ICAM-1 (expressa em diferentes células) foi possível mostrar que essa molécula expressa apenas nos leucócitos é suficiente para o desenvolvimento da malária cerebral experimental (RAMOS *et al.*, 2013). Estes resultados mostraram que a expressão de uma única isoforma de ICAM-1, é suficiente para impulsionar o desenvolvimento de malária cerebral experimental (MCE), independente da expressão no endotélio (RAMOS *et al.*, 2013).

Já a teoria da inflamação sugere que a MC é o resultado de uma resposta imune exacerbada, na qual citocinas do tipo 1, especialmente TNF e IFN- γ , apresentam papel central no processo (CLARK & ROCKETT, 1994; MEDANA *et al.*, 1997).

Atualmente acredita-se que a patologia resulta da junção das duas teorias, onde a citoaderência é ampliada pela resposta imune patogênica. A produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias desencadeia uma cascata inflamatória que aumenta a expressão das moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e CD36 no endotélio vascular. A expressão elevada dessas moléculas favorece a formação de aglomerados de plaquetas e rosetas. O fenômeno das rosetas ocorre pela adesão entre si de eritrócitos infectados e não infectados ao endotélio.

Como consequência ocorre a ativação endotelial excessiva, com secreção local de mediadores pró-inflamatórios (WASSMER *et al.*, 2006) e a liberação desequilibrada de mediadores vasoativos, incluindo endotelina-1 e angiopoietina-2 (DIETMANN *et al.*, 2008)

Por fim, a barreira das células endoteliais do cérebro fica prejudicada resultando no vazamento do conteúdo vascular para o parênquima cerebral (WENISCH *et al.*, 1996)

1.1.4 Resposta imune

A resposta imune ao *Plasmodium* é complexa e específica para cada estágio do ciclo de vida do parasito. No estágio exo-eritrocítico a resposta imune é direcionada aos esporozoítos livres desde a sua inoculação na derme do hospedeiro vertebrado até a fase intra-hepática.

A primeira linha de defesa do hospedeiro ao parasito é a derme, na qual se encontram e/ou são recrutadas células do sistema imune inato como os macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e monócitos (RADTKE *et al.*, 2015). Estudos envolvendo os modelos murinos de infecção com *P. berghei* e *P. yoelli* mostram que os esporozoítos inoculados na pele se deslocam ativamente, movendo-se por entre as células do hospedeiro por um mecanismo conhecido com *gliding*, mas também são capazes de romper as membranas e atravessar as células do hospedeiro. A

capacidade de transmigração é essencial para que os esporozoítos escapem dos fagócitos e deixem a derme. Foi observado que além de atingirem a corrente sanguínea em direção ao fígado, uma proporção significativa dos parasitos permanece na pele, enquanto outros são drenados pelos vasos linfáticos e atingem os linfonodos drenantes (PRUDÊNCIO *et al.*, 2006; YAMAUCHI *et al.*, 2007). A maioria dos parasitos que permanecem na derme é destruída pelas células do sistema imune. No entanto, algumas formas infectantes permanecem latentes nos folículos pilosos na derme (MEYER *et al.*, 2008; GUEIRARD *et al.*, 2010). Os parasitos presentes nestes folículos podem funcionar como um reservatório e fonte de antígenos para os linfonodos drenantes (AMINO *et al.*, 2007).

No linfonodo drenante, os parasitos são capturados e degradados por células dendríticas CD8 α , que os processam e apresentam seus antígenos, via MHC I para os linfócitos T CD8 (RADTKE *et al.*, 2015). Camundongos *Batf3*^{-/-} apresentam número reduzido de DCs CD8 α e, conseqüentemente, redução em 50% da expansão de células T CD8 específicas aos antígenos do esporozoítos (RADTKE *et al.*, 2015).

Os parasitos que alcançam a corrente sanguínea migram até o fígado e atravessam a barreira sinusoidal do fígado (TAVARES *et al.*, 2013), formada por células endoteliais sinusoidais e células de Kupffer (KCs). No parênquima hepático, os esporozoítos atravessam vários hepatócitos e deixam um rastro de antígenos, como a proteína circunsporozoíta (CSP), nas células que transmigram. A proteína CSP suporta o desenvolvimento do parasito por suprimir a via NF-kB de sinalização. (DING *et al.*, 2012). Também foi observado que esta migração do esporozoítos pelas células do hospedeiro é um passo essencial para a infecção final do hepatócito por induzir a secreção do fator de crescimento de hepatócitos (HGF), tornando os hepatócitos mais suscetíveis à infecção (CARROLO *et al.*, 2003).

Ao mesmo tempo, foi demonstrado que a transmigração do parasito pelos hepatócitos, *in vitro*, e a liberação de material citosólico destas células têm efeitos deletérios para a infecção, por ativar a via MyD88 e NF-kB, induzindo maior expressão da enzima iNOS e produção de NO, molécula detrimental para o desenvolvimento do esquizonte. Interessantemente, a ativação de NF-kB não é observada nas células atravessadas, mas apenas nas células vizinhas (TORGLER *et al.*, 2008).

Nossa compreensão atual da resposta imune adaptativa ao estágio pré-eritrocítico da malária é, em sua maioria, baseada em estudos utilizando roedores e humanos que receberam múltiplas injeções com esporozoítos atenuados, tornando-se resistentes à infecção quando desafiados com o esporozoíta selvagem. Liehl e cols., (2014) observaram que o RNA de *Plasmodium* pode ativar o receptor de reconhecimento de padrão (PRR) citoplasmático, MDA5, induzindo a produção e liberação de IFNs I. Os IFNs I, por sua vez, induzem a produção de quimiocinas e o recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção. Camundongos deficientes no receptor de IFN I (IFNR do tipo I) apresentam redução no percentual de células infiltrando o tecido e no controle do parasito (LIEHL, 2014). IFNs I são citocinas conhecidas por inibirem o crescimento das formas exo-eritrocíticas do parasito (HISAEDA *et al.*, 2005).

Entre os leucócitos recrutados estão as células T CD8, NK, NKT e T $\gamma\delta$, que medeiam esta ação anti-parasito ao secretarem IFNs I e IFN γ (OCAÑA-MORGNER *et al.*, 2003).

Inicialmente, foi proposto que a proteção contra a fase pré-eritrocítica seria mediada diretamente pelas células T CD8 citotóxicas (CTLs) através da liberação de perforinas e granzimas. As CTLs provocariam a apoptose dos hepatócitos infectados e eliminação dos parasitos intracelulares (MELLOUK; HOFFMAN, 1994). Contudo, foi demonstrado que as células T CD8 presentes no fígado produzem IFN- γ em resposta aos antígenos do parasito apresentados pelos hepatócitos infectados. O IFN- γ induz a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativadas que, por sua vez, leva à produção de IFN- γ adicional pelas células NK, em um feedback positivo que representa um importante mecanismo de amplificação de resposta (DOOLAN & HOFFMAN., 1999; ARTAVANIS-TSAKONAS & RILEY., 2002).

As células T CD4 específicas ao parasito também são importantes no desenvolvimento da resposta adquirida ao auxiliarem na diferenciação das células T CD8 e na resposta de anticorpos.

Apesar da resposta imune induzida durante o estágio pré-eritrocítico, milhares de merozoítos são gerados nos hepatócitos. Os merozoítos, no entanto, não são liberados diretamente nos sinusóides hepáticos, onde estariam expostos a fagocitose pelas células de Kupffer. Os parasitos alcançam a corrente sanguínea através dos merossomos, vesículas derivadas da membrana do hepatócito e que

não expressam fosfatidilserina (PS). Os merozoítos intra-hepáticos captam o Ca^{2+} intracelular, mantendo seus níveis baixos na célula hospedeira, e assim inibem a exposição de PS na camada externa da membrana plasmática dos hepatócitos apoptóticos e merossomos. A distribuição assimétrica de resíduos de PS é uma marca registrada de células viáveis, e o reconhecimento de células mortas por fagócitos depende, pelo menos em parte, da exposição de PS na camada externa da membrana das células em apoptose (STURM *et al.*, 2006).

Assim, por não expressarem PS, os merossomos não são reconhecidos e fagocitados nos sinusóides hepáticos, garantindo a liberação de merozoítos vivos diretamente na circulação e marcando o início da fase eritrocítica do ciclo do parasito (STURM *et al.*, 2006).

Na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos. Por não apresentarem moléculas de MHC em sua membrana, os eritrócitos permitem o desenvolvimento intracelular do parasito sem que o mesmo seja reconhecido pelo sistema imune (YAMAUCHI *et al.*, 2007).

Durante a fase eritrocítica, ocorrem repetidos ciclos de invasão e ruptura dos eritrócitos. Com a ruptura dos eritrócitos infectados, merozoítos, antígenos derivados do parasito (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*) e moléculas derivadas da célula hospedeira (DAMPs, do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*) são liberadas na corrente sanguínea e ativam a resposta imune do hospedeiro. O cristal de hemozoína é um destes PAMPs. O parasito promove a clivagem da hemoglobina por intermédio da enzima plasmepsina em peptídeos menores (aminoácidos), resultando na liberação do grupo prostético heme juntamente com moléculas de oxigênio. O grupo heme liberado, rico em ferro, é oxidado para um estado férrico (Fe^{3+}), criando um ambiente de pH baixo que combinado com moléculas de oxigênio, propicia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), molécula danosa tanto para o parasito quanto para o hospedeiro (SULLIVAN, 2002).

Assim, para remover o heme livre, o parasito promove a formação desses cristais de hemozoína (dímeros de heme) no vacúolo parasitóforo, que ao serem liberados na circulação ativam as células do sistema imune inato. Estudos *in vitro* relatam que a hemozoína é capaz de ativar diferentes células, como macrófagos e monócitos, e essas células passam então a produzir citocinas pró-inflamatórias

como TNF e IL-1 (HAFALLA, 2011; OAKLEY *et al.*, 2011). O TNF atua sobre o próprio macrófago induzindo a expressão da enzima iNOS e produção de óxido nítrico (NO).

As células dendríticas também secretam IL-12 ao reconhecerem produtos do parasito via TLRs e MyD88 (FRANKLIN *et al.*, 2007). A IL-12 induz a ativação de células T CD4 produtoras de IFN- γ (Th1) que novamente, irá atuar nos macrófagos levando a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) e NO, necessários para a eliminação dos estágios sanguíneos dos parasitos da malária (BAKIR *et al.*, 2011). A dualidade das citocinas pró-inflamatórias, se deve ao fato de serem fundamentais no controle da parasitemia, mas também estarem intrinsecamente relacionadas à exacerbação da resposta imune na malária.

A resposta humoral tem importante papel no controle da doença, onde a proteção mediada pelos anticorpos envolve: (I) a inibição da invasão de novos eritrócitos pelo bloqueio de proteínas responsáveis pela interação parasito-célula hospedeira, como a MSP-1 (proteína de superfície do merozoíto 1); (II) a aglutinação dos merozoítos após sua liberação dos eritrócitos, prevenindo a sua dispersão na corrente sanguínea; (III) a opsonização dos merozoítos por anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3, facilitando o seu reconhecimento e fagocitose pelos macrófagos ou mediando o processo de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), levando a remoção e morte desses merozoítos (CARVALHO *et al.*, 2002; LUSINGU *et al.*, 2005; SOE *et al.*, 2004) e (IV) o reconhecimento de moléculas induzidas pelo parasito na superfície dos eritrócitos infectados (BULL *et al.*, 1998)

1.1.5 Modelos experimentais de malária

Parasitas do gênero *Plasmodium* infectam uma variedade de animais. Com raras exceções, são específicos para uma única espécie de hospedeiro vertebrado. Homens e primatas, por exemplo, podem ser infectados por uma mesma espécie. Por questões principalmente éticas, o modelo experimental de primata não-humano é utilizado em escala restrita, sendo substituído sempre que possível por outros modelos (CONCEA, 2016; FISCHER & TAMIOSO, 2016). Em contrapartida, os modelos experimentais murinos apresentam vantagens em relação a procriação, período curto de gestação, diversidade de linhagem e manutenção, sendo o modelo de preferência para realização de estudos de infecção experimental (ANDRADE *et al.*, 2002). Além disso, esses modelos oferecem a chance de desvendar mecanismos imunológicos envolvidos durante a malária, dado que há similaridades entre a resposta imune e patologia da infecção em humanos e camundongos (LAMB *et al.*, 2006).

Entre os *Plasmodium* spp de roedores, a primeira espécie foi descrita por Vinckey e cols., em 1948. Dois anos depois, o mesmo parasito foi encontrado no sangue de roedores silvestres no Congo, África (VINCKE & LIPS, 1948). A partir desse parasito, e após infecções sucessivas em ratos brancos, originou-se a primeira cepa de *P. berghei*, a cepa K173. Posteriormente, três novas espécies que infectam camundongos foram encontradas: o *P. vinckei*, *P. chabaudi* e *P. yoelii* (RODHAIN, 1920; LANDAU, 1965). Dentre as cepas de *P. berghei* utilizadas em estudos experimentais, está incluída a cepa ANKA, isolada em regiões da República Democrática do Congo.

De acordo com VAN DER HEYDE e cols., (2001) camundongos podem ser geneticamente resistentes ou suscetíveis à infecção. O modelo de infecção de camundongos C57BL/6 com *P. berghei* ANKA é extensivamente utilizado para o estudo da MCE. Este modelo desenvolve a forma grave da doença com sintomas neurológicos, disfunção motora, convulsão/coma e morte de 80% a 100% dos animais em 6 a 9 dias após a infecção. Análises histológicas também revelam alterações morfológicas cerebrais, com ativação de células endoteliais e micróglia nestes animais (MEDANA *et al.*, 1997; AMANTE *et al.*, 2010). Na MCE, no entanto, o leucócito é o principal tipo celular sequestrado na microcirculação e não os eritrócitos, como na malária cerebral humana (NEILL; HUNT, 1992; ADAMS *et al.*,

2000). É interessante notar que, mesmo após tratamento dos camundongos com malária cerebral, os animais apresentam comprometimento cognitivo a longo prazo (DESRUISSEAUX *et al*, 2008; REIS *et al*, 2010). Além dos sintomas neurológicos, os camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA apresentam angustia respiratória, anemia e nefrite, manifestações clínicas observadas em pacientes infectados pelo *P. falciparum* (VAN DER HEYDE *et al.*, 2001).

Dentre os outros representantes da espécie *Mus musculus*, para o estudo da malária cerebral, há ainda outros camundongos suscetíveis e os modelos resistentes (BALB/c e A/J) à infecção pelo *P. berghei* ANKA e a outras espécies de *Plasmodium* (Tabela 1). A infecção de camundongos BALB/c com *P. berghei* ANKA, modelo resistente à malária cerebral, cursa com um quadro de anemia severa, onde os animais morrem 20 dias após a infecção (KOSSODO & GRAU, 1993).

Tabela 1. Modelos experimentais murino de infecção por *Plasmodium spp.*

Parasito	Cepa	Linhagem do modelo experimental murino	Letalidade	Estudo Experimental
<i>P. berghei</i>	ANKA	C57BL/6 BALB/c CBA	Letal	Malária Cerebral Experimental Patogênese Sequestro
	K173	BALB/c CBA DBA C57BL/6	Letal	Patogênese Malária Cerebral Experimental
<i>P. yoelii</i>	17XL	CBA BALB/c C57BL/6 DBA Suíço	Letal	Mecanismos imunes Patogênese Sequestro Malária Cerebral Experimental
	17XNL	CBA BALB/c C57BL/6 DBA	Não letal	Resposta Imune Vacinas
<i>P. chabaudi chabaudi</i>	AS	129sv A/J DBA/2J	Não Letal	Mecanismos imunes Sinais clínicos/ Sequestro
		CBA C57BL/6 BALB/c	Letal	Patogênese Quimioterapia Resistência e susceptibilidade Mecanismos imunes

Adaptado de: Li *et al.*, 2001.

1.2 Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania* e apresenta um amplo espectro clínico e epidemiológico, envolvendo uma diversidade de espécies do parasito, vetores (hospedeiros invertebrados) e reservatórios (hospedeiros vertebrados). Mais de 50 espécies de *Leishmania* foram identificadas em todo o mundo, e pelo menos 20 dessas espécies têm importância médica significativa e representam um importante problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais do mundo. As leishmanioses são agrupadas em duas principais formas clínicas: a leishmaniose cutânea e a leishmaniose visceral (ANVERSA *et al*, 2018; BURZA *et al*, 2018).

1.2.1 Epidemiologia

Parasitos do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, e são classificados em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*). Estes parasitos são encontrados sob duas formas evolutivas: amastigota (forma intracelular do hospedeiro vertebrado) e promastigota (forma extracelular do hospedeiro invertebrado). Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos através da picada de vetores da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo os gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo, os de maior importância para a transmissão. Os parasitos podem infectar o homem, além de animais domésticos e silvestres, e os ciclos de transmissão podem ser antroponóticos ou zoonóticos. No ciclo antroponótico, o ser humano é o reservatório, fonte de disseminação da infecção para o vetor flebotomíneo. No ciclo zoonótico, os animais são os reservatórios e são responsáveis pela manutenção e disseminação do parasito. A expansão da doença é mediada por processos de urbanização, desmatamento, além de migrações populacionais de áreas rurais para áreas urbanas, conflitos armados, entre outros (DESJEUX, 2001).

Os parasitos do gênero *Leishmania* compreendem várias espécies distribuídas em regiões do Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e do Novo Mundo (Américas), sendo descritas aproximadamente 53 espécies de *Leishmania*. Destas, 20 espécies são reconhecidas por infectar o homem (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimasse que 350 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a infecção. Para a leishmaniose visceral, estimasse que ocorram de 0.2 a 0.4 milhões de casos por ano, com 90% dos casos concentrados em países como o Brasil, Etiópia e Sudão (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2019). Em relação à leishmaniose cutânea, estimasse que ocorram de 0.7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea no mundo todos os anos (ALVAR *et al.*, 2012). (Figura 4). A doença é encontrada em 98 países ou territórios, sendo a maior parte dos casos registrados em países em desenvolvimento como o Brasil. A leishmaniose é a segunda causa de morte entre as doenças parasitárias e, responsável por aproximadamente 50 mil mortes por ano. No Brasil, reportes do Ministério da Saúde de 2016 mostraram que a incidência da leishmaniose cutânea foi de aproximadamente 13.000 novos casos ao passo que da leishmaniose visceral foi de 3.253 casos no período de 2013-2016, revelando assim os mais altos índices para estas doenças na região.

Status da endemidade de leishmaniose cutânea no mundo, 2015

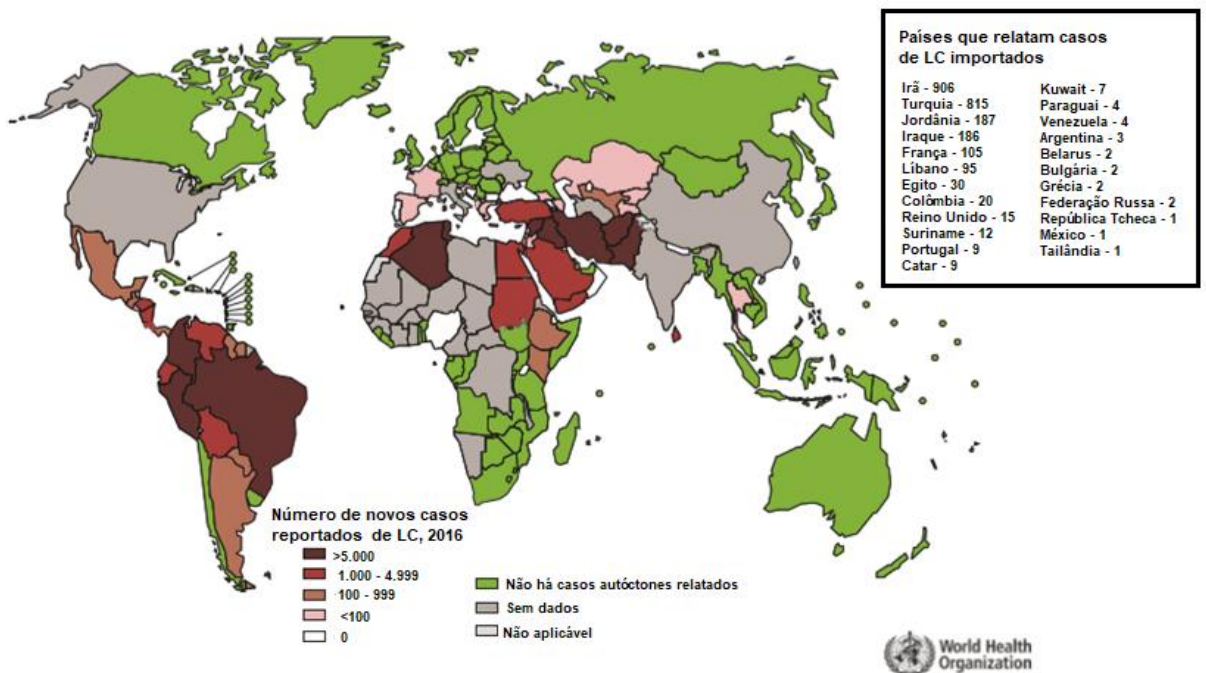


Figura 4. Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2015. Mapa representativo dos focos de leishmaniose cutânea no mundo. As áreas em marrom representam regiões com mais de 5.000 novos casos noticiados; as em vermelho representam áreas com 1.000 a 4.999 novos casos; em bege, áreas com 100 a 999 novos casos; em rosa, com menos de 100 novos casos; em branco representam as áreas onde não foram notificados novos casos; em verde, representa ausência de casos autóctones e em cinza, áreas sem dados. Adaptado de: OMS, 2015.

1.2.2 **Ciclo biológico da *Leishmania* spp**

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo heteroxeno, durante o qual se diferenciam dentro de hospedeiros vertebrados e hospedeiros invertebrados.

No intestino do flebotomíneo, as células ingeridas se rompem e as formas amastigotas liberadas se diferenciam em uma forma alongada, denominada promastigota procíclica que se divide ainda no sangue ingerido durante o repasto, que é envolvido por uma membrana peritrófica, que protege essas formas de serem degradadas por enzimas digestivas. Após 48 a 72 horas, essa membrana se rompe e as formas promastigotas são liberadas, sendo neste estágio chamadas de promastigotas nectomônadas. Essas formas migram para regiões do intestino do vetor, dependendo da espécie e, desenvolvem-se em formas promastigotas metacíclicas, processo chamado de metaciclogênese (KAMHAWI *et al.*, 2006).

O padrão de desenvolvimento no intestino do inseto vetor permitiu a definição dos subgêneros mencionados acima. Os parasitos do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) se desenvolvem na porção média e anterior (desenvolvimento suprapilário) do intestino do flebotomíneo e posteriormente migram para a probóscide. Já no subgênero *Leishmania* (*Viannia*), os parasitos se desenvolvem no intestino posterior (desenvolvimento peripilário) e após completar a diferenciação, migram para a região média e para a probóscide (LAINSON & SHAW, 1987; KAMHAWAI, 2006).

Ao migrarem para a probóscide de insetos fêmeas pertencentes ao gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*, essas formas promastigotas metacíclicas serão regurgitadas juntamente com a sua saliva, na derme do hospedeiro, iniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado (Figura 5) (SCHLEIN *et al.*, 1992; AWASTHI *et al.*, 2004; KAMHAWI *et al.*, 2006; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

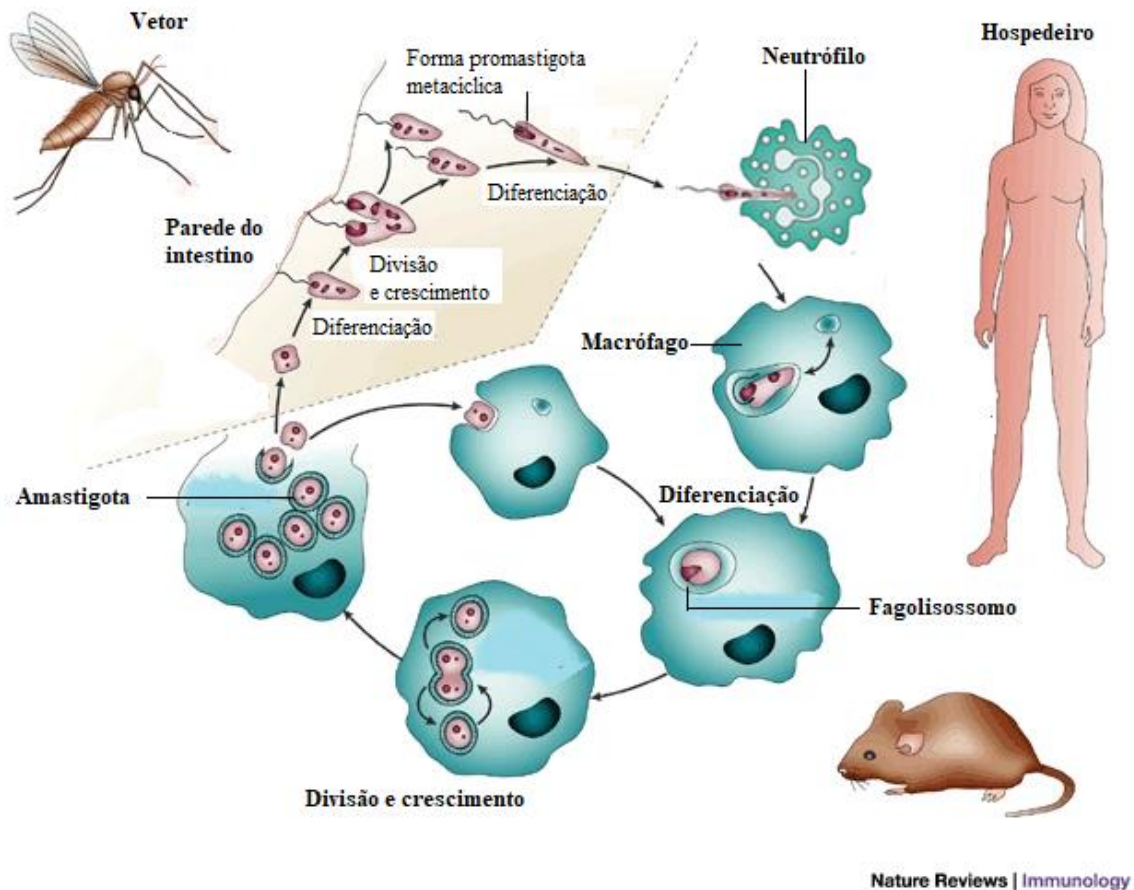


Figura 5. Ciclo biológico da *Leishmania* spp. Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos pelas picadas de flebotomíneos infectados, que injetam um pequeno número de promastigotas metacíclicas na derme. Essas formas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos. Nos macrófagos se transformam em formas amastigotas no interior dos fagolisossomos. Macrófagos infectados são capturados por flebótomos durante o repasto sanguíneo. No intestino do vetor diferenciam-se em promastigotas metacíclicas e são inoculados pela fêmea infectada do flebotomo em um novo hospedeiro vertebrado. Fonte: Adaptado de Sacks & Noben-Trauth, 2002.

Na derme, o parasito entra em contato com células residentes como macrófagos e células de Langerhans, além dos neutrófilos que são recrutados para o local. As formas promastigotas metacíclicas são rapidamente fagocitadas por neutrófilos recém-chegados ao sítio de infecção (PETERS *et al.*, 2008; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012). No interior dos neutrófilos, os parasitos não conseguem se diferenciar em amastigotas e multiplicar (LAUFS *et al.*, 2002). Os parasitos fagocitados por macrófagos são internalizadas em fagossomos que se fundem com lisossomos, dando origem aos fagolisossomos ou vacúolos parasitóforos. No interior do macrófago, com a acidificação do vacúolo parasitóforo e a mudança de temperatura do inseto vetor para aquela do hospedeiro vertebrado, ocorre a

diferenciação da forma promastigota metacíclica para amastigota, a qual se multiplica por divisão binária (McCONVILLE & NADERER, 2011; LIEVIN-LE & LOISEAU, 2016). As células infectadas sofrem apoptose e/ou ruptura mecânica devido à multiplicação não controlada do parasito, dando lugar à disseminação do protozoário, que é fagocitado por outros macrófagos adjacentes bem como por outras células fagocíticas mononucleares de diversos tecidos, como o baço, fígado, medula óssea e linfonodos (MURRAY *et al.*, 2005; SAHA *et al.*, 2006; HARHAY *et al.*, 2011; VAN GRIENSVEN & DIRO, 2012).

1.2.3 Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. A apresentação clínica da LC varia dependendo da espécie infectante, e do perfil genético e resposta imune do hospedeiro. Os agentes etiológicos da LC bem como as diferentes formas clínicas causadas por estes são resumidos na Tabela 2. Clinicamente a LC pode se apresentar na forma cutânea localizada, mucosa e cutânea disseminada, sendo a forma cutânea localizada a mais comum.

A forma cutânea se apresenta geralmente como uma lesão única, no local da inoculação das formas infectantes. Contudo, a disseminação do parasito na derme e múltiplas picadas do vetor podem gerar mais lesões na derme. A lesão surge após um longo período de incubação (2-8 meses), como pápula eritematosa, acastanhada que aumenta gradualmente, transformando-se em nódulo ou úlcera exposta com bordas elevadas e endurecidas, características clássicas da lesão na leishmaniose cutânea. Essas lesões, no geral, curam espontaneamente após alguns meses (GONTIJO & CARVALHO., 2003; BLUM *et al.*, 2014; TEMEL *et al.*, 2019).

Tabela 2. Principais formas clínicas de leishmaniose tegumentar e as espécies causadoras da doença.

Doença	Espécie	Manifestação clínica
Leishmaniose cutânea localizada (LCL)	<i>L. (L.) major</i>	Lesão única ou limitado número de lesões; as úlceras formadas podem estar úmidas ou secas, com borda crateriforme elevada. Em geral são lesões auto-resolutivas.
	<i>L. (L.) mexicana</i>	
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	
	<i>L. (L.) tropica</i>	
	<i>L. (L.) aethiopica</i>	
	<i>L. (V.) panamensis</i>	
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	
	<i>L. (L.) infantum</i>	
<i>L. (L.) donovani</i>		
Leishmaniose mucocutânea (LMC)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Lesões altamente inflamatórias envolvendo as mucosas orofaríngeas; pode ser desfigurante e são de difícil tratamento.
	<i>L. (V.) panamensis</i>	
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	
Leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCD)	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Lesões nodulares múltiplas, disseminadas, em geral não ulcerativas; muitos parasitas nas lesões. Caracteriza-se pela ausência de resposta imune.
	<i>L. (L.) mexicana</i>	
	<i>L. (V.) pifanoi</i>	
	<i>L. (L.) aethiopica</i>	
Leishmaniose disseminada (LD)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Numerosas lesões papulosas / acneiformes em ≥ 2 áreas não adjacentes do corpo, geralmente envolvendo membranas mucosas. Poucos parasitas nas lesões.
Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC)	<i>L. (L.) donovani</i>	Cavitação macular, maculopapular ou nodular hipopigmentada. Parasitas estão presentes nas lesões.

Adaptado de: Scorza *et al*, 2017.

No continente americano foram identificadas pelo menos onze espécies de *Leishmania* dermatrópicas. No Brasil, sete espécies foram identificadas como agentes causais da leishmaniose cutânea, dentre elas as mais prevalentes são: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. O parasito *L. braziliensis* é encontrado

em todos os estados do país, sendo a primeira espécie descrita como agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017). É uma espécie zoonótica, seu ciclo de transmissão envolve mamíferos silvestres como os marsupiais e causa lesões cutâneas localizadas, disseminadas e mucocutâneas (SHAW *et al*, 2003).

A *L. amazonensis* é encontrada na bacia Amazônica e em alguns estados da região Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste. Essa espécie pode causar úlceras cutâneas localizadas, ou pode levar ao desenvolvimento da forma difusa da doença. Os reservatórios silvestres incluem roedores e marsupiais. A espécie *L. guyanensis* está associada a lesões localizadas, com raro comprometimento de mucosas, e se encontra distribuída em áreas de floresta, principalmente na margem Norte do rio Amazonas (SHAW *et al*, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No Velho Mundo, a ocorrência de leishmaniose cutânea se estende do Senegal, na África até o Oriente Médio. A doença pode ser causada por quatro espécies de *Leishmania*: *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) aethiopica*. Além destas, *L. (L.) infantum*, associada em princípio somente a leishmaniose visceral, é também associada à leishmaniose cutânea, com alguns casos, embora raros, reportados desde a década de 80 em alguns países (BELHADJ *et al.*, 2003). As lesões cutâneas associadas podem ser únicas ou múltiplas, com evolução crônica e que curam espontaneamente (DEDET & PRATLONG., 2003).

A *L. tropica* é encontrada principalmente em áreas urbanas, com transmissão somente entre humanos, e produz ulcerações indolores na pele. Já a *L. aethiopica*, é o agente causador da leishmaniose cutânea difusa (LCD), que produz nódulos crônicos, não-ulcerados, por todo corpo (DESJEUX, 2001; 2004).

Leishmania major, é a espécie do Velho Mundo mais estudada. Esta espécie está associada a um ciclo de transmissão zoonótico que envolve o vetor *Phlebotomus papatasi* e tem como principais reservatórios roedores silvestres como *Rhombomys optimus*, encontrado no Afeganistão, além de canídeos infectados na Arábia Saudita (MOTAZEDIAN *et al.*, 2002; 2006). A leishmaniose cutânea causada por essa espécie, após um período de incubação assintomático, é caracterizada por um único ou pequeno número de lesões nodulares ou papulosas que se desenvolve no local da deposição do parasito. Essas lesões podem curar sem tratamento em

muitos casos. Contudo, a resolução pode levar meses ou anos e resulta na formação de uma cicatriz hipopigmentada e deprimida. É importante ressaltar que a resolução da lesão não corresponde a uma cura estéril, uma vez que parasitos ou DNA do parasito podem ser encontrados em pacientes, anos após o sucesso do tratamento com cura clínica (SCHUBACH *et al*, 1998; SCORZA *et al*, 2017).

1.2.4 Resposta imune

O modelo experimental murino, apesar de não apresentar um perfil de resposta imunológico totalmente igual ao humano, é capaz de mimetizar diversos aspectos fisiológicos da infecção, permitindo assim, a compreensão de aspectos implicados na resposta do hospedeiro vertebrado à infecção (CHORILLI *et al.*, 2007).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor ocasiona uma injúria na derme e na microvasculatura, que irá desencadear uma forte resposta inflamatória local e o recrutamento de células para o sítio de infecção.

Dessa maneira, as formas promastigotas metacíclicas inoculadas interagem com um ambiente rico em células residentes na derme, como macrófagos, queratinócitos e células de Langerhans, bem como por fagócitos profissionais que migram ao local da inflamação.

Os promastigotas penetram nas células fagocíticas a partir da interação de suas moléculas da superfície com uma serie de receptores nos macrófagos, como CR1 e CR3 e os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores de fucose-manose e Scavenger (MOSSER & EDELSON *et al*, 1985; GOUGH & GORDON, 2000). Uma vez que os macrófagos estão infectados com o parasito, ocorre a fusão do fagossomo com o lisossomo, induzindo a ação de agentes leishmanicidas, como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses macrófagos infectados se tornam incapazes de eliminar os parasitos, além de não produzirem IL-12, citocina importante para a diferenciação da população de células do tipo Th1 (CARRERA *et al*, 1996; BELKAID *et al*, 1998).

Estudos com promastigotas de *L. major* mostram que após a inoculação dos parasitos, os queratinócitos secretam rapidamente mediadores imunomoduladores,

como IL-12, IL-1 β , IL-4 e IL-6 (EHRCHEN *et al.*, 2010). Além disso, as células de Langerhans, poucos minutos após a inoculação intradérmica do parasito, tornam-se imóveis e incorporam múltiplos parasitos, através da extensão de pseudópodes (BREWIG *et al.*, 2009).

Também, com a pequena hemorragia causada pelo dano da microvasculatura local, os parasitos entram em contato com as proteínas do sistema complemento do sangue do hospedeiro (DOMINGUEZ *et al.*, 2003). É nessa fase que o parasito usa sua primeira estratégia de escape, evitando a lise pelo complemento, por meio de glicoproteínas da membrana do parasito como LPG e gp63 (também conhecida como MSP, do inglês *Major surface protease*). A glicoproteína gp63 é expressa abundantemente na superfície celular das formas promastigotas metacíclicas, sendo responsável por clivar a molécula C3b em C3bi, sua forma inativa, impedindo, também, a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) do sistema complemento. Essas moléculas atuam, também, na opsonização do parasito, facilitando a fagocitose por meio de ligação destas moléculas aos receptores do sistema complemento CR3 e CR1 presentes nas células. A ligação aos receptores do complemento impede a ativação dos mecanismos oxidativos microbicidas dos fagócitos, facilitando a persistência do parasito na célula (WRIGHT; SIVERSTEIN, 1983; BRITTINGHAM *et al.*, 1995).

Além disso, as formas promastigotas induzem macrófagos a secretarem CCL2 e CXCL1 que atuam recrutando monócitos e neutrófilos, respectivamente, para o local da infecção, no qual se instala uma resposta inflamatória que resulta no aparecimento da lesão (RACOOSIN & BEVERLEY, 1997; VON STEBUT, 2007).

Os neutrófilos, as primeiras células a serem recrutadas para o local da infecção, atuam no controle da infecção pela *Leishmania* de três formas: por meio da fagocitose, pela morte extracelular através da liberação de NETs (do inglês *Neutrophils Extracellular Traps*), e pela cooperação com macrófagos dérmicos (GUIMARÃES *et al.*, 2009; MOUGNEAU *et al.*, 2011). A fagocitose dos parasitos ativa o sistema NADPH oxidase ligado à membrana, importante para a produção de radicais reativos de oxigênio (ROS) que atuam diretamente na morte dos parasitos (URIARTE *et al.*, 2011; VETHANAYAGAM *et al.*, 2011).

Peters e cols., (2008) observaram, por microscopia intravital e por citometria de fluxo, um intenso e rápido infiltrado neutrofílico nos locais da picada dos flebotomíneos, onde esses neutrófilos capturaram eficientemente os promastigotas de *L. major* (PETERS *et al.*, 2008). É importante ressaltar que após serem internalizados pelos neutrófilos, os parasitos podem sobreviver por pelo menos 42 horas, mas nenhuma multiplicação é observada. Assim, essas células podem servir apenas como células hospedeiras temporárias para os parasitos nas primeiras horas após a infecção. Esta observação levou os autores a denominar os neutrófilos como “cavalos de tróia”, pois quando estas células entram em apoptose, são rapidamente fagocitadas por macrófagos; contudo, como células apoptóticas não ativam as funções efetoras antimicrobianas dos macrófagos, a fagocitose dos neutrófilos infectados resulta no “transporte silencioso” dos parasitos para o interior dos macrófagos, e portanto, favorecem sua persistência e disseminação. A captação do neutrófilo apoptótico induz uma diminuição na produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β e TNF- α e aumento da secreção de TGF- β pelos macrófagos, sugerindo que a absorção de neutrófilos apoptóticos infectados pode criar um meio anti-inflamatório, benéfico para a sobrevivência da *Leishmania*, que pode ser transferida para suas células alvo sem alarmar a resposta imune (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Não obstante, esses mecanismos parecem depender do perfil genético do hospedeiro, pois, em um estudo com modelos murinos resistentes e suscetíveis à infecção com *L. major*, foi observado que em camundongos BALB/c (suscetíveis), a interação com neutrófilos mortos favoreceu a proliferação de *L. major* através da produção de PGE₂ e TGF- β pelos macrófagos. No entanto, em camundongos resistentes (C57BL/6) os neutrófilos promoveram a morte do parasito, através da produção da elastase neutrofílica (NE) e da citocina TNF- α , que induzem a atividade leishmanicida dos macrófagos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004).

Além desse recrutamento rápido de neutrófilos, um influxo de monócitos para o sítio de infecção também é observado. Nestes, os monócitos se diferenciam em células dendríticas que podem eventualmente capturar amastigotas liberadas pela lise de macrófagos (LÉON *et al.*, 2007). Van Zandbergen e cols., (2004) usando um ensaio de migração *in vitro*, avaliou que os neutrófilos infectados participam do recrutamento de monócitos para o local de infecção através da produção de MIP-1 β , fator quimiotático para monócitos (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004).

Depois da fagocitose, algumas células dendríticas migram e chegam aos linfonodos drenantes (VON STEBUT, 2007). Os linfonodos que drenam o local da infecção são importantes para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa direcionada a *Leishmania*. Estudos em modelo murino demonstraram que células T CD4⁺ específicas para *Leishmania* são detectadas no linfonodo drenante em até 16h após a infecção (MALHERBE *et al.*, 2000; EHRCHEN *et al.*, 2008).

Essas células rapidamente se expandem e se diferenciam em células secretoras de citocinas que exibem diferentes fenótipos, dependendo da linhagem do camundongo, podendo polarizar para uma resposta com perfil Th1 ou Th2 (MALHERBE *et al.*, 2000; VON STEBUT, 2007). Em todas as formas clínicas da LC, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, isso se deve ao balanço da resposta Th1/Th2 (BACELLAR *et al.*, 2002).

Na leishmaniose humana e murina, a resposta imune celular do tipo Th1 tem sido associada ao controle da infecção, com perfil de resistência (REIS *et al.*, 2006).

As células das linhagens de animais geneticamente resistentes, como os camundongos C57BL/6, diferenciam-se em células Th1 que secretam IFN- γ e/ou TNF, contribuindo para a eliminação do parasito através de diferentes mecanismos, incluindo a ativação de macrófagos para a produção de óxido nítrico. Em contraste, em camundongos da linhagem BALB/c, geneticamente suscetíveis, a resposta das células T é dominada por células Th2 que secretam IL-4, IL-5 e IL-13, as quais favorecem a persistência do parasito. Para que se estabeleça um perfil Th1, as células dendríticas, além de processar e apresentar peptídeos parasitários para células T CD4⁺, secretam citocinas como IL-12 ou IFN tipo 1 que promovem a polarização de células T virgens em linfócitos efetores Th1 (VON STEBUT *et al.*, 1998; STOBIE *et al.*, 2000). Já foi demonstrado que a infecção por *L. major* induz a produção de IL-12 e que essa citocina é necessária para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora Th1 (SYPEK *et al.*, 1993; VIEIRA *et al.*, 1994). Na infecção, as células dendríticas também secretam IFN tipo 1, que contribui para o estabelecimento de uma resposta Th1 protetora (FILIPPI *et al.*, 2003; VON STEBUT *et al.*, 2003). A produção de IFN- γ é mantida também pelas células Natural Killer (NK). Bajenoff e *co/s.*, (2006) usando análise imuno-histoquímica e imagem dinâmica intravital para estudar a localização e o comportamento das células NK em linfonodos logo após a infecção por *L. major*, mostraram que células NK residem na

medula e no paracórtex no linfonodo de camundongos naive, porém a infecção com *L. major* induz as células NK a secretarem IFN- γ e a serem realocadas para o paracórtex, onde a ativação de células T CD4⁺ ocorreu concomitantemente (BAJENOFF *et al.*, 2006). Em outro estudo, foi visto que essa secreção de IFN- γ foi parcialmente dependente da secreção de IL-12 pelas células dendríticas, mas também da secreção de IL-2 por células T CD4⁺ específicas para o parasita, sugerindo que existe uma interação complexa entre células do sistema imune adaptativo e células do sistema imune inato para responder à infecção pela *Leishmania* (BIHL *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que um padrão de resposta Th1 não anula a presença de células Th2, e que a predominância de células Th1 ou Th2 é que determina o perfil de resposta, regulando e favorecendo a manutenção desse perfil em contraposição ao outro, através da secreção e balanço de citocinas (CASTELLANO *et al.*, 2009).

A infecção por *Leishmania* também resulta na ativação e expansão de células T CD8 específicas para antígenos do parasito. Já foi descrito o papel destas células em relação à atividade citotóxica sobre macrófagos infectados, os quais, ao sofrerem lise, contribuem para o dano tecidual, que levam ao aparecimento e evolução das lesões cutâneas (RUSSO *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2002; HERNANDEZ-RUIZ *et al.*, 2010). Por outro lado, em estudos *in vitro* com células mononucleares humanas expostas ao parasito foi observada a produção de IFN- γ por células T CD8⁺, levando a uma polarização para uma resposta protetora com perfil Th1 (NATEGHI *et al.*, 2010).

1.2.5 Modelos experimentais de leishmaniose cutânea

Para estudar esses mecanismos imunes, o uso de modelos murinos é de suma importância por permitir o estudo, sob condições controladas, de aspectos relacionados à imunopatologia do curso da infecção, entre outros. Os reservatórios naturais de espécies de *Leishmania* são roedores encontrados em áreas de desertos e savanas (SACKS & MELBY, 2001) e mesmo aquelas espécies que não possuem estes roedores como reservatórios, como *L. infantum*, são capazes de

infectar modelos murinos (SACKS & MELBY, 2001) (Tabela 3). Desta forma, roedores vêm sendo empregados em estudos experimentais das leishmanioses, assim como da malária.

Tabela 3. Infecção experimental com *Leishmania* spp. em diferentes linhagens de camundongos.

Parasito	Via de infecção	Linhagem do modelo experimental murino	Evolução		
<i>L. major</i>	Subcutânea	BALB/c	Progressiva		
		DBA/1 DBA/2			
		C57BL/6 CBA C3H A/J	Cura		
		<i>L. amazonensis</i>	Subcutânea	BALB/c C57BL/10	Crônica
				<i>L. braziliensis</i>	Subcutânea
Intradérmica	BALB/c	Cura			

Adaptado de: Sacks & Melby, 2001.

O modelo murino reproduz diversos aspectos da doença. Os aspectos imunopatológicos e desfecho clínico da infecção experimental dependem da espécie de *Leishmania*, do número de parasitos inoculados e da via de inoculação de escolha. A via de infecção subcutânea pela cauda e pata foi a primeira a ser utilizada. Todavia, para reproduzir de forma mais fiel a infecção natural com o flebótomo na derme do hospedeiro, a via intradérmica na orelha vem sendo mais utilizada, podendo ser avaliado o desenvolvimento da lesão pela medida do seu diâmetro (SACKS & MELBY, 2001).

Para estudar os mecanismos imunes implicados na suscetibilidade ou resistência à doença, é avaliado se esses animais conseguem controlar a lesão, controlar o número de parasitos e montar uma resposta imune efetiva e protetora ao parasito. Como espécie de preferência para elucidar esses mecanismos, *L. major* é a mais utilizada, sendo possível demonstrar a relação das linhagens susceptíveis e

resistentes com a dualidade da polarização para uma resposta com perfil Th1 ou Th2. A predisposição genética para suscetibilidade ou resistência à infecção por *L. major* em camundongos está intrinsecamente relacionada com a dominância de uma resposta Th2 induzida por IL-4 que é associada com a doença ou por IFN- γ induzido por IL-12, levando à uma resposta Th1 que promove a depuração do parasito e cura da lesão, respectivamente (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

1.3 Coinfecção

O risco de contrair uma infecção é inerente à vida de qualquer ser vivo que habite o planeta (COX, 2001). A coabitação de diferentes espécies de bactérias, vírus, fungos e protozoários com os seres humanos, aumentam as chances de infecções variadas e como já relatadas na literatura, á ocorrência de infecções concomitantes ou coinfeções (GRIFFITHS *et al*, 2011). O termo coinfeção descreve uma infecção simultânea de um hospedeiro por múltiplos microrganismos diferentes (COX, 2001). O sucesso de cada infecção, no caso das coinfeções, depende de vários fatores como a ordem de chegada dos patógenos e, principalmente, o balanço entre o sistema imune do hospedeiro e a capacidade de cada parasito em evadir das respostas desse sistema (BIRGER *et al.*, 2015; SUSI, 2015).

Em um ambiente com uma grande variabilidade de patógenos, a competição e a coexistência no mesmo hospedeiro é algo esperado. Além disso, o efeito da coinfeção está relacionado ao tipo de interação que os parasitos estabelecem entre si e com o hospedeiro. As interações entre os parasitos podem ser neutras, quando a presença de um não afeta a presença do outro; sinérgicas, quando a presença de um parasito favorece o estabelecimento do outro; ou antagônicas, quando um parasito prejudica a permanência do outro patógeno em um mesmo habitat (GRIFFITHS *et al*, 2014; BIRGER *et al.*, 2015).

Quando ocorre uma interação antagônica um dos patógenos pode suprimir a presença do outro, facilitando a permanência do primeiro patógeno e podendo aumentar os sintomas da infecção (COX, 2001; BIRGER *et al.*, 2015). Por exemplo, a infecção com *Helicobacter pylori* (bactéria comensal) induz uma resposta que suprime a replicação de outros patógenos coinfectantes, como o *Mycobacterium*

tuberculosis (BIRGER *et al.*, 2015). Em uma interação sinérgica, ocorre uma cooperação mesmo que indireta. Infecções virais do trato respiratório predis põem o hospedeiro a infecções respiratórias bacterianas ao aumentar a adesão às células epiteliais. Infecções virais também facilitam as infecções bacterianas ao produzirem substratos benéficos ao crescimento bacteriano (BIRGER *et al.*, 2015).

Nas coinfeções por parasitos intracelulares e helmintos há um padrão de resposta imune celular diferenciado para cada um dos parasitos. Parasitos intracelulares induzem respostas do tipo 1 ao passo que helmintos estimulam respostas do tipo 2. Quando ocorre uma coinfeção e essas duas respostas encontram-se sobrepostas, acredita-se que o desvio para uma delas afete a resposta a um dos parasitos, influenciando o curso da doença (SUPALI, 2010; COX, 2001). Mesmo assim, ainda há controvérsias a respeito dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade ou resistência de hospedeiros quando parasitados simultaneamente por microrganismos geneticamente diferentes ou não. Diversos estudos envolvendo a coinfeção HIV- *Mycobacterium tuberculosis* (TB), HIV- Vírus da hepatite B (HBV), *Plasmodium* spp.-parasitos intestinais e *Plasmodium* spp.- *Leishmania* spp. vêm sendo realizados para compreender os mecanismos envolvidos nestas interações (GRIFFITHS *et al.*, 2014).

As coinfeções ganharam importância com o estudo de casos de infecções de HIV e *M. tuberculosis*. Segundo Getahun e cols., (2010) são 14 milhões de pessoas coinfectadas no mundo, sendo a tuberculose a principal causa de morte em pacientes com HIV (GETAHUN *et al.*, 2010). Além disso, o HIV aumenta em 20 vezes o risco de contrair tuberculose quando comparado a pacientes soronegativos para o vírus (BRUCHFELD *et al.*, 2015). Em estudos *in vitro* foi demonstrado que a coinfeção com *M. tuberculosis* regula positivamente a replicação do vírus HIV em células T infectadas e macrófagos (SHATTOCK *et al.*, 1993), impactando negativamente a resposta imune do hospedeiro ao vírus e acelerando a progressão da infecção.

Quanto as parasitoses intestinais, a concomitância dessas com o *Plasmodium* spp é comum em áreas tropicais e subtropicais. A coinfeção de parasitos do gênero *Schistosoma* e *Plasmodium* e suas consequências apontam dados controversos. Alguns estudos observaram que a infecção com *S. haematobium* está associado a uma diminuição da prevalência de malária e da gravidade da doença, enquanto que

outros estudos mostraram aumento da prevalência ou risco de infecção pelo *Plasmodium*, além de níveis baixos de hemoglobina e esplenomegalia associada a indivíduos infectados com *S. haematobium* (DEGAREGE & ERKO, 2016). No modelo murino, foi evidenciado que em camundongos coinfectados com *S. mansoni* e *P. chabaudi*, a infecção com o esquistossoma modula a suscetibilidade ao *Plasmodium sp*, aumentando a parasitemia e mortalidade (HELMBY *et al*, 1998). Já quando essa coinfeção se dá com o *P. yoelii* pode haver supressão dos estágios hepatocitários do *Plasmodium sp* no fígado, mediada por um ambiente imune alterado no órgão, causado pela presença de ovos de *S. mansoni*. Além disso, a infecção com o esquistossoma reduziu a infectividade dos gametócitos no vetor (MORIYASU *et al.*, 2018).

Em relação a outros protozoários, foi observado que camundongos C57BL/6 coinfectados com *P. berghei* ANKA e *Trypanosoma cruzi* cepa G apresentaram menor quebra da barreira hematoencefálica, reduzido edema pulmonar e uma sobrevivência mais prolongada que os animais monoinfectados com o *P. berghei* ANKA (EGIMA *et al*, 2007). Entretanto, na coinfeção de camundongos Swiss com *T. brucei*, causador da doença do sono, e *P. berghei* NK65, ocorreu uma queda na sobrevivência e um aumento da parasitemia nos grupos coinfectados. Estes animais coinfectados também apresentaram menor peso corporal, anemia e hipoglicemia grave, sugerindo que essa coinfeção agrava o curso da doença do sono no hospedeiro (ADEMOLA & ODENIRAN, 2016).

A interação simultânea em um mesmo hospedeiro dos parasitos dos gêneros *Leishmania* e *Plasmodium* foi primeiramente descrita em 1948 quando, ao observar uma lâmina de diagnóstico de leishmaniose visceral, foi detectada a presença de parasitos não pigmentados da malária, sugerindo um caso de coinfeção (YOELI, 1948). Mais recentemente, um estudo retrospectivo com pacientes em hospitais de Médicos Sem Fronteiras (MSF), no Sudão, evidenciou que os pacientes com malária e leishmaniose visceral simultânea, tinham um risco aumentado de anemia grave em comparação com pacientes monoinfectados com *Plasmodium sp*. Além disso, foi associado que a coinfeção com o *Plasmodium sp* exacerba o quadro clínico do calazar, com pacientes apresentando quadros mais graves de icterícia e esplenomegalia (VAN DEN BOGAART *et al*, 2013). Segundo Van den Bogaart e cols., (2014), pacientes coinfectados com *L. donovani* e *P. falciparum* apresentam

produção mais elevada de citocinas inflamatórias séricas, como IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-17, quando comparado aos indivíduos mono infectados. A capacidade dos parasitos dos gêneros *Leishmania* e *Plasmodium* em manipular a imunidade do hospedeiro, também foi observada em outro estudo, do mesmo grupo, onde células dendríticas estimuladas *in vitro* com formas promastigotas de *L. donovani* e com eritrócitos parasitados por *P. falciparum* não amadureciam totalmente, secretando baixos níveis de IL-12. (VAN DEN BOGAART *et al*, 2014).

Ainda assim, não existem relatos de coinfeções humanas causadas por espécies de *Plasmodium* e espécies dermatrópicas de *Leishmania*, apesar da distribuição dessas doenças se sobreporem em diversas regiões no mundo, inclusive no Brasil. A avaliação dessa coinfeção em modelos experimentais mostrou que camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* e *P. yoelli* apresentaram parasitemia maior quando comparado aos animais infectados somente com *P. yoelli*. Esses animais também apresentaram lesões cutâneas maiores quando comparados aos camundongos infectados apenas com *L. amazonensis*, sugerindo que a coinfeção aumenta a suscetibilidade e a gravidade das duas doenças (COLEMAN *et al*, 1988). Em um estudo mais recente, a coinfeção de duas espécies que causam leishmaniose cutânea, comumente encontradas no Brasil, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, e o *P. yoelli* XNL (cepa não letal) em camundongos BALB/c mostrou as possíveis alterações na resposta imune causada por essa coinfeção. Os grupos coinfectados (*P. yoelli* + *L. braziliensis* e *P. yoelli* + *L. amazonensis*) apresentaram baixas concentrações de IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 em relação aos animais infectados com *P. yoelli*, demonstrando uma possível modulação da resposta imune na malária por infecções causadas pela *Leishmania*. Além disso, observaram que a infecção com o *Plasmodium* reduziu a gravidade ou retardou o início das lesões nas orelhas dos camundongos coinfectados com *P. yoelli* + *L. braziliensis* e *P. yoelli* + *L. amazonensis*, respectivamente, quando comparado aos grupos mono infectados com *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (PINNA *et al*, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Investigar a implicação da coinfeção com os parasitos *Plasmodium berghei* e *Leishmania major* em camundongos C57BL/6 no desenvolvimento da resposta imune inata e adquirida, e consequente controle ou exacerbação da doença.

2.2 *Objetivos específicos*

1. Investigar o efeito da infecção por *L. major* no curso clínico da infecção por *P. berghei* ANKA a partir da parasitemia, sobrevivência, peso corporal e temperatura;
2. Investigar o efeito da infecção por *P. berghei* ANKA no curso clínico da infecção por *L. major* a partir do tamanho da lesão cutânea e carga parasitária na derme e linfonodo drenante;
3. Avaliar as diferentes subpopulações de células do sistema imune inato e adquirido no baço e derme dos animais coinfectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA;
4. Avaliar as citocinas presentes no soro de animais coinfectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA;
5. Verificar a expressão de genes envolvidos na resposta imune aos parasitos *L. major* e *P. berghei* ANKA na derme, linfonodo e baço dos animais coinfectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos fêmeas isogênicos da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 a 8 semanas foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da FIOCRUZ. Durante o andamento dos experimentos os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Pavilhão Leônidas Deane do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IOC/FIOCRUZ (Licença L030-2017) (ANEXO 1). Os animais foram mantidos em condições de luz e temperatura controlada.

3.2 Parasitos

Foi usada a cepa ANKA do plasmódio murino *Plasmodium berghei* transfectada com a proteína verde fluorescente (GFP) (*P. berghei* ANKA-GFP) e a cepa Friedlin FV1 (MHOM/IL/80/FN) de *Leishmania major*, transfectada com a proteína vermelha fluorescente (RFP) (*L. major*-RFP), geradas e mantidas como descrito previamente (CARVALHO *et al.*, 2000; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012).

3.3 Infecção experimental

3.3.1 *Plasmodium berghei* ANKA

Para a infecção experimental com *P. berghei* ANKA-GFP, um criotubo contendo uma alíquota de sangue com eritrócitos parasitados foi descongelada e o conteúdo inoculado (100µL) em 1-2 camundongo(s) C57BL/6, via intraperitoneal (i.p.). Após 4-5 dias da infecção, quando os animais atingiram a parasitemia de 5-10%, o sangue desses animais foi coletado por punção cardíaca com o auxílio de uma seringa rinsada com heparina. Baseado na parasitemia e hematimetria do sangue dos animais parasitados foi realizado o cálculo da concentração de

eritrócitos parasitados (1×10^6 /100 μL) e os animais do grupo experimental foram inoculados via intraperitoneal (i.p).

Aspectos como variação de temperatura, peso e sinais característicos de malária cerebral, como postura anormal, pelo arrepiado, convulsões, sinais de paralisia, coma e morte também foram avaliados.

3.3.2 *Leishmania major*

Para a infecção experimental com *L. major*, alíquotas contendo formas promastigostas foram descongeladas e mantidas em cultura no meio Schneider completo suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2% de urina estéril, 100ug/ μL de penicilina/Streptomicina e 1.5mM de glutamina (Sigma) em estufa (BOD) à temperatura de 26°C até que atingissem a fase estacionária (5-6 dias). Para obter a cultura enriquecida com as formas metacíclicas, os parasitos foram centrifugados (1700g, 15min), ressuspendidos em 2 mL de meio RPMI e esta solução colocada, gota a gota sobre Ficoll a 10%, para que se formasse o gradiente. Após centrifugação (700g, 10min), as formas metacíclicas foram coletadas na fase de anel e lavadas com meio RPMI através de centrifugação (1700g, 15 min, 4°C). Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e seu número ajustado para a concentração de 2×10^7 formas promastigostas metacíclicas por mL. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 100 μL de anestésico xilazina (10 mg/kg) e quetamina (150 mg/kg) e com o auxílio de uma seringa de insulina foram inoculados 2×10^5 parasitos em 10 μL via intradérmica (i.d) na orelha dos camundongos. Foram utilizados parasitos mantidos em cultura por até 4 passagens.

3.4 *Desenho experimental*

3.4.1 *Desenho experimental A*

Os experimentos foram divididos em dois desenhos experimentais. No desenho experimental A (Figura 6), os camundongos foram inoculados com eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA-GFP (1×10^6) no peritônio no dia 0 e coinfetados com formas metacíclicas de *L. major*-RFP (2×10^5) na orelha no dia 3. Foram analisados no 6° dia após infecção com o *Plasmodium* sp: (1) parasitemia, (2)

recrutamento e fenótipo de células mieloide e linfoide na orelha e baço, (3) carga parasitária de *L. major* na orelha e linfonodo. Também foram coletadas e armazenadas alíquotas de soro, baço, linfonodo drenante e orelha para posterior análise. A sobrevivência foi acompanhada e outros parâmetros foram avaliados para verificar se a coinfeção com *L. major* alteraria o tempo de vida e o curso da doença nos animais coinfectados. Os animais foram separados aleatoriamente para dar lugar a quatro grupos experimentais: animais não infectados (Naive), animais infectados com *P. berghei* ANKA (*PbA*), animais infectados com *L. major* (*Lm*) e animais infectados com *P. berghei* ANKA e coinfectados com *L. major* (*PbA+Lm*).

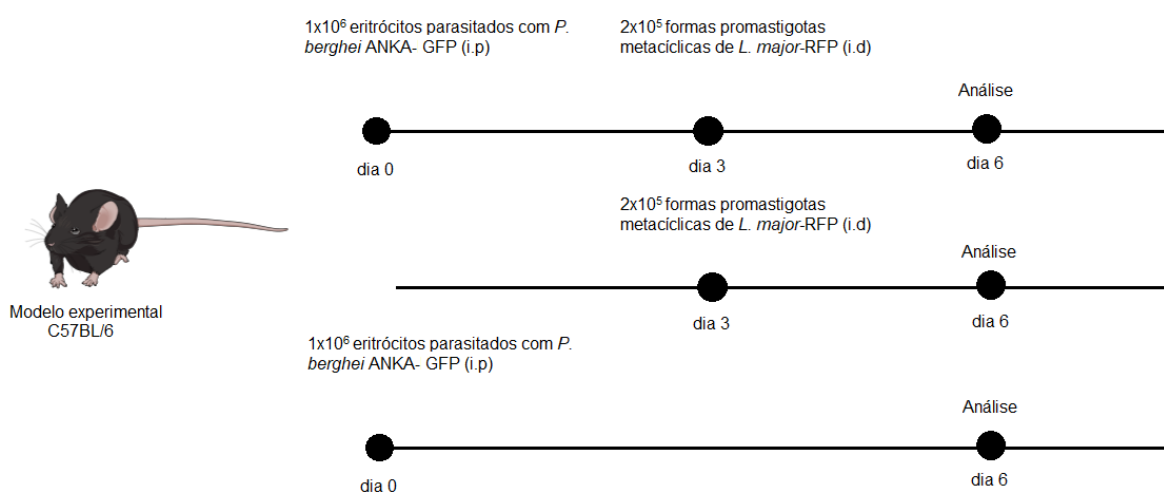


Figura 6. Desenho experimental A. Camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e posteriormente coinfectados com *Leishmania major*. Camundongos C57BL/6 foram inoculados no dia 0 com 1x10⁶ eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA e coinfectados com formas metacíclicas de *L. major* três dias após a infecção com *Plasmodium*. A análise foi realizada no 6º dia após a infecção com *P. berghei* ANKA ou a sobrevivência foi acompanhada ao longo dos dias de infecção.

3.4.2 Desenho experimental B

No desenho experimental B (Figura 7), formas metacíclicas de *L. major*-RFP foram inoculadas na derme (orelha) de camundongos C57BL/6. No 14º ou no 28º dia pós-infecção, os camundongos foram coinfectados com eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA-GFP, no peritônio, e então analisados nos 20º ou 34º dia, respectivamente. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: animais não infectados (Naive), animais infectados com *P. berghei*

ANKA (*PbA*), animais infectados com *L. major*-RFP (*Lm*) e animais infectados com *L. major* e coinfetados com *P. berghei* ANKA (*Lm+PbA*).

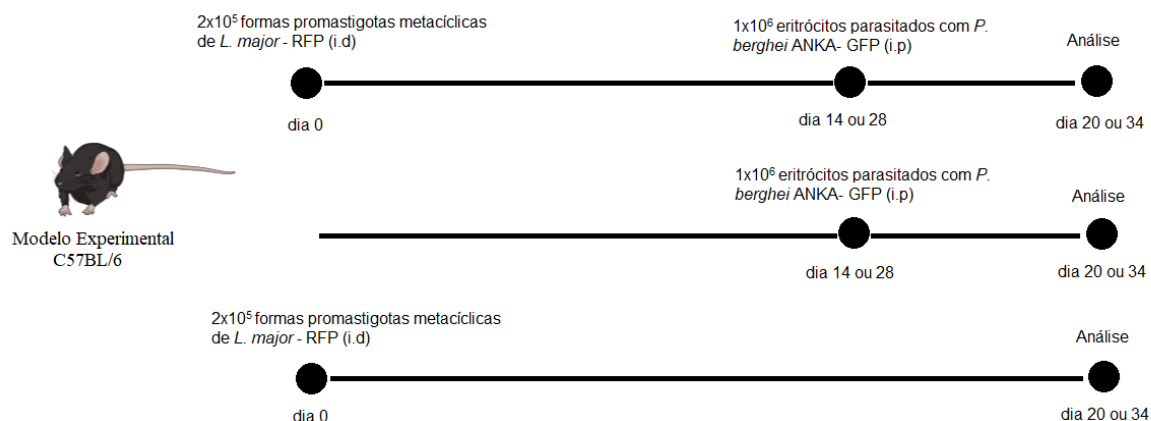


Figura 7. Desenho experimental B. Camundongos infectados com *L. major* e posteriormente coinfetados com *P. berghei* ANKA. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 2×10^5 formas promastigotas metacíclicas no dia 0 e coinfetados com 1×10^6 eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA no 14^o ou 28^o dia, dependendo do experimento realizado. A análise foi realizada no 20^o ou 34^o dia após a infecção com *Leishmania* sp.

3.5 Avaliação do curso da infecção por *P. berghei* ANKA-GFP

O curso da infecção com *P. berghei* ANKA-GFP foi monitorado a partir da parasitemia, sobrevida, peso corporal e temperatura. A parasitemia (percentual de eritrócitos GFP⁺) foi avaliada, nos dias 3 e 6 pós-infecção, diluindo 0,5 μ L de sangue da cauda dos camundongos em 500 μ L de PBS por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no aparelho FACs CANTO II (BD Bioscience) (CARVALHO *et al.*, 2000). A sobrevida foi monitorada pelo acompanhamento diário dos animais infectados. Sinais clínicos como pelo arrepiado, letargia, convulsões e baixa temperatura foram observados. Os animais tiveram sua temperatura mensurada (termômetro OAKTON) e então foram pesados, após anestesia, no dia 6 após infecção com *P. berghei* ANKA.

3.6 Determinação e mensuração da lesão após infecção por *L. major*-RFP

A evolução da infecção com *L. major* foi acompanhada semanalmente, por até 16 semanas, pela medida da espessura das lesões nas orelhas, realizada com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess) (Figura 8). Simultaneamente, foi verificado o momento do aparecimento das lesões nos animais ao longo do período de acompanhamento.



Foto: Uyla Ornellas, 2018.

Figura 8. Mensuração do tamanho da lesão da orelha de camundongos infectados por *Leishmania major*, com auxílio de um paquímetro digital.

3.7 Dosagem e avaliação dos níveis de citocinas séricas

Para avaliação das citocinas presentes no soro dos camundongos, no 6º dia após a infecção o sangue foi coletado por punção cardíaca e disposto em eppendorfs de 1 mL. Após a coleta, foi separada uma alíquota para avaliação da parasitemia e o sangue restante foi centrifugado (1700 g, 5 min). Em seguida, o soro foi recolhido e congelado à -20°C para posterior utilização. A dosagem de citocinas no soro foi realizada utilizando o kit comercial Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences) e os dados obtidos foram analisados no programa FCAP Array (versão

3.0). As concentrações séricas de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17 das amostras foram determinadas utilizando a equação da curva padrão e os valores médios de intensidade de fluorescência obtidos.

3.8 Processamento do tecido do baço, orelha e linfonodo auricular drenante.

3.8.1 Processamento do baço (obtenção de esplenócitos).

Para a obtenção dos esplenócitos, camundongos C57BL/6 foram submetidos à eutanásia no 6^o dia após a infecção com *P. berghei* ANKA. Os baços foram retirados de forma asséptica e colocados em placas de seis poços contendo 2 mL de PBS 1X. Em seguida, os órgãos foram cortados com uma tesoura e macerados com o auxílio de uma peneira de nylon (BD Falcon Cell Strainer) e um êmbolo de seringa. Após isso, a placa foi lavada com 3 mL de PBS e o volume total transferido para tubos tipo Falcon de 15 mL e centrifugado (250 g, 7 min 4°C). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (SIGMA). Após 2 min, foi adicionado PBS gelado com 10% de SFB para deter a lise dos eritrócitos. Foi realizada mais uma centrifugação e as células foram ressuspensas em 5 mL de PBS com 5% SFB. As células foram diluídas em azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer. Em paralelo, 1 mL da suspensão celular foi centrifugado e ressuspensado em 500 μ L de Trizol. Essas amostras foram etiquetadas e armazenadas a -20°C para posterior extração de RNA.

3.8.2 Processamento da orelha

Após a eutanásia dos animais, as orelhas foram retiradas com o auxílio de uma tesoura e colocadas em placas de 24 poços contendo álcool 70%. Após 5 min, as orelhas foram deixadas no fluxo laminar para evaporar completamente o álcool e, posteriormente, utilizando pinças, separou-se a parte dorsal da parte ventral das orelhas. Em seguida, as orelhas foram colocadas em placas de 24 poços contendo 0,5 mL de meio RPMI com antibiótico (100 μ g/ μ L penicilina/streptomicina) e liberase (0,05 mg/mL, Roche), durante 1 h e 30 min em estufa (5% CO₂, 37°C). Depois, foram adicionados 500 μ L de meio RPMI com 5% de SFB e 0,05% de DNase. Então, as orelhas foram picotadas com uma tesoura e maceradas com auxílio de êmbolos

de seringa, para obtenção das células do tecido. A suspensão de células da orelha foi centrifugada e ressuspendida em 1 mL de meio Schneider completo. Estas células foram utilizadas para a análise fenotípica (500 µL), avaliação da carga parasitária (100 µL) e análise de expressão gênica por qPCR (400 µL).

3.8.3 Processamento do linfonodo auricular drenante

O linfonodo auricular drenante foi retirado e colocado em eppendorfs contendo 300 µL de meio Schneider completo, suplementado com 20% de SFB, a 1% de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100U/mL de estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, individualmente, cada linfonodo foi macerado com o auxílio de Pellet Pestle Motor (Kontes) até que o órgão fosse completamente macerado. Feito isso, foi completado o volume até 1 mL. Estas amostras foram utilizadas para avaliação da carga parasitária (100 µL), análise fenotípica (1×10^6) e análise de expressão gênica por qPCR (volume restante).

3.9 Avaliação da carga parasitária na orelha e linfonodo auricular drenante

A carga parasitária nas lesões das orelhas infectadas e no linfonodo auricular drenante foi quantificada pelo método de diluição limitante nos seguintes grupos: (i) animais monoinfectados com *Leishmania* e (ii) animais coinfectados com *Leishmania* e *Plasmodium*, de ambos os desenhos experimentais. O número de animais utilizado por grupo experimental foi de 5-6 camundongos. Após serem retirados e processados, alíquotas de 100 µL da suspensão de células da orelha e do linfonodo auricular drenante foram pipetadas em placa de 96 poços contendo 100 µL de meio Schneider completo com 20% de SFB. Todas as amostras começaram com diluição 1:1 no primeiro poço e para os poços subsequentes a diluição foi feita em série (10x) e em duplicatas. As placas foram armazenadas em estufa à 27°C por até 10 dias e, a partir do 4º dia os poços foram observados em microscópio invertido e identificados os poços que apresentavam crescimento parasitário (poço positivo). Foi realizada a contagem de número de poços positivos para *Leishmania* e o número aproximado de parasitos viáveis presentes originalmente em cada tecido foi determinado pela máxima diluição na qual foram recuperados parasitos, de acordo com a tabela de diluição limitante mostrada a seguir (Tabela 4).

Tabela 4. Método de diluição limitante (número de poços positivos vs número de parasitos por ml).

Número de poço(s) positivo(s)	Número de parasitos/ ml^(*)
1	10
2	20
3	40
4	80
5	160
6	320
7	640
8	1,280
9	2,560
10	5,120
11	10,240
12	20,480
13	40,690
14	81,920
15	163,840
16	327,680
17	655,360
18	1,310,720
19	2,621,440
20	5,242,880
21	10,485,760
22	20,971,520
23	41,943,040
24	83,886,080

(*) Para células ressuspendidas em 1 mL

3.10 Imunofenotipagem das subpopulações de células mieloides e linfoides no baço, orelha e linfonodo auricular drenante

Para a imunofenotipagem das células por citometria de fluxo, as células da orelha (500µL da suspensão celular), do linfonodo e baço (1 x10⁶) foram incubadas em microplacas estéreis de 96 poços de fundo V, com 50 µL de tampão de FACs (PBS 1x suplementado 2% de SFB) contendo anticorpo FcBlock (anti-FcγR III/II (CD16/32)) e anticorpos monoclonais (mAc) específicos para a fenotipagem das células de camundongo. As marcações utilizadas para determinar as subpopulações linfoides e mieloides estão descritas na tabela 5. As leituras foram realizadas no dia do experimento em um citômetro de fluxo FACs Canto II (BD Bioscience) e os dados obtidos foram analisados no programa Flow Jo (TreeStar, Estados Unidos).

Tabela 5. Anticorpos utilizados para fenotipagem das células dos diferentes tecidos.

Linhagem celular	Subpopulação celular	Anticorpo	Fluorocromo	Clone
Linfoide	Linfócitos B	CD45R (B220)	APC	RA3-6B2
		CD3	Percp Cy7	145-2C11
	Linfócitos T	CD4	APC H7	GK1.5
		CD8	PE Cy7	53-6.7
		CD62L	FITC	MEL-14
Mieloide	Monócitos Neutrófilos	CD11b	PeCy7	M1/70
		Ly6C	APC-Cy7	AL-21
		Ly6G	APC	1A8
		CD11c	PerCpCy5.5	HL3
		MHC II	FITC	2G9

*Todos os anticorpos utilizados são da empresa BD Biosciences

3.11 Análise da expressão gênica de citocinas no linfonodo auricular drenante e orelha

Para avaliar a expressão gênica de citocinas produzidas no baço, orelha e linfonodo drenante da orelha, foi empregada a técnica de qPCR para a detecção e quantificação da expressão de mRNA. Para isso, foram escolhidas citocinas como

IFN- γ , TNF- α , Arginase 1, iNOS, TGF- β , IL-10 e IL-12, e testados pelo menos quatro genes de controle endógeno (housekeeping) como GAPDH, 18s, CyC-1 e ATPb-5, (Tabela 6).

Tabela 6. Genes analisados, função do gene e sequências de primers.

Gene	Função do gene	Sequência Primer (5'-3')	Tm (50mM Na⁺) IDT
Atpβ5	Produção de ATP	F:CACTCCAGAGACAGCGTCAGAT R:GGCTAGAGATGGCTCAGAGGTTAA	58,5 57,8
CyC1	Cadeia de transporte de elétrons	F:GAGGCAAGCATAAGACTGGACCAA R:CAACCTGTGCTGTGGCTGACA	59,1 60,3
GAPDH	Enzima da via da glicólise	F: GCCTTCCGTGTTCCCTACC R: CTTACCACCTTCTTGATGTC	59,1 57,9
18S	Subunidade menor do ribossomo	F:GTAACCCGTTGAACCCATT R:CCATCCAATCGGTAGTAGCG	59,8 59,3
IFN-γ	Citocina pró-inflamatória	F: AGGACACAACAAGATGGA R:TTAGTGAGAGTGAACATTACAG	50,7 49,7
IL-10	Citocina reguladora	F:ACAACATACTGCTAACCGACTCCT R:GGCAACCCAAGTAACCCTTAAAGT	57,7 57,4
Arginase 1	Enzima que catalisa a arginina	F: ACAAGACAGGCTCCTTTTCAG R:GGCTTATGGTTACCCTCCCG	57 57,6
iNOS	Enzima para produção de óxido nítrico	F: GTTTGAAACTTCTCAGCCAC R: ACGTTCTCCGTTCTCTTGC	54,3 55
TGF-β	Proteína que controla proliferação, diferenciação das células.	F: ATTCCTGGCGTTACCTTGG R: CCTGTATTCCGTCTCCTTGG	55,0 54,8

Para isso, os tecidos mantidos em trizol foram descongelados e a extração de RNA total foi realizada segundo protocolo do fabricante (Invitrogen) com modificações. No protocolo original a quantidade de reagentes por etapa equivalia a

proporção de 1 mL de trizol para 200 µL de clorofórmio, por exemplo. Como utilizamos 300 µL/500µL de Trizol, essa proporção foi adaptada. Após a realização da extração, a pureza e rendimento da extração foram analisadas em espectrofotômetro (NanoDrop) a 260 nm e 280 nm, usando 1µl de cada amostra. Para sintetizar o cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total, utilizando o sistema de transcrição reversa, baseado no protocolo ImProm-II™ Reverse Transcription System (PROMEGA), descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Reação da Síntese de cDNA.

Etapas	Reagentes	Condições da reação
Tratamento para DNase	RNA	Etapa 1:
	RQ1 DNase 10x Buffer	37° C, 30 min (adicionar 1 µL de stop solution);
	RQ1 DNase enzima	Etapa 2:
	H ₂ O	65° C, 10 min
	OligodT+ Amostras	70 °C, 5 min; gelo, 5 min
Transcrição Reversa	Buffer 5X MgCl ₂ dNTP RNA sin Transcriptase (RT)	25 °C, 5min; 42 °C, 60 min; 70 °C, 15 min; 4 °C

*As reações foram feitas em Termociclador Veriti 96 poços (Applied Biosystems).

Após isso, as amplificações por qPCR foram realizadas em duplicata, utilizando 2 µL de cDNA diluído 1:30 para amostras de orelha ou 1:10 para amostras de linfonodo, por reação. Usou-se a diluição 1:30 no caso do cDNA de orelha visto que houve inibição da reação de qPCR quando as diluições 1:10 foram usadas. As reações foram preparadas misturando o reagente comercial para qPCR (SyberGreen PCR Master Mix, Applied Biosystems), o par de primers de interesse e a amostra de cDNA para um volume final de 10 µL em cada poço de uma placa de 96 poços (MicroAmp® Optical 96-well 0.1mL- Applied Biosystems). As placas foram desenhadas conforme o número de amostras, o controle negativo (branco-H₂O) e a curva padrão. A construção de uma curva padrão é necessária para se calcular a

eficiência da reação. Neste estudo, utilizamos uma curva de 7 pontos, sendo o primeiro ponto uma mistura de 1 µL de cada amostra de cDNA (pool de 14 - 15 µL), que foi diluída seriadamente em fator 5. Após a montagem das placas, as mesmas foram centrifugadas e a reação foi realizada no equipamento *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) na plataforma tecnológica da Fiocruz - PCR em Tempo Real - RJ (RPT09A). As condições da reação estão descritas nas tabelas abaixo:

Tabela 8. Mistura de reação para qPCR

Reagente	Volume para 1 Reação/10 µL
Água milliQ	2,5 µL
Power Syber® Green PCR master Mix	5,0 µL
Primer Forward [0.2mM]	0,25 µL
Primer Reverse [0.2mM]	0,25 µL
cDNA	2 µL
Volume final	10 µL

Tabela 9. Perfil térmico da reação de qPCR

Fase da reação	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Desnaturação inicial	10 min	95 °C
Desnaturação	10 seg	95 °C
Pareamento (“ <i>annealing</i> ”)	20 seg	56°C
Extensão	20 seg	72 °C
Extensão final	2 min	72 °C
Hold		4 °C

*40 ciclos

Tabela 10. Perfil térmico da curva de melting

Tempo (min)	Temperatura (°C)
15 seg	95 °C
1 min	60 °C
30 seg	95 °C
15 seg	60 °C

*1 ciclo

Os dados foram posteriormente analisados através do método de Ct comparativo ($\Delta\Delta C_t$) (PFAFFL, 2006). Os dados são mostrados como relações normalizadas entre a expressão do gene alvo e a média geométrica dos genes de referência.

3.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através de teste T não-pareado no programa GraphPad Prism versão 7.0. Em todos os dados analisados foram considerados estatisticamente significativos os dados que apresentavam $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta secção, optamos por reunir os resultados e discussão de cada desenho experimental com o objetivo de apresentar de uma forma mais organizada para o leitor esses componentes da dissertação. Dessa forma, o item 4.1 mostrará os resultados do desenho experimental A e posteriormente no item 4.2, discutiremos esses resultados. Já nos itens 4.3 e 4.4 serão apresentados e discutidos, respectivamente, os achados referentes ao desenho experimental B.

4.1 Resultados do Desenho experimental A: Impacto da coinfeção com *L. major* em animais previamente parasitados por *P. berghei* ANKA

4.1.1 A coinfeção com *L. major* não altera a sobrevida nem a parasitemia de animais previamente infectados com *P. berghei* ANKA

Para determinar se a resposta imune direcionada ao parasito *L. major* poderia aumentar ou diminuir a resposta frente ao *P. berghei*, levando ao controle ou exacerbação da infecção por este último parasito, analisamos a sobrevida (Figura 9), parasitemia (Figura 10A), peso corporal (Figura 10B), temperatura (Figura 10C) e número total de esplenócitos (Figura 10D) em animais parasitados com *P. berghei* ANKA infectados ou não com *L. major* na orelha (modelo experimental A). Foi observado que a sobrevida dos animais coinfectados (*PbA+Lm*) não foi alterada quando comparada aos animais infectados apenas com *P. berghei* ANKA (*PbA*), morrendo quase todos de malária cerebral entre o 6^o e 9^o dia após a infecção com *Plasmodium* sp (Figura 9).

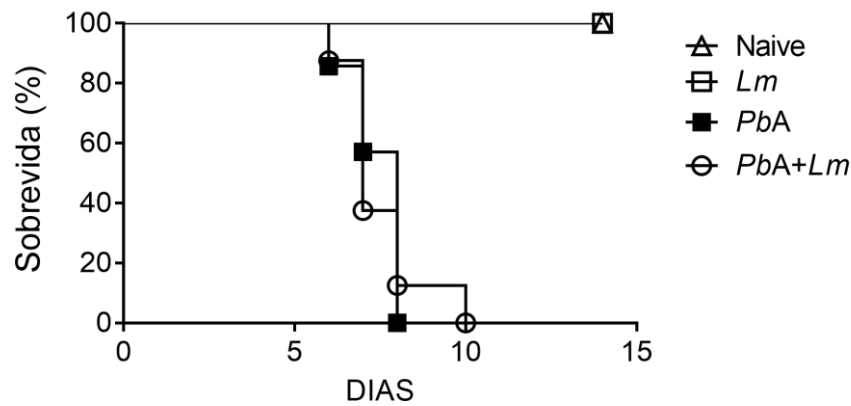


Figura 9. Análise de sobrevivência de animais coinfetados com *Plasmodium berghei* ANKA e *Leishmania major*. Sobrevivência dos diferentes grupos experimentais, de animais não infectados (Naive), infectados com *P. berghei* ANKA (*PbA*), infectados com *L. major* e coinfetados com *P. berghei* ANKA e *L. major* (*PbA + Lm*), N=7-8 animais/grupo. A sobrevivência é expressa em termos de porcentagem de animais que sobreviveram no decorrer da infecção por *PbA*.

Além disso, a inoculação de *L. major* na orelha desses animais não alterou o curso da parasitemia quando avaliados no dia 6 após a infecção com *P. berghei* ANKA (Figura 10A). Tampouco foram observadas diferenças no peso dos animais entre os grupos *PbA* e *PbA+Lm*, incluindo um grupo adicional de animais apenas infectados com *L. major* (*Lm*), quando comparados ao grupo de animais Naive. No entanto, há uma tendência de diminuição do peso corporal em animais infectados com *P. berghei* (*PbA*) e naqueles coinfetados (*PbA+Lm*) (Figura 10B). Por outro lado, foram observadas diferenças significativas na temperatura corporal dos animais dos grupos experimentais Naive ou *Lm* quando comparados ao grupo *PbA*. Os animais infectados com *P. berghei* (monoinfectados ou em coinfecção) apresentaram menor temperatura corporal (Figura 10C). Apesar de não serem observadas diferenças significativas no número de esplenócitos entre os grupos, existe uma tendência de aumento na celularidade desse órgão nos grupos infectados quando comparado aos animais controles (Naive) (Figura 10D).

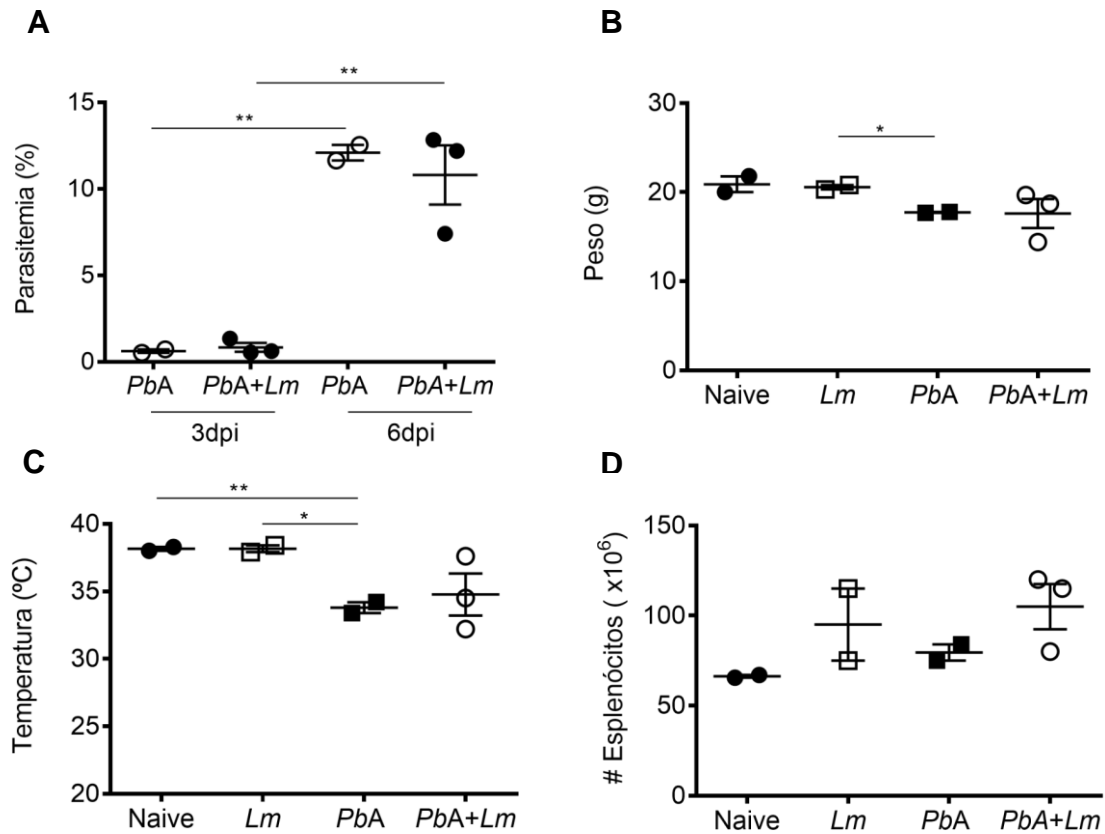


Figura 10. Efeito da infecção com *L. major* em animais previamente parasitados com *P. berghei* ANKA. Camundongos C57BL/6 foram infectados no dia 0 com eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA e coinfetados no 3º dia com formas promastigotas metacíclicas de *L. major*. (A) a parasitemia (*PbA*) dos animais infectados e coinfetados com *P. berghei* foi avaliada nos dias 3 (antes da inoculação de *L. major* na orelha) e 6 nos animais infectados com *P. berghei* e coinfetados, e é expressa em porcentagem de eritrócitos parasitados (GFP⁺). No dia 6 após infecção com *P. berghei* ANKA foram avaliados (B) o peso corporal dos animais expresso em gramas (g); (C) a temperatura corporal expressa em graus centígrados (°C) e (D) o número total de esplenócitos. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *PbA+Lm* (animais coinfetados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

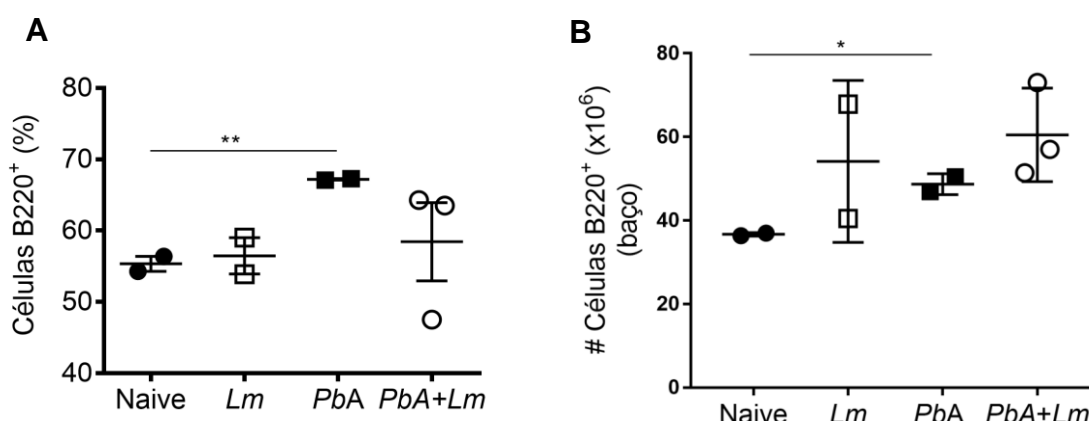
4.1.2 A coinfeção com *L. major* não altera a percentagem de células mieloides nem linfoides no baço de animais parasitados com *P. berghei* ANKA

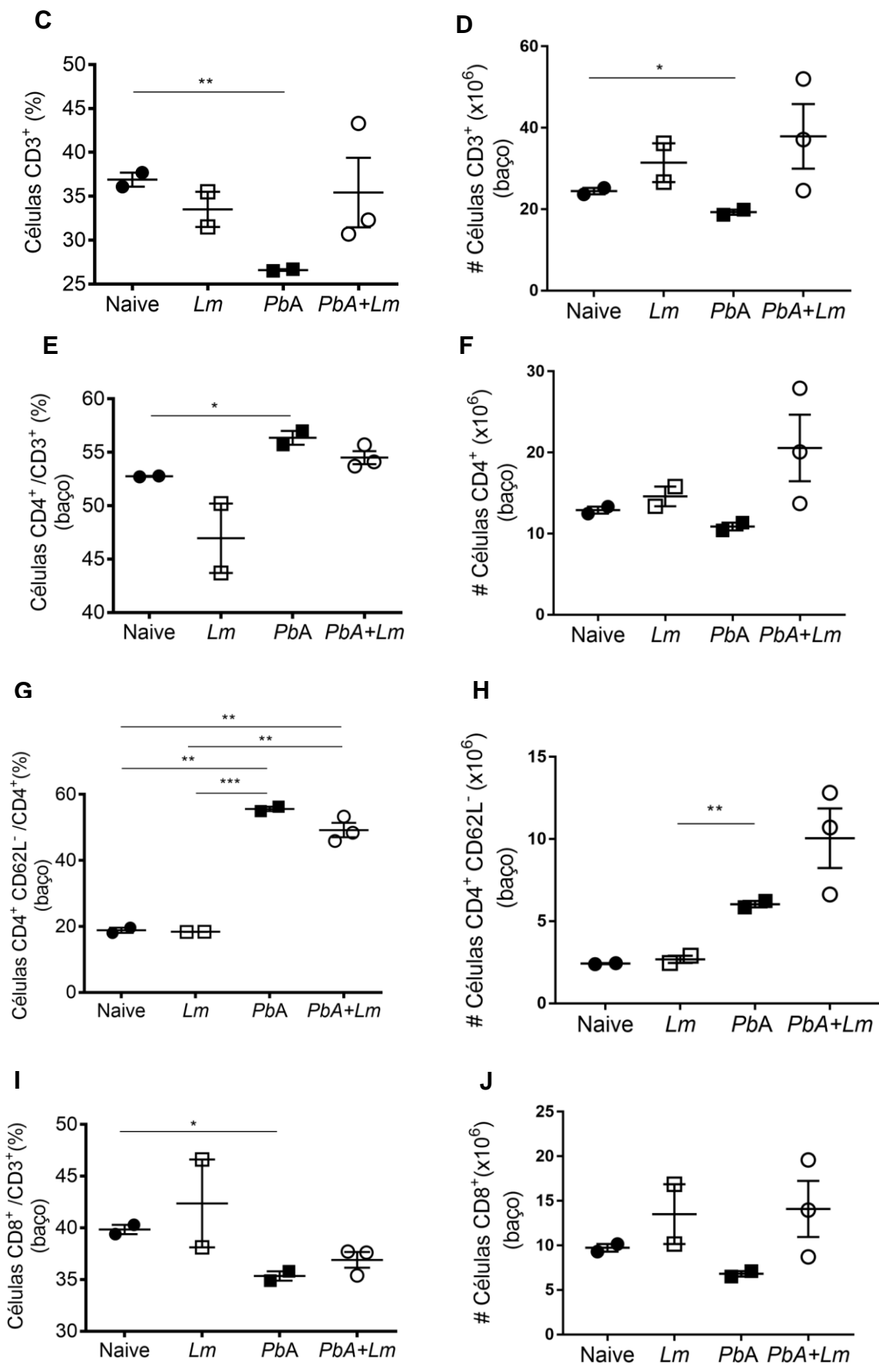
Para verificar a influência da infecção com *L. major* no percentual de células mieloides e linfoides no baço de animais previamente infectados com *P. berghei* ANKA, diferentes subpopulações celulares foram avaliadas por citometria de fluxo.

Apesar dos animais infectados com *P. berghei* ANKA apresentarem um aumento percentual e número total significativo de células B (B220⁺) (Figura 11 A e B) e redução no percentual e número total de células T (CD3⁺) (Figura 11 C e D) quando comparado aos animais controles (grupo Naive), não observamos diferenças entre os grupos *PbA* e *PbA+Lm*.

Nestes ensaios observamos uma tendência de aumento no número total de células T CD4⁺ e TCD8⁺(Figura 11 F e I) quando comparados os grupos *PbA* e *PbA+Lm*, contudo não observamos diferenças percentuais nessas subpopulações (Figura 11 E e J), nos animais infectados com *P. berghei* ANKA e coinfectados com *P. berghei* ANKA e *L. major*.

Destacamos principalmente o aumento significativo no percentual de células T CD4⁺CD62L⁻ (Figura 11 G e H) e T CD8⁺CD62L⁻ (Figura 11 K e L) nos grupos *PbA* e *PbA+Lm* em relação aos grupos Naive e *Lm*. No entanto, a infecção com *L. major* não alterou o percentual dessas células no baço dos camundongos parasitados com *P. berghei* ANKA. Em relação ao número total, vemos uma tendência de aumento de células T CD8⁺CD62L⁻ e T CD4⁺CD62L⁻ quando comparamos os animais coinfectados ao grupo infectado somente com *P. berghei* ANKA (Figura 11 H e L).





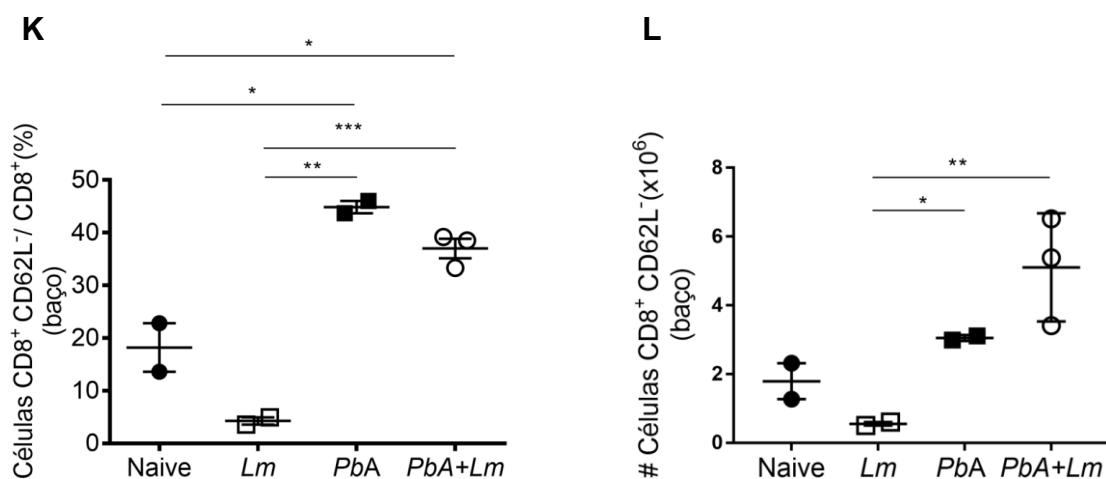


Figura 11. Percentual e número total das subpopulações linfoides presentes no baço dos animais mono e coinfetados com *P. berghei* ANKA e *L. major*. Análise no dia 6 após a infecção com *P. berghei* ANKA do (A) percentual de células B (B220⁺) em relação ao número total de esplenócitos; (B) número total de células B (B220⁺) no baço; (C) percentual de células T (CD3⁺) em relação ao número total de esplenócitos; (D) número total de células T (CD3⁺) no baço; (E) percentual de células T CD4⁺ em relação ao número total de células T (CD3⁺); (F) número total de células T CD4⁺; (G) percentual de células T CD4⁺CD62L⁻ em relação ao número total de células T CD4⁺; (H) número total de células T CD4⁺CD62L⁻ em relação ao número total de células; (I) percentual de células T CD8⁺ em relação ao número total de células T (CD3⁺); (J) número total de células T CD8⁺; (K) percentual de células T CD8⁺CD62L⁻ em relação ao número total de células T CD8⁺; (L) número total de células T CD8⁺CD62L⁻. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *PbA+Lm* (animais coinfetados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

A infecção com *P. berghei* ANKA reduziu o percentual de células mielóides CD11b⁺, e há uma tendência de redução no percentual dessa subpopulação nos animais coinfetados em relação aos animais controles (Figura 12 A e B). Dentro da subpopulação de células CD11b⁺ houve um aumento percentual significativo de neutrófilos (CD11b⁺LyG6⁺Ly6C^{int}) nos grupos *Lm* e *PbA+Lm* em relação ao grupo Naive (Figura 12 C), e de monócitos inflamatórios (CD11b⁺LyG6⁻Ly6C^{hi}) nos grupos *PbA* e *PbA+Lm* em relação aos grupos Naive e *Lm* (Figura 12 E). Não observamos nenhuma alteração no percentual dessas células entre os grupos *PbA* e *PbA+Lm*. O número total de neutrófilos não apresentou diferença entre os grupos (Figura 12 D), enquanto o baço dos animais coinfetados exibiu maior número total de monócitos inflamatórios em relação aos grupos Naive e *Lm* (Figura 12 F).

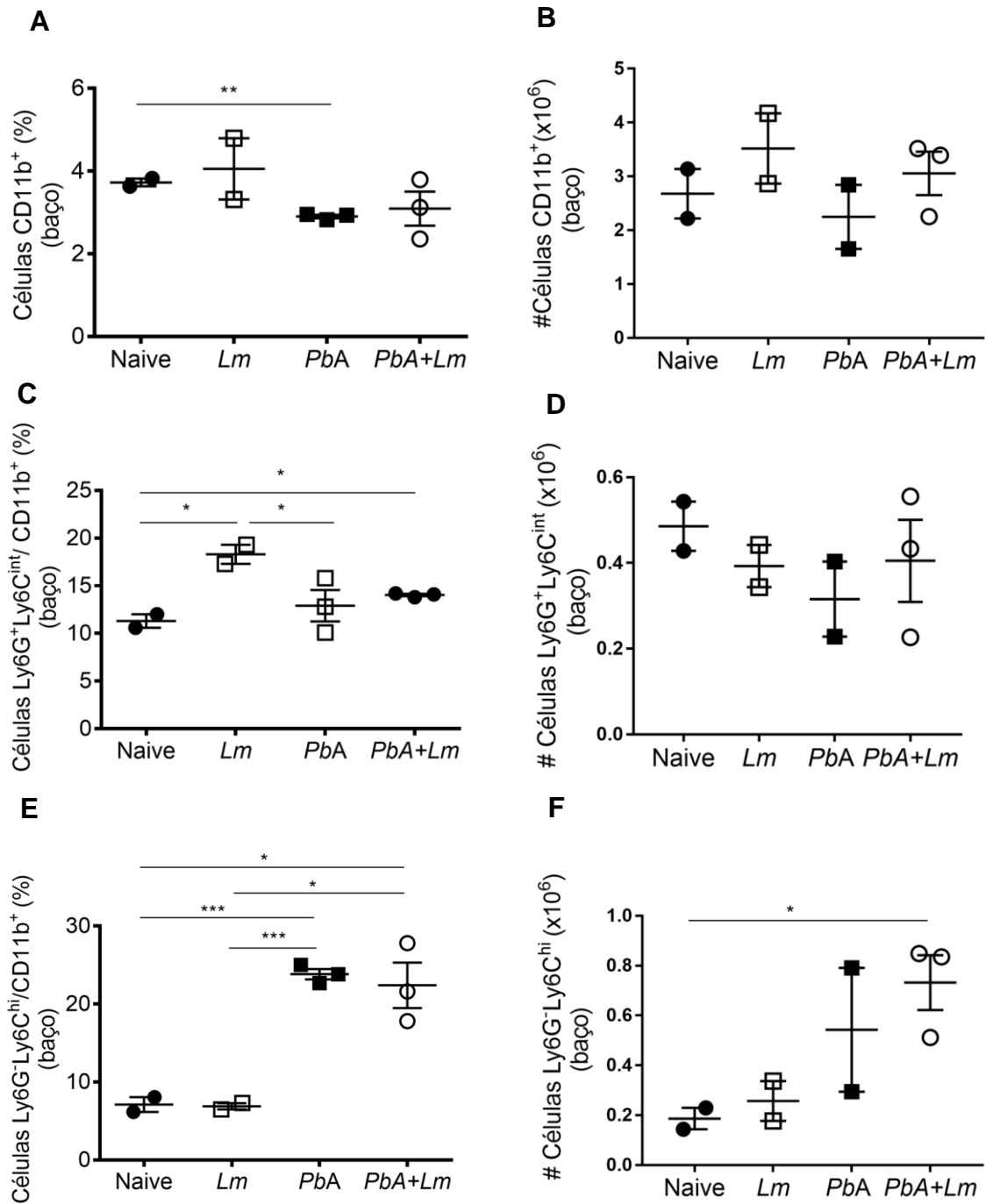


Figura 12. Percentual e número total das subpopulações mieloides presentes no baço dos animais mono e coinfetados com *P. berghei* ANKA e *L. major*. Análise no dia 6 após a infecção com *P. berghei* ANKA do (A) percentual de células mieloides CD11b⁺ em relação ao número total de esplenócitos; (B) número total de células mieloides CD11b⁺; (C) percentual de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) em relação ao número total de células CD11b⁺; (D) número total de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}), (E) percentual de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}) em relação ao número total de células CD11b⁺; (F) número total de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}). Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *PbA+Lm* (animais coinfetados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.1.3 A infecção prévia com *P. berghei* ANKA favorece uma diminuição na carga parasitária no linfonodo de animais coinfectados com *L. major*

Interessantemente, ao passo que a coinfeção com *L. major* não parece modificar a sobrevivência nem a parasitemia observada em animais infectados com *P. berghei*, a infecção prévia com *P. berghei* induz uma diminuição significativa no número de parasitos *L. major* no linfonodo ($p=0,05$) desses animais (Figura 13 A), contudo essa diferença não foi observada no que diz respeito à carga parasitária na orelha desses animais (Figura 13 B).

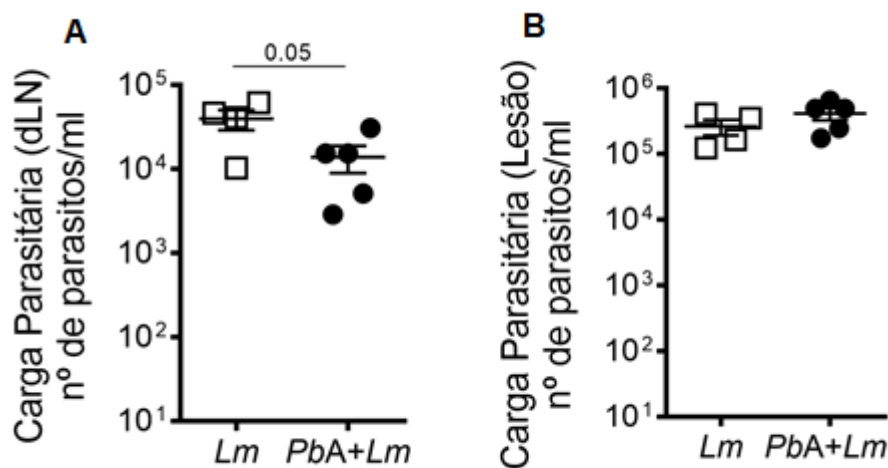


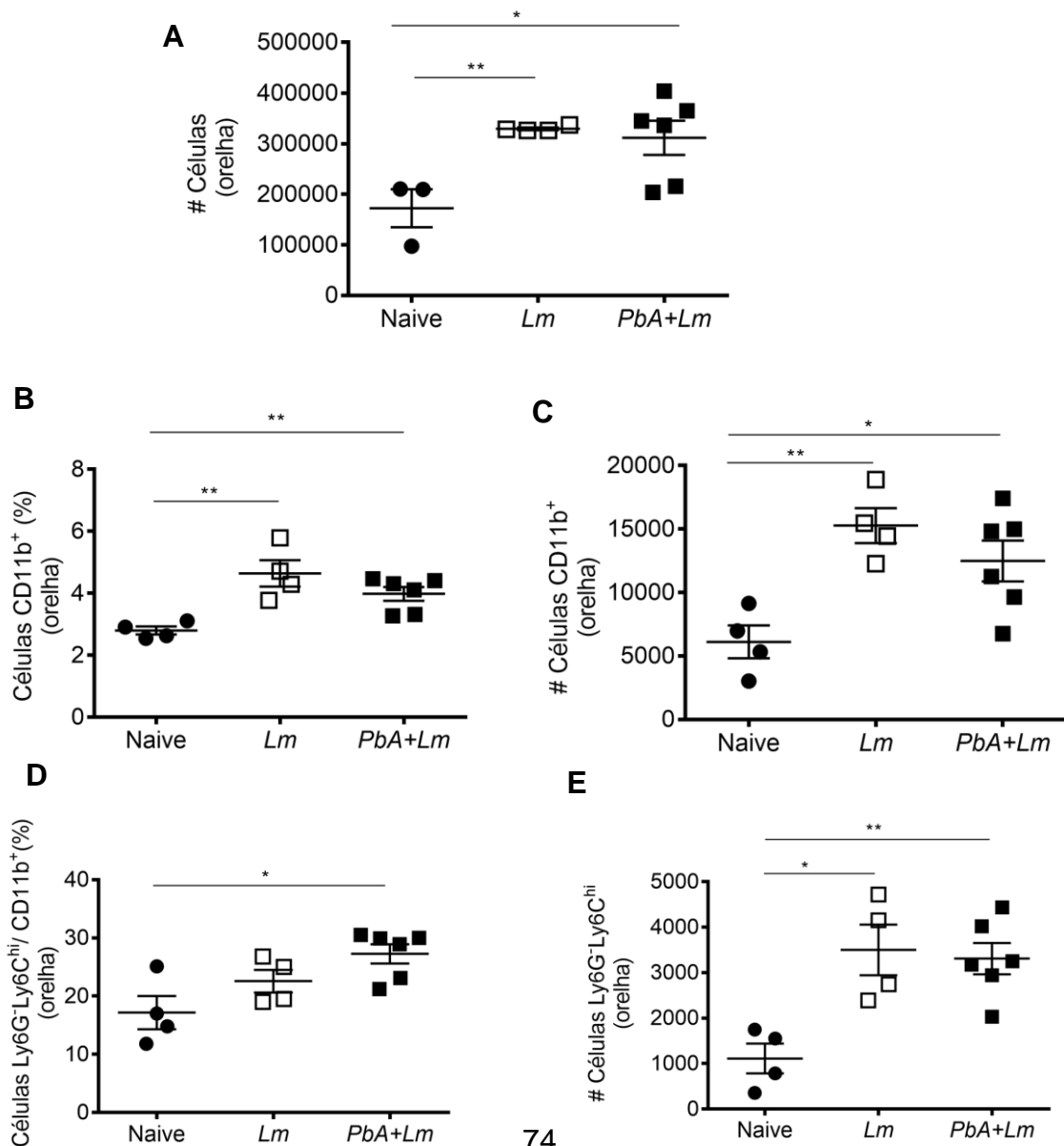
Figura 13. Análise da carga parasitária nos animais inoculados com *L. major* durante o curso da infecção por *P. berghei* ANKA. Carga parasitária no linfonodo drenante (A) e na orelha (B), de animais previamente infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *PbA+Lm* (animais coinfectados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.1.4 Recrutamento de células mielóides para o local de infecção com *L. major* independe da infecção prévia com *P. berghei* ANKA

O recrutamento de células mielóides para a derme em camundongos previamente parasitados com *P. berghei* ANKA e então coinfectados com *L. major* na orelha também foi investigado. Os dados estão expressos com base no

percentual de células (Figuras 14 B, D e F) e o número total das mesmas (Figuras 14 A, C, E e G).

Observamos um aumento no número total de células na orelha (Figura 14 A), no percentual e número total de células mieloides CD11b⁺ (Figuras 14 B e C), neutrófilos (CD11b⁺LyG6⁺Ly6C^{int}) (Figuras 14 D e F) e monócitos inflamatórios (CD11b⁺LyG6⁻Ly6C^{hi}) (Figuras 14 F e G) na orelha dos camundongos infectados com *L. major* e coinfectados com *P. berghei* ANKA e *L. major* em relação aos animais controles. No entanto, a percentagem e número total dessas subpopulações de células mieloides na orelha apresentaram-se similares àquelas observadas em animais apenas infectados com *L. major*, sugerindo que a infecção prévia com *P. berghei* ANKA não modula o recrutamento dessas células para o local de infecção com *L. major*.



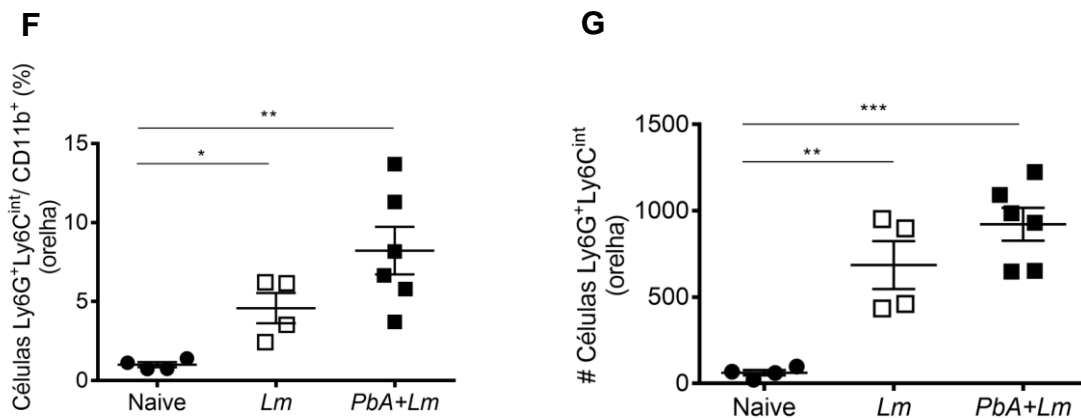


Figura 14. Percentual e número total das subpopulações de células mieloides presentes na orelha dos animais mono e coinfectedados com *P. berghei* ANKA e *L. major*. Análise no dia 6 após a infecção com *P. berghei* ANKA do (A) número total de células na orelha; (B) percentual de células mieloides CD11b⁺ em relação ao número total; (C) número total de células mieloides CD11b⁺ na orelha; (D) percentual de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) em relação ao número total de células CD11b⁺ (E) número total de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) na orelha; (F) percentual de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{hi}) em relação ao número total de células CD11b⁺; (G) número total de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{hi}) na orelha. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *PbA+Lm* (animais coinfectedados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.1.5 A coinfecção com *L. major* não altera os níveis séricos de citocinas no soro de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA

Per se, a infecção com *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 induz altos níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , diretamente relacionadas ao desenvolvimento da MCE (GOMES *et al.*, 2011; MEDANA *et al.*, 1997). Para determinar se a infecção por *L. major* poderia modular os níveis dessas e outras citocinas em animais previamente infectados com o *Plasmodium*, o nível sérico das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-2, IL-6, IL-4, IL-17A foi mensurado nos diferentes grupos experimentais através do kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences). Com este ensaio foram detectadas as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6. Não encontramos diferenças estatísticas nos níveis séricos de IFN- γ e TNF- α entre os animais coinfectedados (*PbA+Lm*) e os animais infectados somente com *Plasmodium* (*PbA*) (Figura 15 A e B). Porém, foram encontradas diferenças significativas entre os animais infectados com *L. major* e os infectados com *P. berghei* ANKA (Figura 15 A e B), com concentrações superiores dessas citocinas nos animais infectados com *PbA*.

Ao avaliarmos a presença das citocinas IL-10 e IL-6, observamos que para IL-10 não há diferença entre os animais coinfetados (*PbA+Lm*) em relação aos animais monoinfectados (*PbA*) ou infectados com *L. major* (Figura 15 C). Contudo, observamos diferenças significativas entre os animais infectados com *L. major* e os infectados com *P. berghei* ANKA (Figura 15 C). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de IL-6 entre os diferentes grupos experimentais (Figura 15 D).

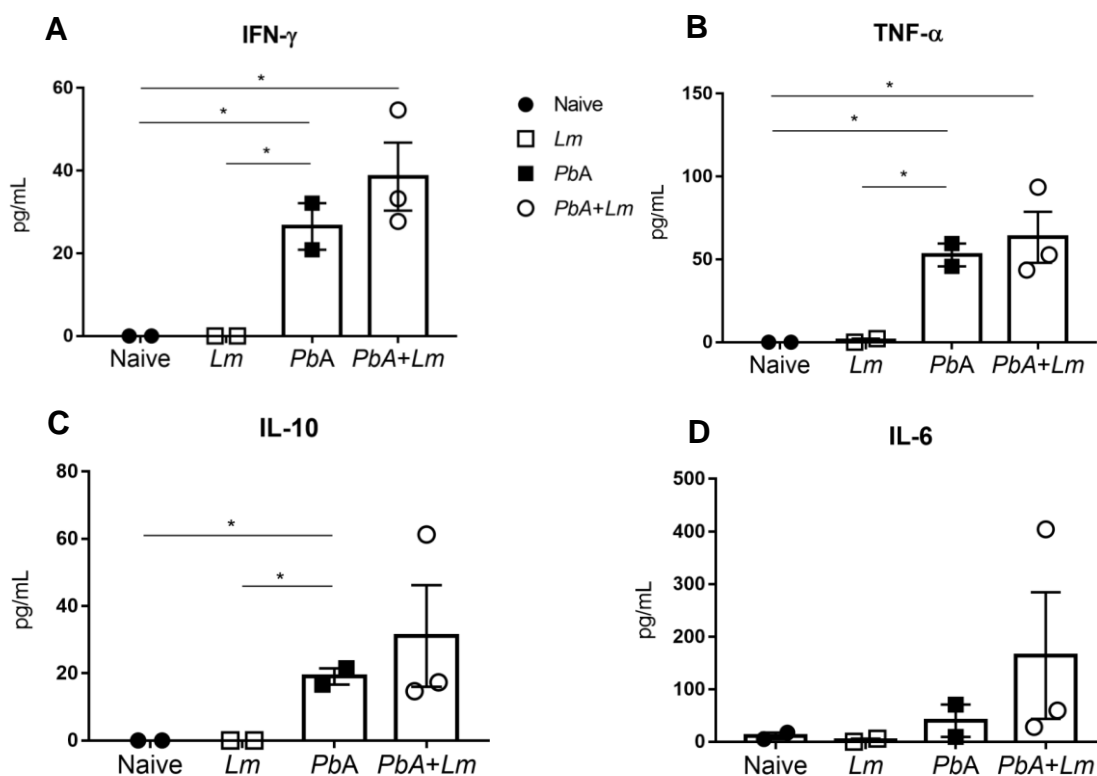


Figura 15. Dosagem de citocinas séricas em animais monoinfectados e coinfetados com *Plasmodium* e *Leishmania*. Análise no dia 6 após a infecção com *P. berghei* ANKA dos níveis séricos das citocinas (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) IL-10 e (D) IL-6 através do kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences). N=2-3 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *Lm+PbA* (animais coinfetados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.2 Discussão dos resultados do desenho experimental A

A coinfeção com *L. major* não melhorou nem piorou a sobrevivência dos animais infectados com *P. berghei* ANKA, tampouco alterou a parasitemia e parâmetros clínicos desses animais, indicando que a resposta suscitada pela infecção com *Plasmodium* é completamente dominante neste modelo de coinfeção.

A fenotipagem das células presentes no baço foi realizada com um número reduzido de animais e novos experimentos são necessários para a melhor interpretação dos dados, já que com um número maior de animais por grupo poderíamos avaliar melhor a coinfeção e quiza, observar um cenário distinto neste desenho experimental. No entanto, estes resultados sugerem que a infecção com *P. berghei* ANKA aumenta no percentual e número total das células B (B220⁺) no baço. A ativação policlonal de linfócitos B no baço e, conseqüente desestruturação deste órgão é descrita no curso da malária (KESWANI & BHATTACHARYYA, 2013). Entretanto, a infecção com *L. major* durante o curso da infecção com *P. berghei* ANKA não promoveu mudança significativa no percentual de células B, células T, nem células mieloides (neutrófilos e monócitos inflamatórios) em relação aos animais infectados apenas com *P. berghei* ANKA. Apenas as células T ativadas (CD4⁺CD62L⁻ e CD8⁺CD62L⁻) parecem apresentar uma pequena redução no seu percentual durante a coinfeção. A infecção com *P. berghei* ANKA induz um aumento na migração de linfócitos T ativados para o sistema nervoso central, ampliando a inflamação, que por sua vez contribui para o rompimento da barreira hematoencefálica. Apesar de termos observado uma redução de células T ativadas em animais coinfectados com *L. major*, essa redução não parece ser suficiente para alterar o curso da malária cerebral.

Quando analisamos as possíveis conseqüências da infecção prévia com *P. berghei* ANKA nos primeiros dias após inoculação de *L. major* não observamos lesão cutânea e alteração da carga parasitária na derme. No entanto, observamos que a carga parasitária no linfonodo auricular drenante apresentou-se menor nos animais previamente parasitados com *P. berghei* ANKA em relação aos animais inoculados apenas com *L. major*. Essa redução da carga parasitária no dLN não está correlacionada com o maior ou menor recrutamento de células mieloides para o local de infecção, já que não observamos diferenças no percentual e no número total dessas células entre os animais mono e coinfectados. Não podemos, entretanto,

destacar a hipótese de que variações no número dessas células tenham ocorrido no sítio de infecção por *L. major* em momentos que antecederam ao dia escolhido para análise e que alterações no dLN tenham acontecido.

O IFN- γ e TNF- α possuem grande destaque na patógenese da malária cerebral observada no modelo experimental de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA, agindo como mediadores chave da resposta imune inflamatória (GOMES *et al.*, 2011; KING & LAMB, 2015). Assim, no momento da coinfeção com *L. major*, este encontra um ambiente altamente pró-inflamatório que poderia estar promovendo a ativação de células da imunidade inata e o controle da carga parasitária no dLN. Para avaliar nossa hipótese, buscamos analisar as concentrações de diferentes citocinas no soro dos animais dos grupos experimentais (controle, mono infectados e coinfectados).

Ao analisarmos os dados, observamos que a coinfeção com *L. major* não modifica significativamente os níveis séricos das citocinas IFN- γ e TNF- α em relação aos animais infectados somente com *PbA*. Este dado explicaria, pelo menos parcialmente, o porquê de não observarmos diferenças no curso da malária cerebral quando os animais são coinfectados com *L. major*. Mas ao avaliarmos as infecções isoladamente, observamos que as concentrações dessas citocinas são significativamente maiores no grupo coinfectado em relação ao grupo *Lm*. Estes dados corroboram nossa suposição que a forte resposta pró-inflamatória induzida pela infecção com *Plasmodium* cria um ambiente propício para o controle da proliferação de *Leishmania*, favorecendo a diminuição da carga parasitaria no linfonodo auricular drenante, através da ativação de macrófagos que irão destruir os parasitos intracelulares, por meio da produção de radicais de oxigênio e nitrogênio (KROPF *et al.*, 2004).

A IL-10 é uma importante citocina reguladora da resposta imune. Em animais parasitados com *Leishmania*, esta citocina é encontrada em baixas concentrações (semelhante ao grupo Naïve) e ampliada pela infecção por *P. berghei* ANKA. Em animais coinfectados observamos a presença dessa citocina em nível similar ao encontrado nos animais infectados com *P. berghei* ANKA. A forte resposta pró-inflamatória observada em animais infectados com *P. berghei* ANKA levaria à produção de níveis também elevados de citocinas anti-inflamatórias na tentativa de recuperar a homeostase do sistema. Um ambiente onde prevaleça IFN- γ e TNF- α induz a polarização das células T para um perfil Th1, enquanto a diferenciação para

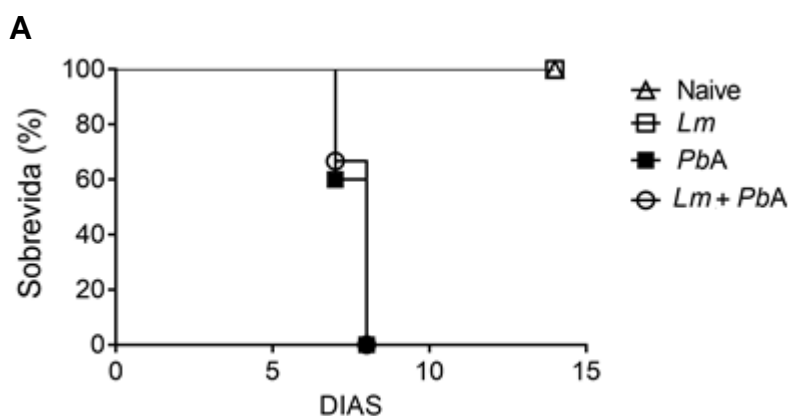
linfócitos do tipo Th2, que sintetizam citocinas como IL-4 e IL-10, associadas à suscetibilidade à infecção por *L. major*, são suprimidas pelo ambiente pró-inflamatório precedente.

Em relação a IL-6, não observamos diferenças significativas quando comparados os grupos experimentais. Esta citocina atua no sistema nervoso central mais especificamente no hipotálamo, órgão responsável pela termorregulação, ocasionando febre, sintoma clássico da malária humana. Porém, na infecção murina, a ação dessa citocina no hipotálamo resulta em hipotermia ao invés de febre (LEON, 2002; UTSUYAMA & HIROKAWA, 2002). Assim como a esplenomegalia, a hipotermia em camundongos é um indicador da forma grave da malária (GOMES *et al.*, 2011). A hipotermia, em nosso estudo, observada nos animais coinfected parece ser decorrente da infecção prévia com o *Plasmodium* sp.

4.3 Resultados do desenho experimental B: Impacto da coinfeção com *P. berghei* ANKA em animais previamente parasitados com *L. major*

4.3.1 Animais previamente parasitados com *L. major* desenvolvem malária cerebral após infecção com *P. berghei* ANKA

No desenho experimental B (Figura 7), os animais foram inoculados na orelha com *L. major* e infectados com *P. berghei* ANKA no 14º ou 28º dia após infecção com *Leishmania*. Observamos que todos os animais parasitados com *L. major* e posteriormente infectados com *P. berghei* ANKA desenvolveram malária cerebral e morreram entre os dias 6 e 9 após infecção, independente se essa infecção ocorreu no início (Figura 16 A) ou mais tardiamente (Figura 16 B) no curso da infecção por *L. major*.



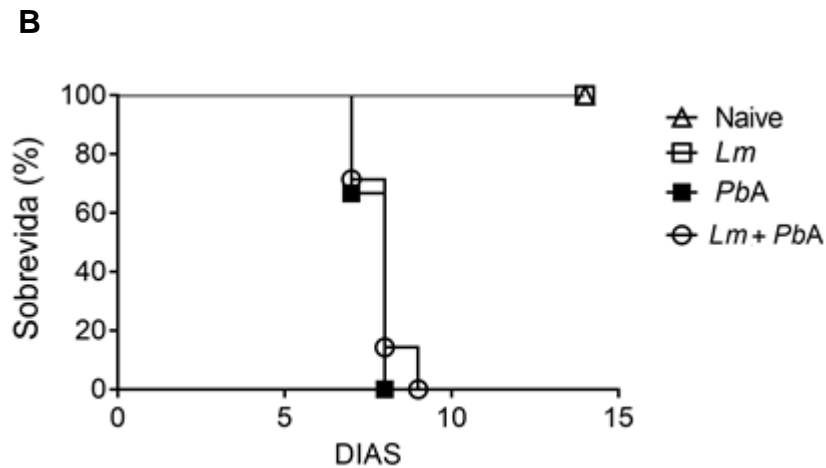


Figura 16. Análise de sobrevivência de animais coinfetados com *L. major* e *P. berghei* ANKA. Sobrevivência dos animais dos diferentes grupos experimentais: não infectados (Naive), infectados com *L. major* (*Lm*), infectados com *P. berghei* ANKA (*PbA*), e coinfetados com *P. berghei* ANKA no 14º dia (A) ou 28º dia (B) após a infecção com *L. major* (*Lm+PbA*), N=7-8 animais/grupo. A sobrevivência é expressa em termos de porcentagem de animais que sobreviveram no decorrer da infecção por *PbA*.

4.3.2 A infecção prévia com *L. major* não altera o curso da infecção com *P. berghei* ANKA

Em seguida analisamos a parasitemia, peso corporal, temperatura e número total de esplenócitos (Figura 17) em animais parasitados com *L. major* e posteriormente (no 14º dia após a infecção) inoculados ou não com *P. berghei* ANKA. A infecção prévia com *L. major* não alterou o curso da parasitemia quando avaliados nos dias 4 e 6 após a infecção com *P. berghei* ANKA em relação aos animais infectados apenas com *P. berghei* ANKA (Figura 17 A). No entanto, foram observadas diferenças significativas no peso (Figura 17 B) e temperatura corporal (Figura 17 C) entre os grupos. O peso e temperatura foram menores nos grupos *PbA* e *Lm+PbA* quando comparados ao grupo Naive e *Lm* (Figura 17 B e C). O número total de esplenócitos aumentou nos grupos *PbA* e *Lm+PbA* quando comparado aos animais controles (Naive) e o grupo de animais coinfetados (*Lm+PbA*) apresentou menor celularidade no baço quando comparado ao grupo *PbA* (Figura 17 D).

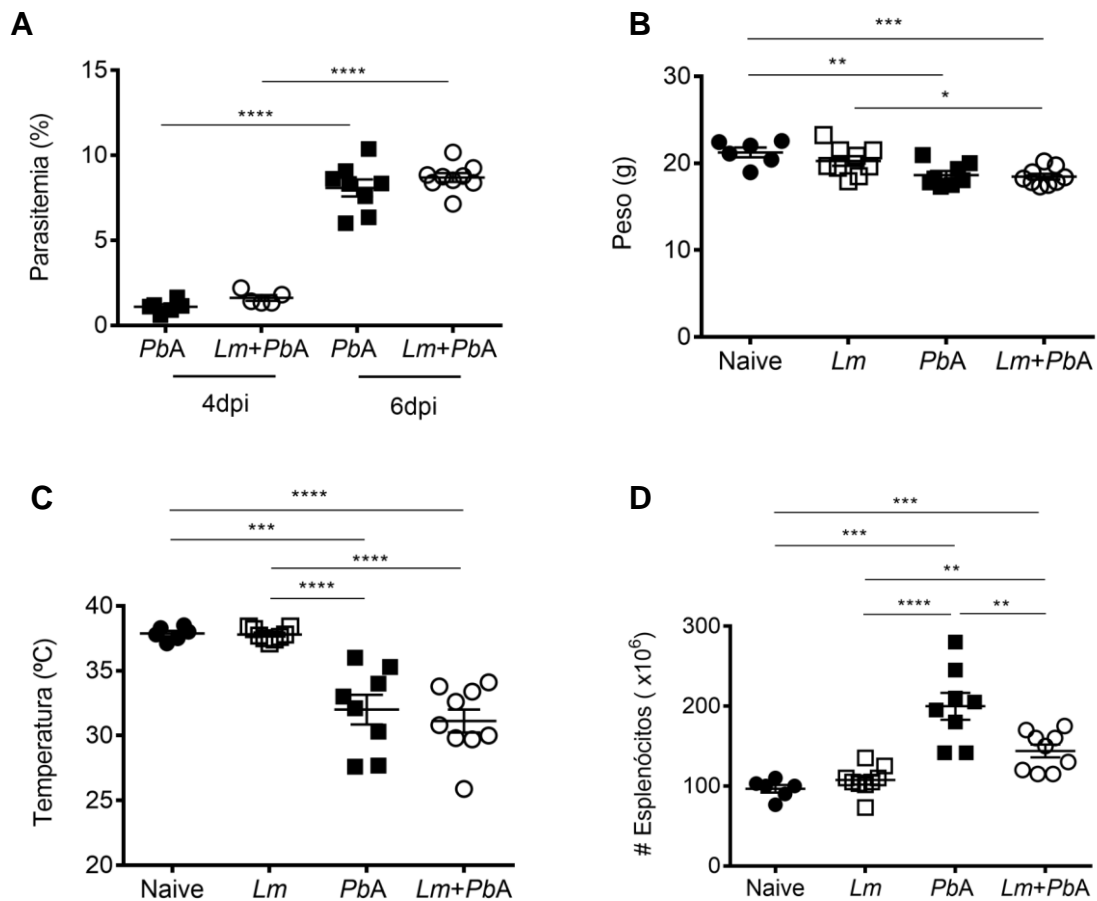


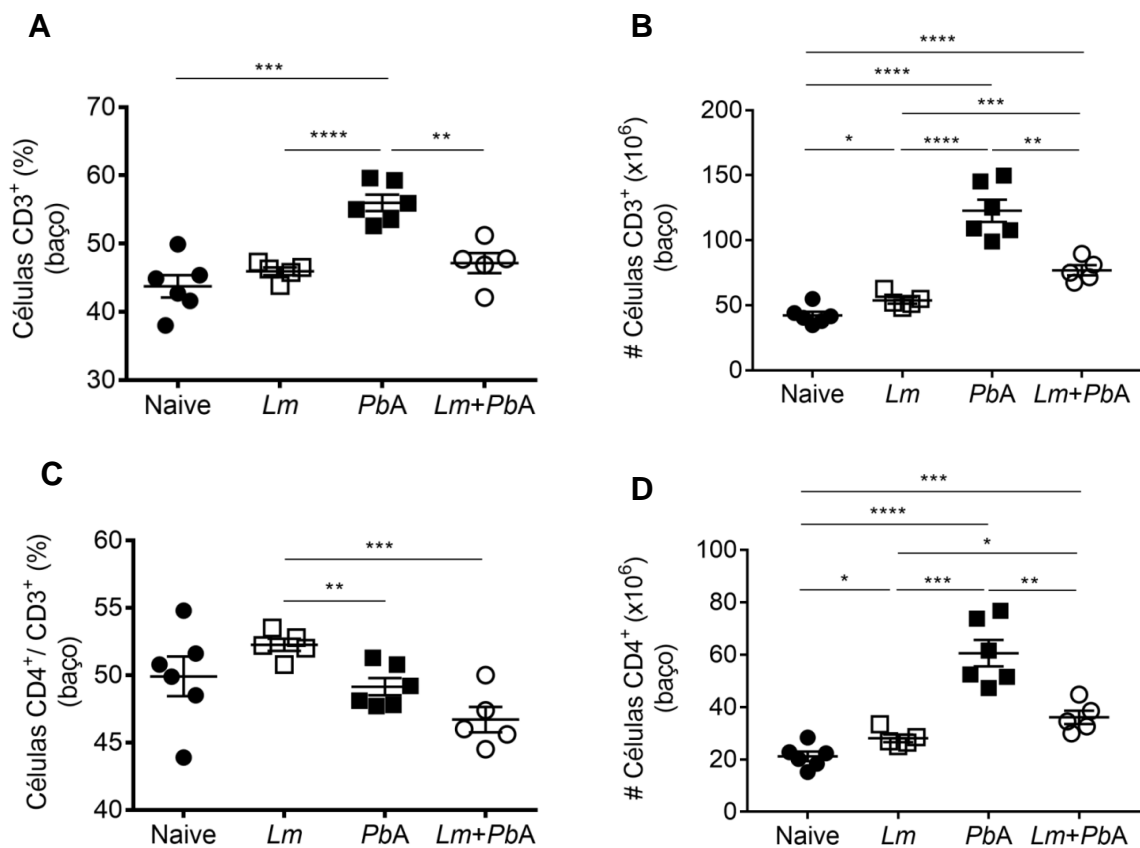
Figura 17. Efeito da coinfeção com *P. berghei* ANKA em animais previamente parasitados com *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram infectados no dia 0 com formas promastigotas metacíclicas de *L. major* e coinfectados no 14^o dia com eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA. (A) a parasitemia foi medida nos dias 4 e 6 após a infecção com *P. berghei* ANKA e é expressa pela porcentagem de eritrócitos parasitados (GFP⁺). No dia 6 após infecção com *P. berghei* ANKA foram avaliados (B) o peso corporal dos animais expresso em gramas (g); (C) a temperatura corporal expressa em graus centígrados (°C) e (D) o número total de esplenócitos. N=7-8 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *Lm+PbA* (animais coinfectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.3 A coinfeção com *P. berghei* ANKA altera a porcentagem e o número total de células linfoides e mieloides no baço de animais previamente parasitados com *L. major*

Para avaliar a influência da infecção com *P. berghei* ANKA no recrutamento de células mieloides e linfoides no baço de animais previamente parasitados com *L. major*, diferentes subpopulações celulares foram avaliadas por citometria de fluxo. Em relação às células T (CD3⁺), verificamos que a infecção com *P. berghei* ANKA

ampliou o percentual e o número total de células T no baço em relação aos animais controle e o grupo *Lm*, enquanto que a coinfeção com *L. major* reduziu o percentual e número total das mesmas quando comparado aos animais infectados com *P. berghei* ANKA (Figura 18 A e B). A análise percentual de células T CD4 e CD8 em relação ao total de células T CD3 demonstrou que há uma redução percentual de células T CD4⁺ e, conseqüentemente, aumento de células T CD8⁺ nos grupos *PbA* e *Lm+PbA* em relação aos animais infectados com *L. major* (Figura 18 C e F). No entanto, o número total de células T CD4 aumentou durante a infecção com *L. major* e, de forma mais pronunciada, na infecção por *P. berghei* ANKA em relação aos animais controles. Não foi observada a expansão de células T CD8⁺ nos animais infectados com *L. major*. Já os animais coinfectados apresentaram maior número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em relação aos grupos Naive e *Lm* e, redução desses valores quando comparados ao grupo *PbA* (Figura 18 D e H).

Verificamos também um aumento significativo no percentual e número total de células T CD4⁺CD62L⁻ e CD8⁺CD62L⁻ nos grupos *PbA* e *Lm+PbA* em relação aos grupos Naive e *Lm* (Figuras 18 E-F e I-J).



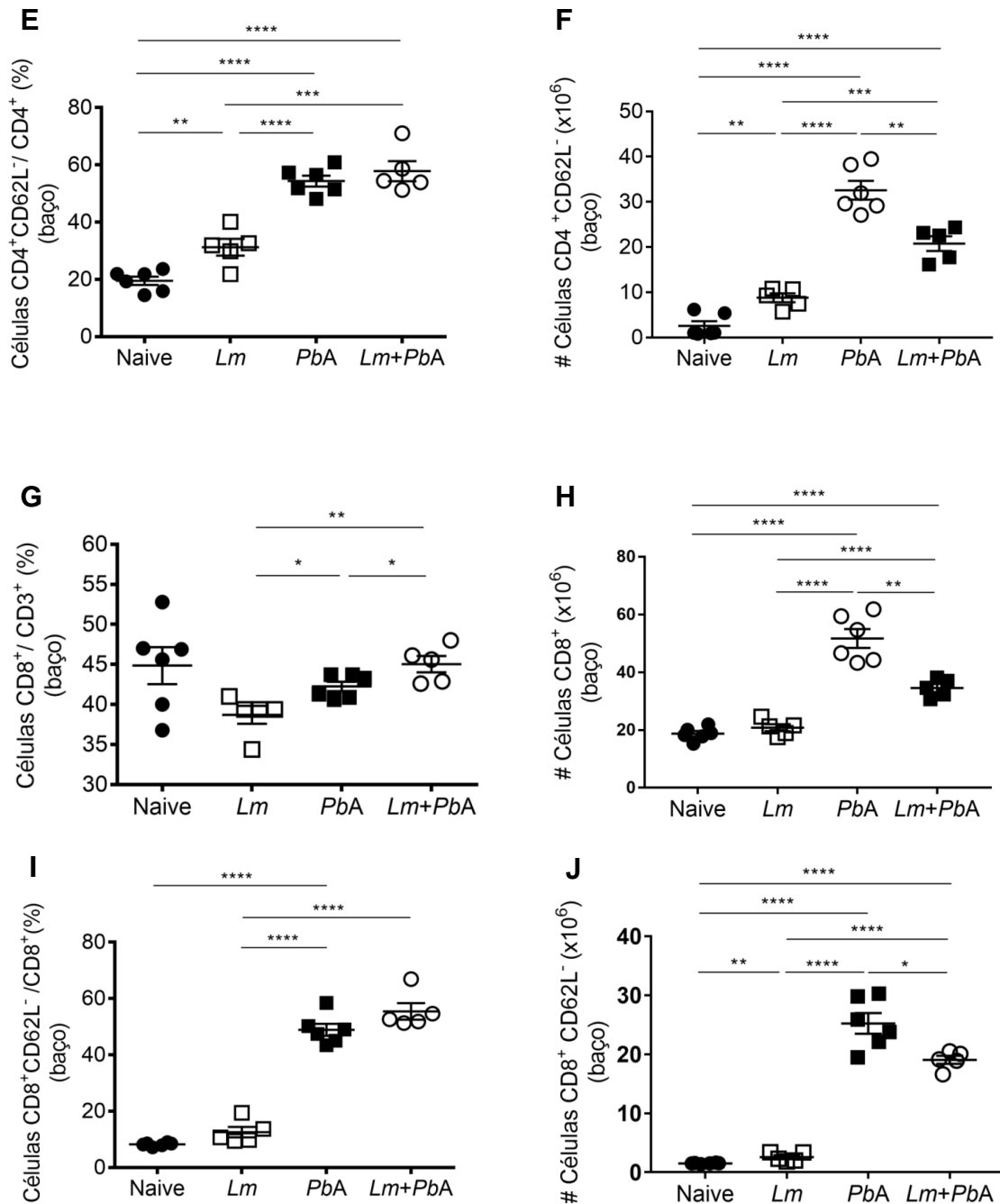


Figura 18. Percentual e número total das subpopulações de células linfoides presentes no baço dos animais mono e coinfetados com *L. major* e *P. berghei* ANKA. Avaliação no 20^o após a infecção com *L. major* do (A) percentual de células T (CD3⁺) em relação ao número total de esplenócitos; (B) Número total de células T (CD3⁺) no baço; (C) percentual de células T CD4⁺ em relação ao número total de células T (CD3⁺); (D) Número total de células T CD4⁺ no baço; (E) percentual de células T CD8⁺ em relação ao número total de células T (CD3⁺); (F) Número total de células T CD8⁺ no baço; (G) percentual de células T CD4⁺CD62L⁻ em relação ao número total de células T CD4⁺; (H) Número total de células T CD4⁺CD62L⁻ no baço; (I) percentual de células T CD8⁺CD62L⁻ em relação ao número total de células T CD8⁺; (J) Número total de células T CD8⁺CD62L⁻ no baço. N=7-8 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *Lm+PbA* (animais coinfetados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

Em relação às células mieloides, a coinfeção com *P. berghei* ANKA parece ter uma tendência de redução percentual (Figura 19 A), mas não em número total (Figura 19 B) nas células CD11b⁺ em relação ao grupo *Lm*. Dentro das subpopulações de células CD11b⁺, houve redução do percentual e número total de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) no grupo *Lm+PbA* em relação ao grupo infectado somente com *Lm* (Figura 19 C e D). Houve aumento no percentual e no número total de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}) no grupo *Lm+PbA* em relação aos grupos Naive e *Lm* (Figura 19 E e F).

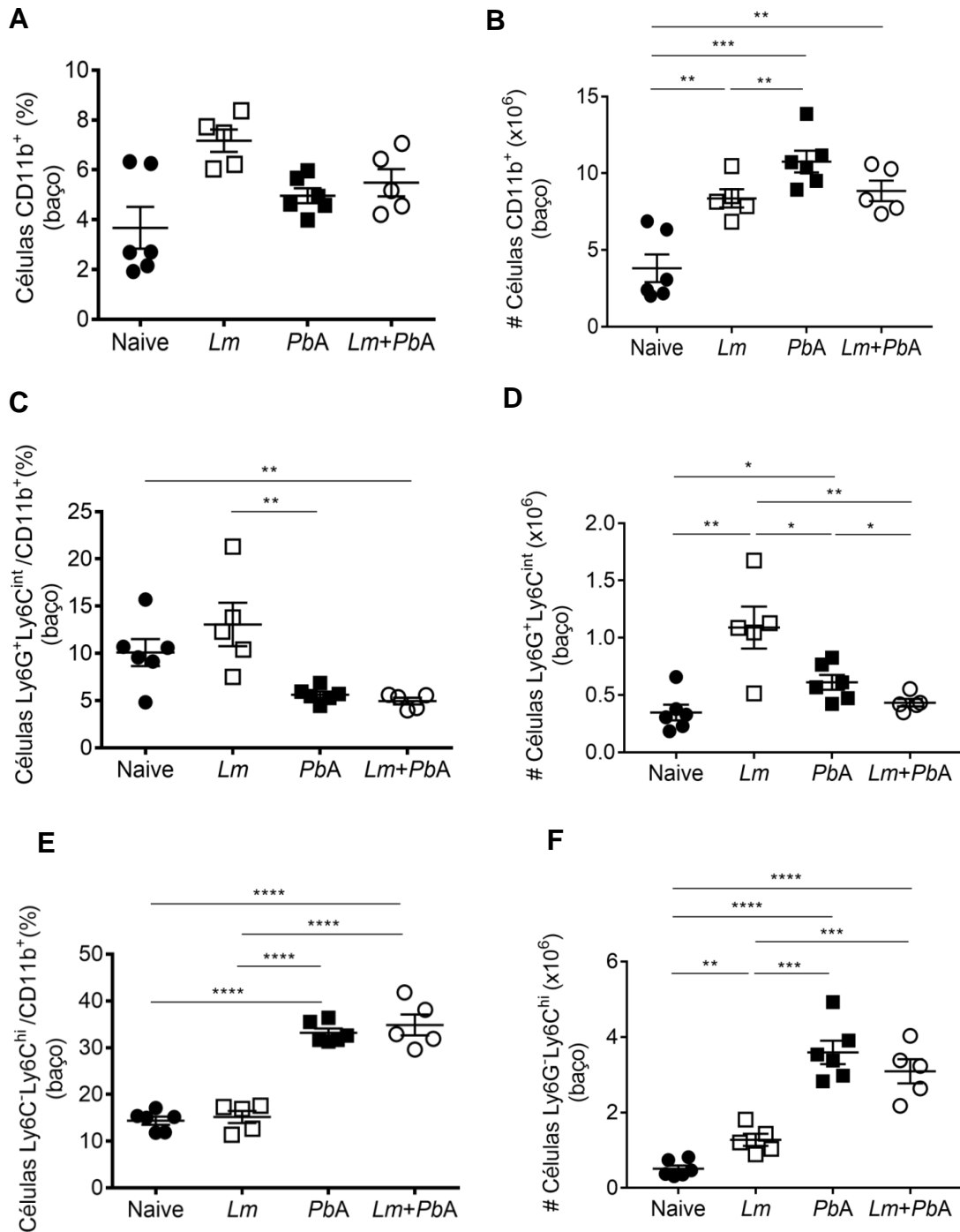


Figura 19. Percentual e número total das subpopulações de células mieloides presentes no baço dos animais mono e coinfectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA. Avaliação no 20^o após a infecção com *L. major* do (A) percentual de células mieloides CD11b⁺ em relação ao número total de esplenócitos; (B) número total de células CD11b⁺ no baço; (C) percentual de neutrófilos (CD11b⁺LyG6⁺Ly6C^{int}) em relação ao número total de células CD11b⁺; (D) Número total de neutrófilos (CD11b⁺LyG6⁺Ly6C^{int}) no baço; (E) percentual de monócitos inflamatórios (CD11b⁺LyG6⁺Ly6C^{hi}) em relação ao número total de células CD11b⁺; (F) Número total de monócitos inflamatórios (CD11b⁺LyG6⁺Ly6C^{hi}) no baço. N=7-8 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *Lm+PbA* (animais coinfectados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.4 A infecção com *P. berghei* ANKA altera o curso da lesão em camundongos com leishmaniose cutânea

Para determinar se a resposta imune direcionada ao parasito *P. berghei* ANKA poderia aumentar ou diminuir a resposta frente à *Leishmania*, levando ao controle ou exacerbação da infecção com este último parasito, camundongos parasitados com *L. major* na orelha (14^o ou 28^o dia de infecção) foram infectados com *P. berghei* ANKA e a lesão cutânea foi acompanhada todos os dias da semana. No primeiro experimento os animais foram infectados com *P. berghei* ANKA no 28^o dia após infecção com *L. major*. Observamos que o grupo de camundongos coinfectados (*Lm+PbA*) apresentou menor espessura da lesão em relação ao grupo *Lm* (Figura 20 A) 7 dias após infecção com *P. berghei* ANKA. O declínio da espessura da lesão pôde ser observado a partir do 6^o dia após a infecção, porém sem diferenças significativas. Mas essa regressão é mais acentuada e significativa estatisticamente no 7^o e no 8^o dia após a infecção com *P. berghei* ANKA (Figura 20 B-D). A redução na lesão da orelha dos animais coinfectados em relação aos animais monoinfectados com *L. major* também foi observada após a infecção com *P. berghei* ANKA no 14^o dia do curso da infecção por *L. major* (Figura 21).

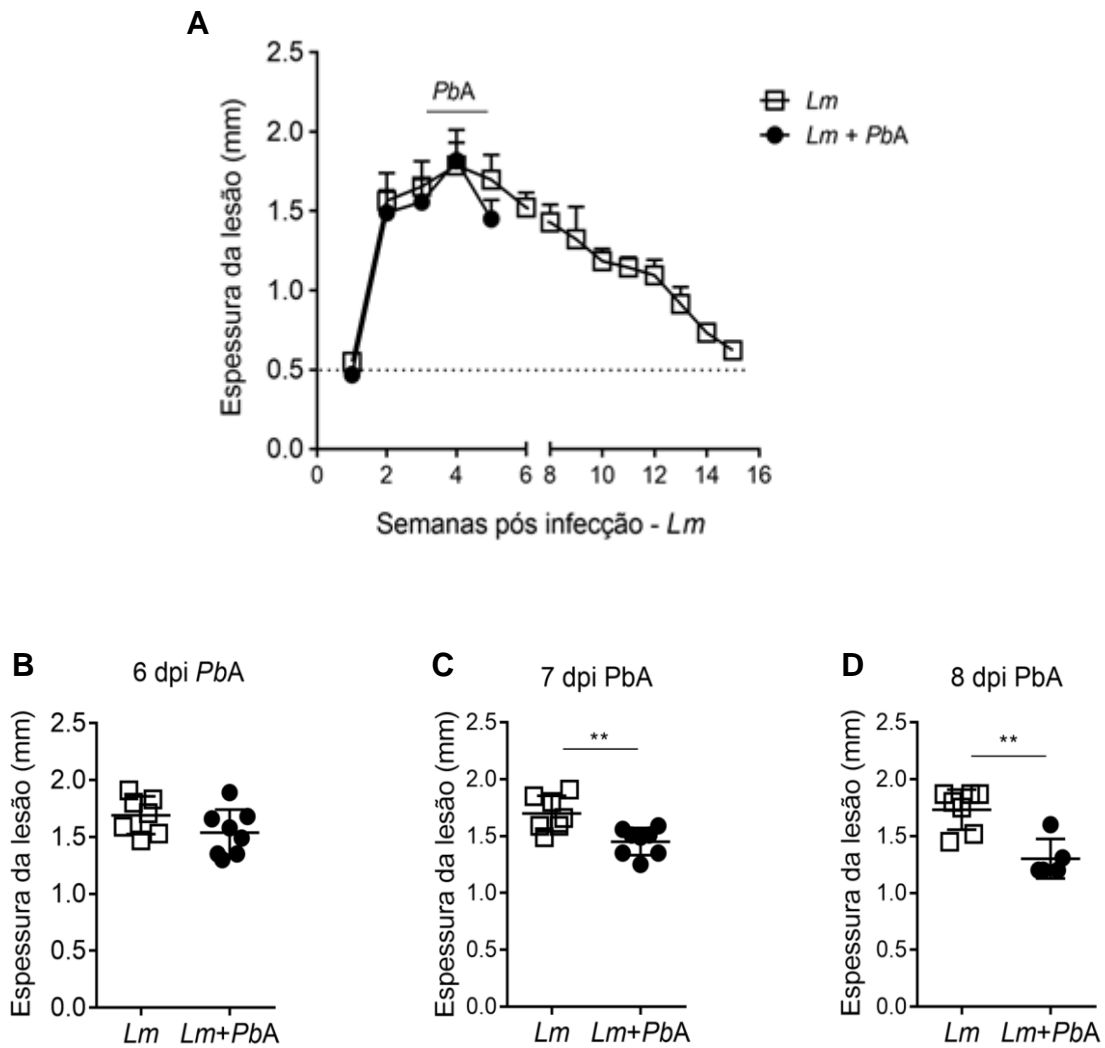


Figura 20. Efeito da infecção com *P. berghei* ANKA no desenvolvimento da lesão cutânea em animais previamente infectados com *L. major*. No 28º dia do curso da infecção com *L. major*, camundongos foram inoculados ou não com *P. berghei* ANKA. (A) Comparação da espessura da lesão em semanas após a infecção; comparação da espessura da lesão (mm) no (B) 6º dia; (C) 7º dia e (D) 8º dia após infecção com *P. berghei* ANKA. N=7-8 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*) e *Lm+PbA* (animais coinfetados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

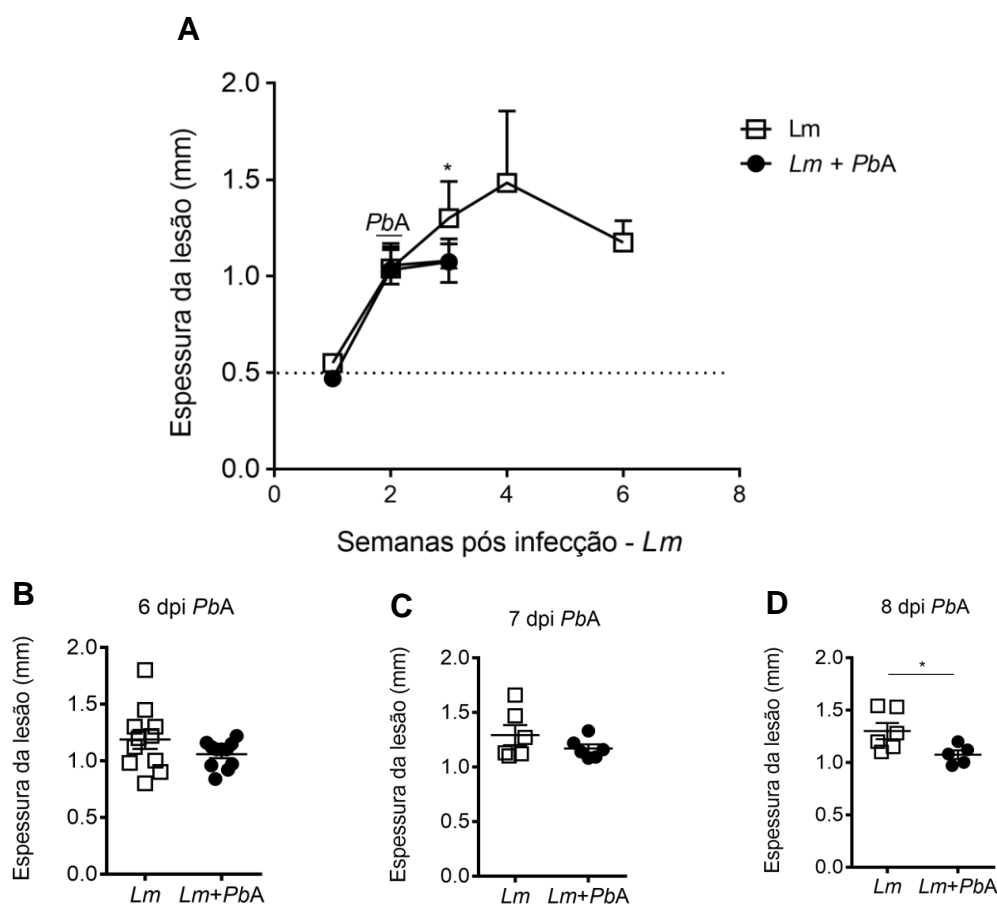


Figura 21. Efeito da coinfeção com *P. berghei* ANKA no desenvolvimento da lesão cutânea em animais previamente infectados com *L. major*. No 14^o dia do curso da infecção com *L. major*, camundongos foram inoculados ou não com *P. berghei* ANKA. (A) Comparação da espessura da lesão em semanas após a infecção; comparação da espessura da lesão (mm) no (B) 6^o dia; (C) 7^o dia e (D) 8^o dia após infecção com *P. berghei* ANKA. N=7-8 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*) e *Lm+PbA* (animais coinfectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.5 A coinfeção com *P. berghei* ANKA favorece uma diminuição na carga parasitária na derme de animais previamente infectados com *L. major*

Apesar da coinfeção com *P. berghei* ANKA em animais previamente infectados com *L. major* não modificar o curso da infecção com *P. berghei* ANKA, observamos diferenças no curso da infecção com *L. major*. Além da redução na lesão cutânea nos animais coinfectados (Figura 20 e 21) verificamos uma redução significativa na carga parasitária na orelha desses animais (Figura 22 A), porém não

observamos diferenças na carga parasitária linfonodo auricular drenante (Figura 22 B).

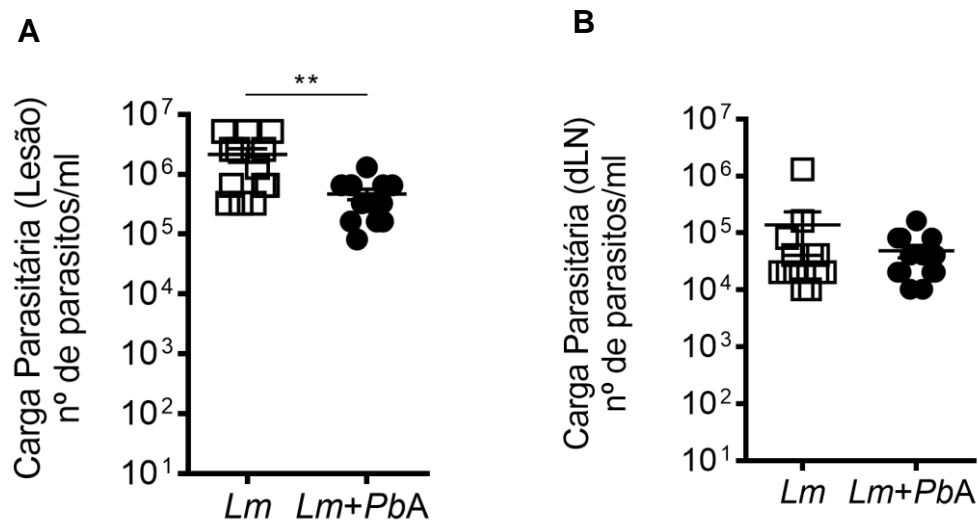


Figura 22. Análise da carga parasitária nos animais inoculados com *P. berghei* ANKA durante o curso da infecção por *L. major*. Camundongos foram inoculados ou não com *P. berghei* ANKA no 14^o dia e analisados no 20^o dia do curso da infecção com *L. major*. Carga parasitária na orelha (A) e no linfonodo auricular drenante (B) de animais infectados com *L. major* (*Lm*) e coinfetados (*Lm+PbA*). Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*) e *Lm+PbA* (animais coinfetados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). N=10-14 animais/grupo. Dados compilados de dois experimentos independentes. Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.6 O recrutamento de células linfoides para o local da infecção com *L. major* diminui em animais coinfetados

Além disso, avaliamos as subpopulações de células linfoides na lesão (orelha) dos grupos *Lm* e *Lm+PbA*. A partir da análise por citometria de fluxo, contemplamos que camundongos coinfetados (*Lm+PbA*) apresentaram menor percentual e número total de células T CD3⁺ quando comparado ao grupo monoinfetado (*Lm*) (Figura 23 A e B). Todas as células T presentes na orelha após infecção são células ativadas e recrutadas. Não foram observadas diferenças no percentual das células T CD4⁺CD62L⁻ e CD8⁺CD62L⁻ entre os grupos *Lm* e *Lm+PbA* (Figura 23 C e E). Porém, os animais coinfetados apresentaram menor número dessas células quando comparados ao grupo *Lm* (Figura 23 D e F).

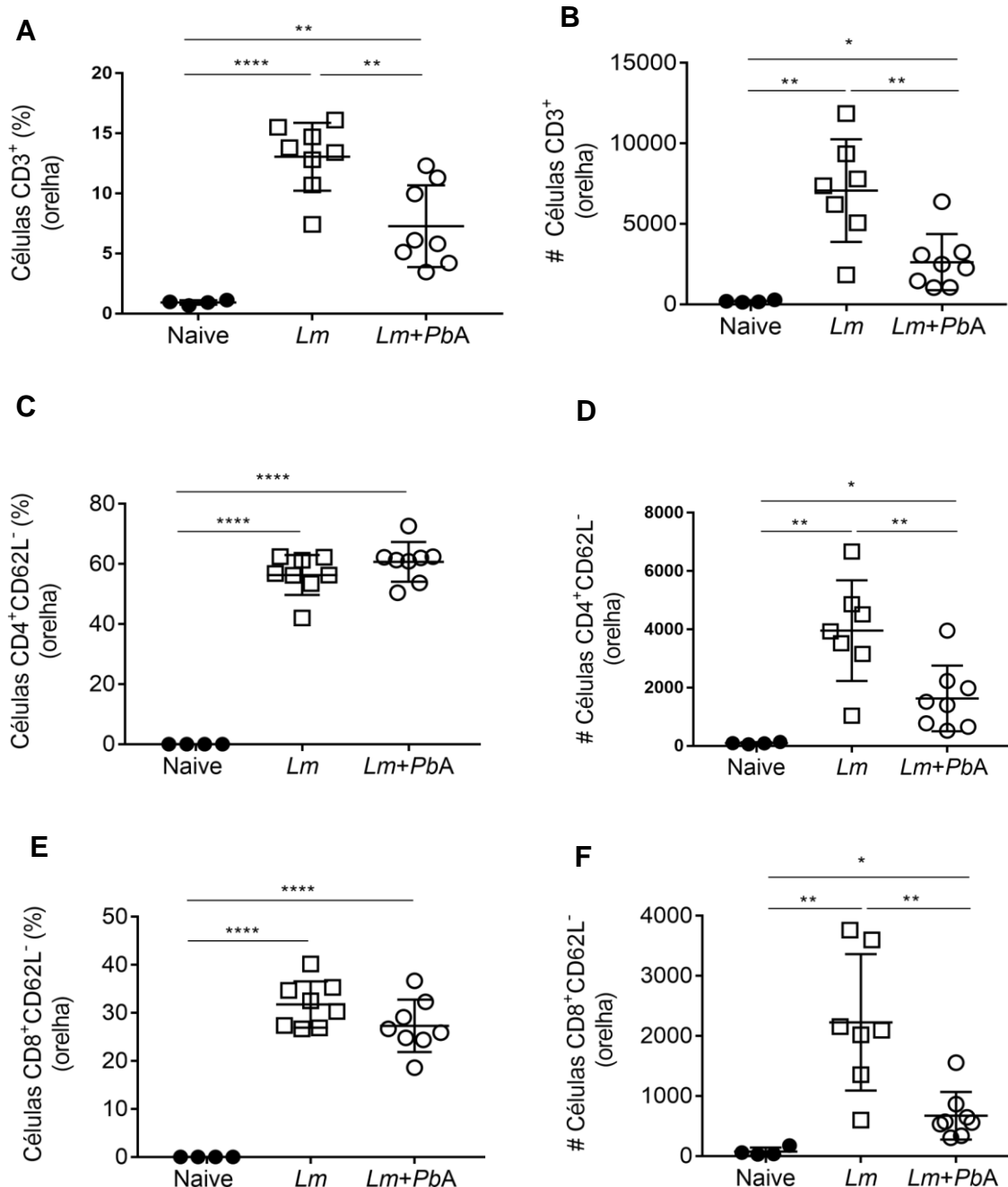
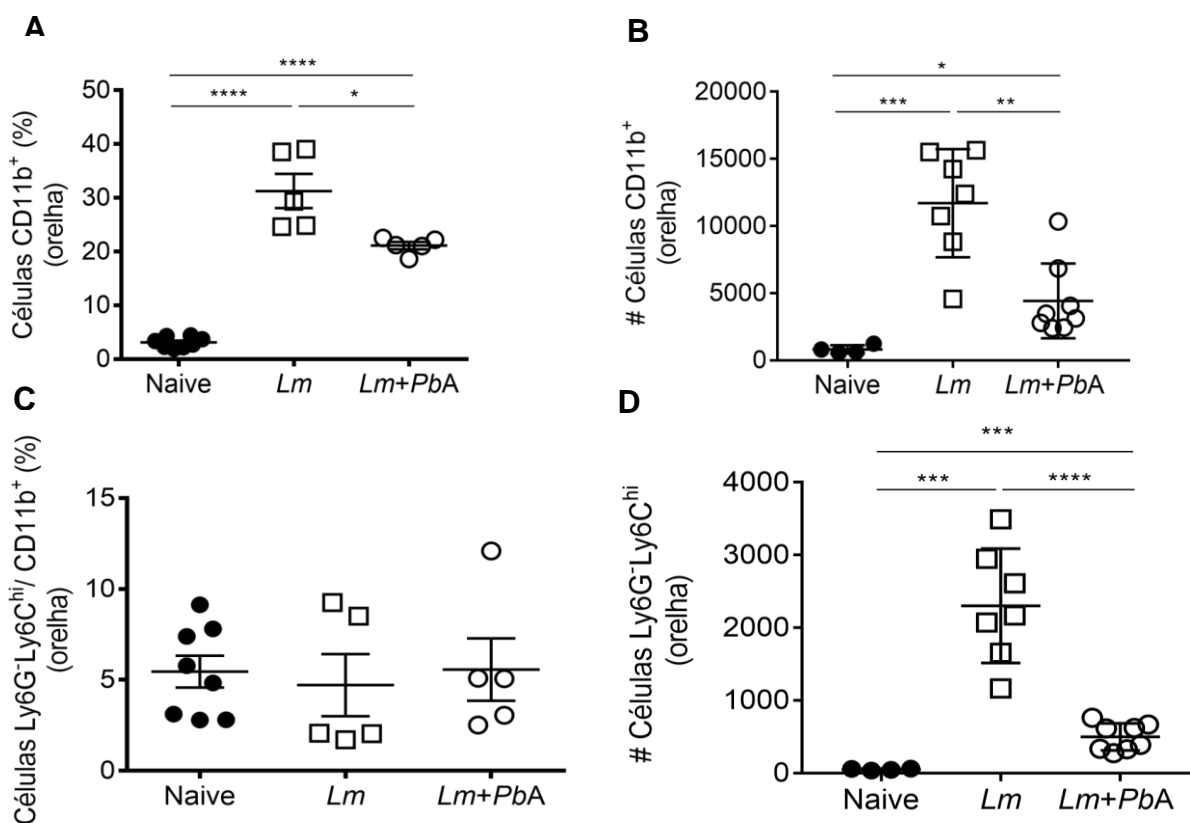


Figura 23. Percentual e número total das subpopulações linfoides presentes na orelha dos animais mono e coinfetados com *L. major* e *P. berghei* ANKA. Avaliação no 20º dia após a infecção com *L. major* do (A) percentual de células T (CD3⁺) em relação ao número total de células da orelha; (B) Número total de células T (CD3⁺) na orelha; (C) percentual de células T CD4⁺CD62L⁻ em relação ao número total de células T (CD3⁺); (D) Número total de células T CD4⁺CD62L⁻ na orelha; (E) percentual de T CD8⁺CD62L⁻ em relação ao número total de células T (CD3⁺); (F) Número total de células T CD8⁺CD62L⁻ na orelha. N=7-8 animais/grupo. Grupos: Lm (animais infectados com *L. major*) e Lm+PbA (animais coinfetados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.7 O recrutamento da subpopulação de células CD11b⁺ para o local de infecção com *L. major* é reduzido após coinfeção com *P. berghei* ANKA

Também investigamos diferentes subpopulações de células mieloides na orelha desses animais. Observamos que os animais infectados com *L. major* e os coinfectados apresentaram maior percentual e número total de células CD11b⁺ em relação aos animais controle (Figura 24 A e B). Entretanto, camundongos coinfectados (*Lm+PbA*) apresentaram diminuição no percentual e número total das células mieloides CD11b⁺ quando comparadas ao perfil celular da orelha dos animais infectados apenas com *L. major* (Figura 24 A e B). Não observamos diferenças no percentual da subpopulação de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6C⁻Ly6C^{hi}), entre os diferentes grupos (Figura 24 C), embora seu número total tenha sido ampliado nos grupos *Lm* e *Lm+PbA* quando comparado ao grupo Naive e reduzido nos animais coinfectados em relação ao grupo *Lm* (Figura 24 D). Os neutrófilos (CD11b⁺Ly6⁺Ly6C^{int}), por sua vez, apresentaram aumento percentual nos grupos *Lm* e *Lm+PbA*, em relação aos animais controle (Figura 24 E).

Em relação ao número total, não observamos diferenças estatísticas na população de neutrófilos entre os grupos experimentais (Figura 24 F).



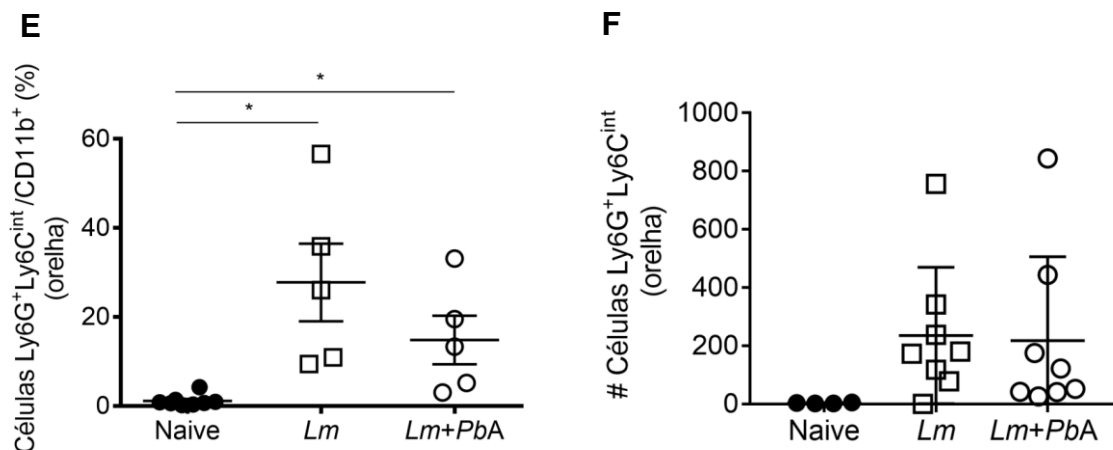
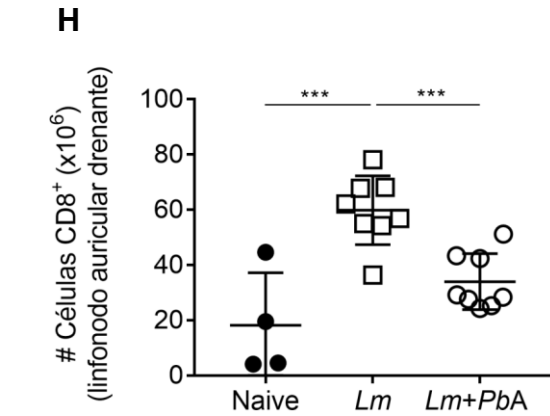
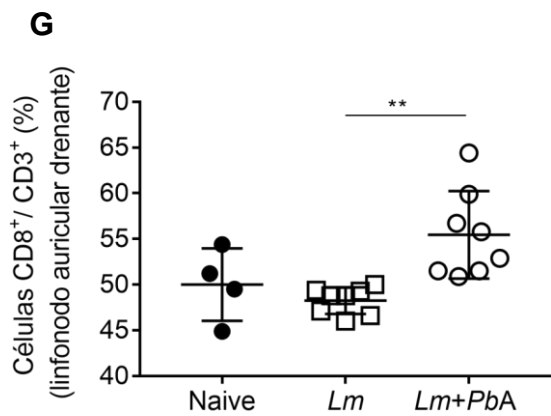
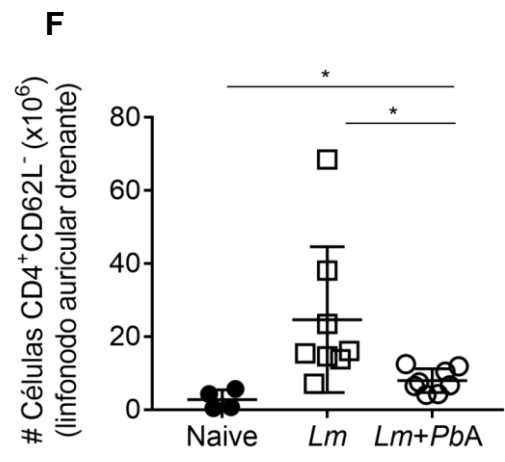
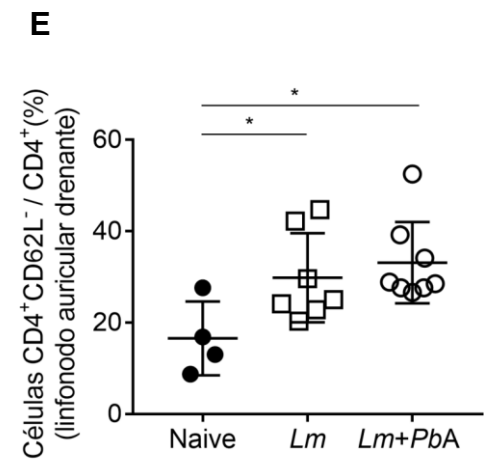
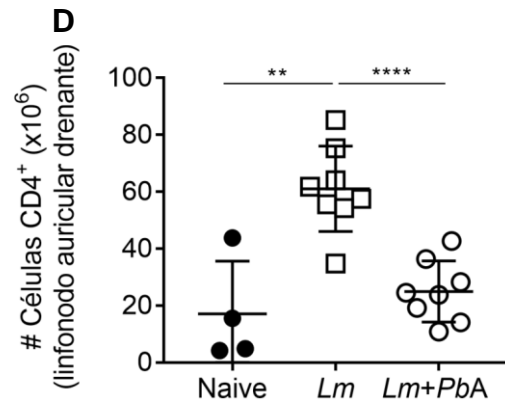
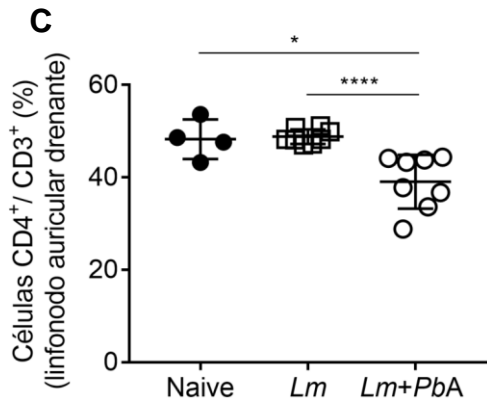
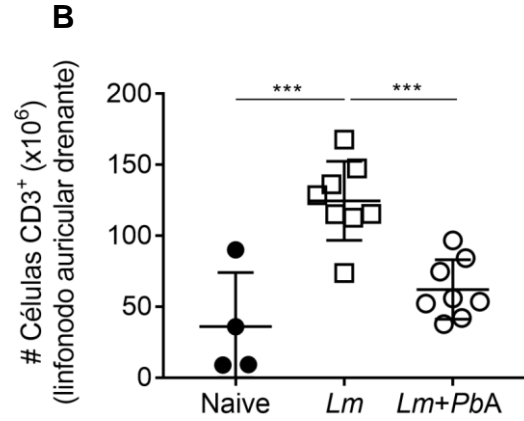
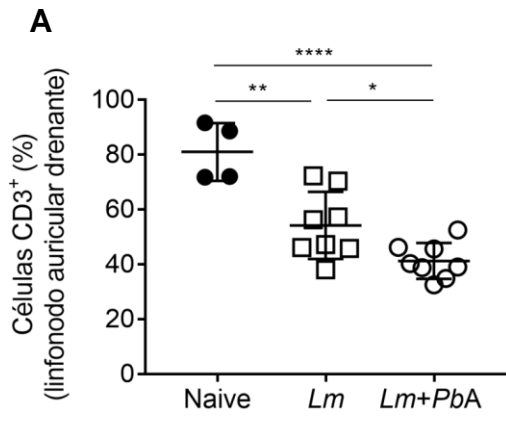


Figura 24. Percentual e número total das subpopulações celulares presentes na orelha dos animais mono e coinfectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA. Avaliação no 20º dia após a infecção com *L. major* do (A) percentual de células mieloides CD11b⁺ em relação ao número total; (B) Número total de células mieloides CD11b⁺ na orelha; (C) percentual de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}) em relação ao número total de células CD11b⁺, (D) número total de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}) na orelha; (E) percentual de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) em relação ao número total de células CD11b⁺ e (F) número total de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) na orelha. N=7-8 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *Lm+PbA* (animais coinfectados com *P. berghei* ANKA e *L. major*). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.8 O recrutamento de células linfoides para o linfonodo auricular drenante é alterado com a coinfeccção com *P. berghei* ANKA

Após avaliarmos o perfil do recrutamento de subpopulações linfoides e mieloides para a orelha dos animais infectados, avaliamos essas células no linfonodo auricular drenante (dLN) para correlacionar com outros dados já analisados, como a carga parasitária. Observamos que, em relação as células linfoides, aumento no número total de quase todas as células analisadas no grupo *Lm* quando comparado ao grupo Naive, e redução desses valores no grupo coinfectado (*Lm+PbA*) quando comparado ao grupo *Lm* (Figura 25 B, D, F, H e J). O percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não alterou no grupo *Lm* quando comparado aos animais controles, mas reduziu e ampliou, respectivamente, nos animais coinfectados (Figura 25 C e G). Em relação aos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados, observamos aumento no percentual destas células nos grupos monoinfectados e coinfectado quando comparado aos animais controle (Figura 25 E e F).



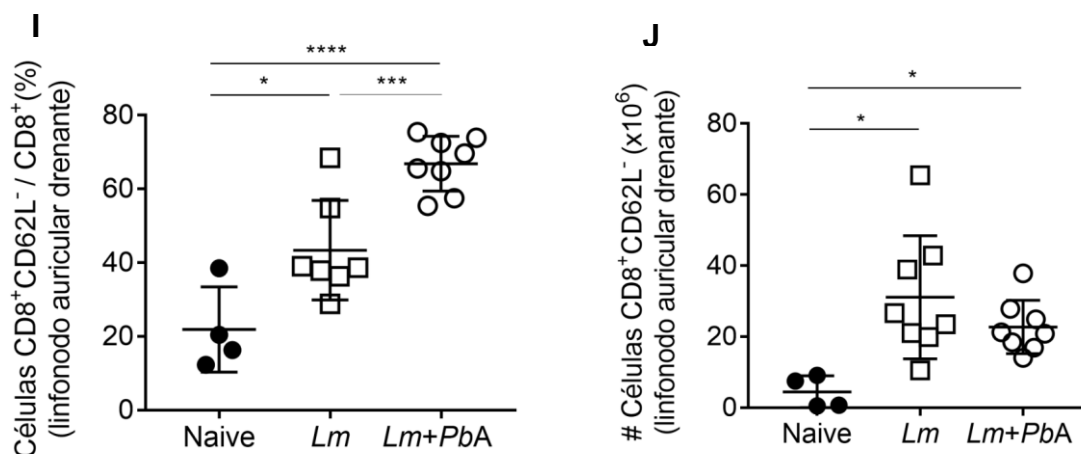


Figura 25. Percentual e número total das subpopulações linfoides presentes no linfonodo auricular drenante dos animais mono e coinfectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA. Avaliação no 20º dia após a infecção com *L. major* do (A) percentual de células T (CD3⁺) em relação ao número total de células do linfonodo; (B) número total de células T (CD3⁺) no dLN; (C) percentual de células T CD4⁺ em relação ao número total de células T (CD3⁺); (D) número total de células T CD4⁺ no dLN; (E) percentual de células T CD4⁺ ativadas (CD4⁺CD62L⁻) em relação ao número total de células T CD4⁺; (F) número total de células T CD4⁺ ativadas (CD4⁺CD62L⁻) em relação ao número total de células do linfonodo; (G) percentual de células T CD8⁺ em relação ao número total de células T (CD3⁺); (H) Número total de células T CD8⁺ no dLN; (I) percentual de células T CD8⁺ ativadas (CD8⁺CD62L⁻) em relação ao número total de células T CD8⁺; (J) número total de células T CD8⁺ ativadas (CD8⁺CD62L⁻) no dLN. N=7-8 animais/grupo. Grupos: Naive (não infectados); *Lm* (animais infectados com *L. major*) e *Lm+PbA* (animais coinfectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.9 O recrutamento da subpopulação de células CD11b⁺ para o linfonodo auricular drenante não é alterado com a coinfeção

Ao avaliarmos a subpopulação de células CD11b⁺, percentual e número total, observamos diferenças entre o grupo não infectado (Naive) e os grupos infectados. Houve uma tendência de aumento no percentual dessa subpopulação celular no grupo coinfectado (*Lm+PbA*) em comparação ao grupo monoinfectado (*Lm*), contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 26).

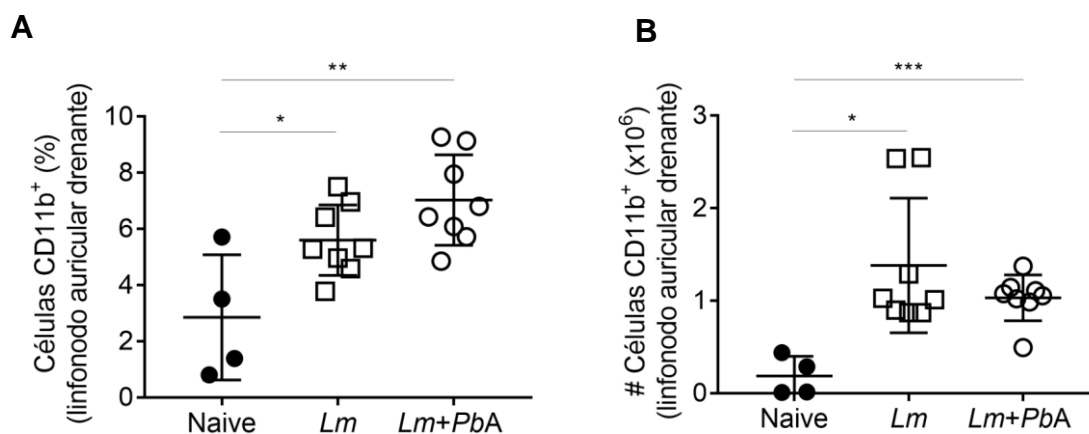
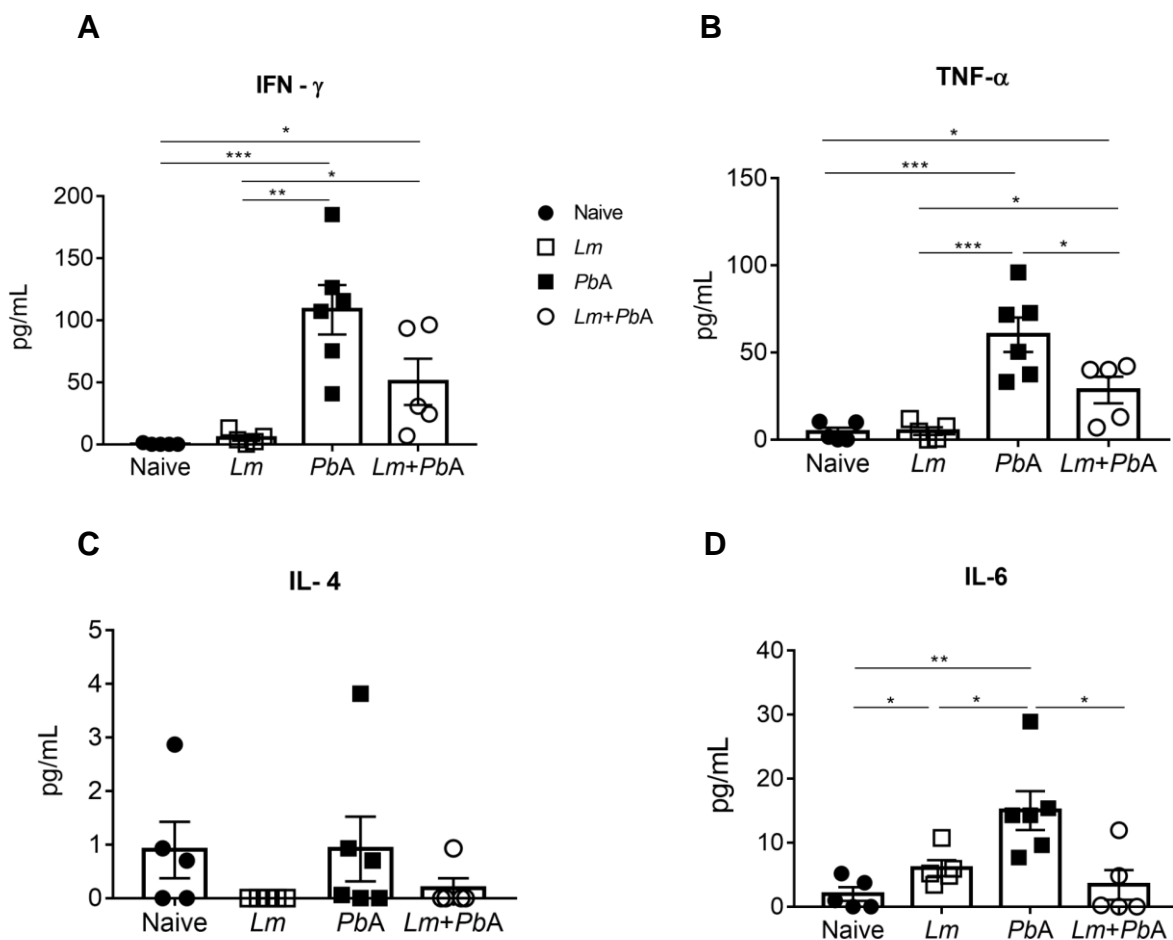


Figura 26. Percentual e número total de células CD11b⁺ presentes no linfonodo auricular drenante dos animais mono e coinfetados com *L. major* e *P. berghei*. Avaliação no 20^o dia após a infecção com *L. major* do (A) percentual de células mieloides CD11b⁺ em relação ao número total, (B) número total de células CD11b⁺ no dLN. N=4-8 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*) e *Lm+PbA* (animais coinfetados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.10 A coinfeção com *Plasmodium berghei* ANKA altera os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias

Dado que a coinfeção com *P. berghei* poderia modular o perfil pró-inflamatório da infecção com *L. major*, avaliamos o nível de citocinas no soro de camundongos C57BL/6 parasitados com *L. major* e coinfetados com *P. berghei* ANKA no 6^o dia após a coinfeção. Os níveis das citocinas foram medidos por citometria de fluxo utilizando o Kit comercial Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences). Observamos um aumento significativo da concentração (pg/mL) de IFN- γ e TNF- α (Figura 27 A e B) nos animais coinfetados com *Plasmodium* quando comparado aos animais infectados somente com *L. major*. Estes resultados corroboram a observação de que a infecção com *Plasmodium* é dominante na indução de uma resposta pró-inflamatória. Contudo, é interessante observar que os níveis dessas duas citocinas foram menores nos animais coinfetados do que nos animais monoinfectados com *P. berghei* (Figura 27 A e B), sugerindo que a infecção previa com *L. major* modula os níveis dessas citocinas em animais coinfetados com *Plasmodium*.

Ainda, foram avaliadas outras citocinas como IL-4, IL-6 e IL-10 e citocinas do perfil Th17, como IL-17. Não observamos diferença na concentração de IL-4 (Figura 27 C) entre os grupos. Em relação a IL-6, não foram observadas diferenças quando comparado o grupo coinfectado (*Lm+PbA*) ao grupo infectado somente com *L. major* (Figura 27 D). Novamente, os níveis séricos da citocina IL-10 aumentaram após a infecção com *Plasmodium* (Figura 27 E) e não observamos diferenças em relação aos animais coinfectados quando comparados aos animais infectados com *P. berghei* ANKA. Em relação citocina IL-17 não observamos níveis séricos significativos nos diferentes grupos (Figura 27 F).



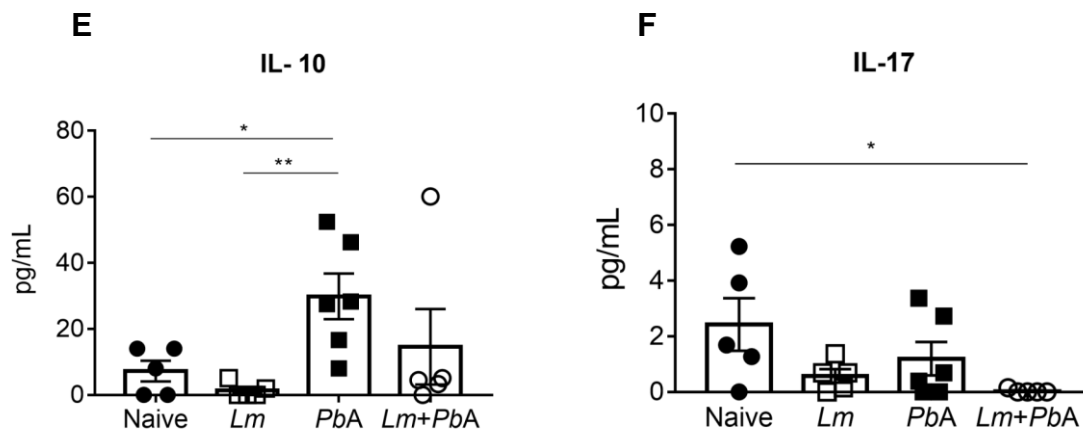


Figura 27. Dosagem de níveis de citocinas no soro de animais mono infectados e co infectados com *Leishmania* e *Plasmodium*. Análise no dia 6 após a infecção com *P. berghei* ANKA dos níveis séricos das citocinas (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) IL-4, (D) IL-6, (E) IL-10 e (F) IL-17 através do kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences). N= 5-6 animais/grupo. Grupos: *Lm* (animais infectados com *L. major*); *PbA* (animais infectados com *P. berghei* ANKA) e *Lm+PbA* (animais co infectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.3.11 Análise da expressão gênica de citocinas na orelha e linfonodo auricular drenante

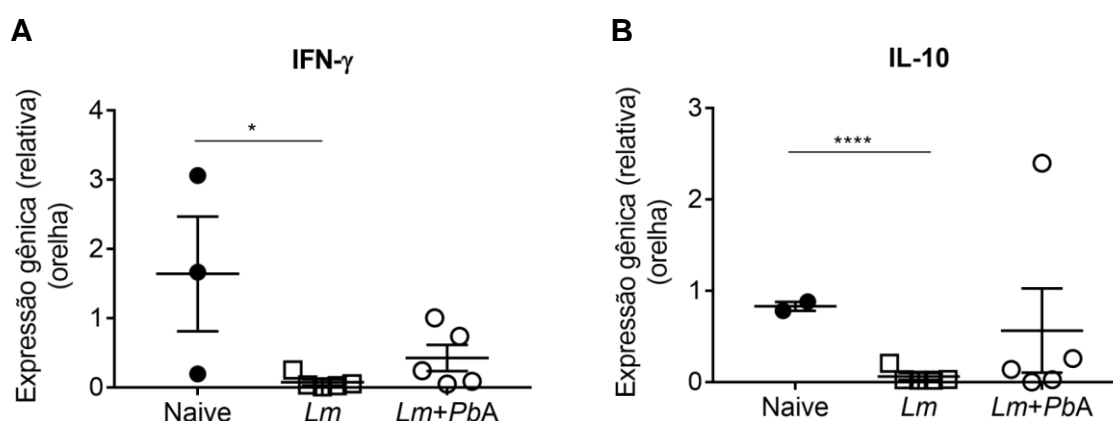
Com o intuito de analisar ao nível de mRNA, a expressão de genes codificantes para citocinas e/ou moléculas associadas aos diferentes perfis de resposta imune, avaliamos por qPCR os níveis de transcritos dos genes mencionados na tabela 6, na orelha e linfonodo auricular drenante (dLN) dos diferentes grupos experimentais.

Analizamos a expressão gênica de citocinas associadas a perfis pró- ou anti-inflamatórios em relação à expressão de genes de referência, ou seja, a expressão dos genes de interesse foi normalizada pela média geométrica de genes de referência, cuja expressão esperávamos que fosse similar entre os grupos. Até o momento da redação desta dissertação haviam sido testados 5 genes de referência nas amostras de orelha e três genes nas amostras de linfonodo (Tabela 11).

Tabela 11. Genes normalizadores e de interesse selecionados para orelha e linfonodo auricular drenante (dLN).

Amostra	Gene de referência	Genes de interesse
Orelha	ATPb5 CyC1 GAPDH 18S	IFN- γ IL-10 ARGINASE 1 iNOS
Linfonodo auricular drenante	GAPDH 18S	TGF- β ARGINASE 1 iNOS

Contudo, dos genes de referência testados, nenhum se comportou realmente como um normalizador, apresentando diferenças de expressão entre as amostras (infectados e não infectados). Dentre eles, para as amostras de orelha, o que apresentou menor discrepância foi o 18s, sendo escolhido como gene normalizador. Para as amostras de linfonodo, a menor diferença foi encontrada nos genes 18s e GAPDH. Mesmo cientes das limitações que essa falha impõe na interpretação dos resultados, decidimos incluir nesta dissertação os dados de expressão gênica obtidos com o intuito de mostrar seu potencial e os desafios que representa este tipo de análise. Não observamos diferenças significativas na expressão de mRNA das citocinas avaliadas na orelha (Figura 28 A-D). Outras citocinas como TGF- β , IL-4, IL-12 e TNF- α foram analisadas, contudo os níveis de transcritos para essas moléculas não foram detectáveis nas amostras.



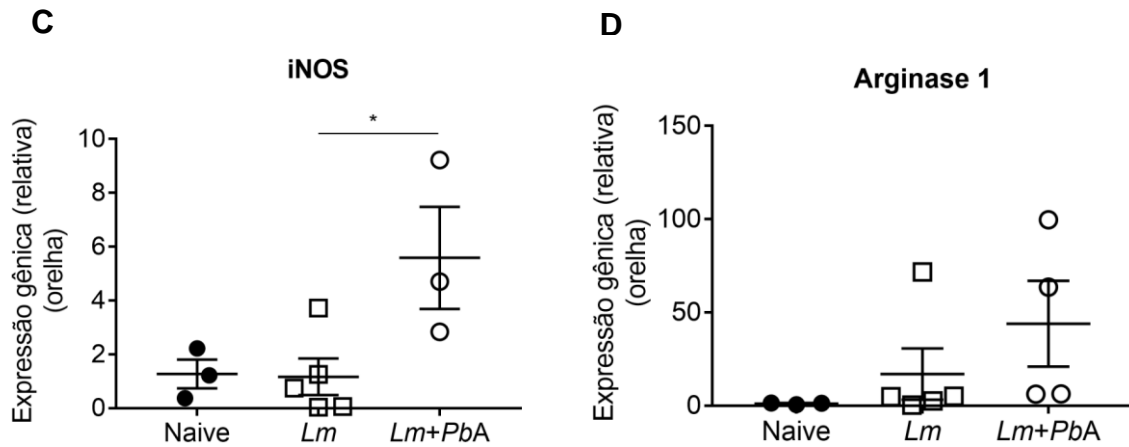
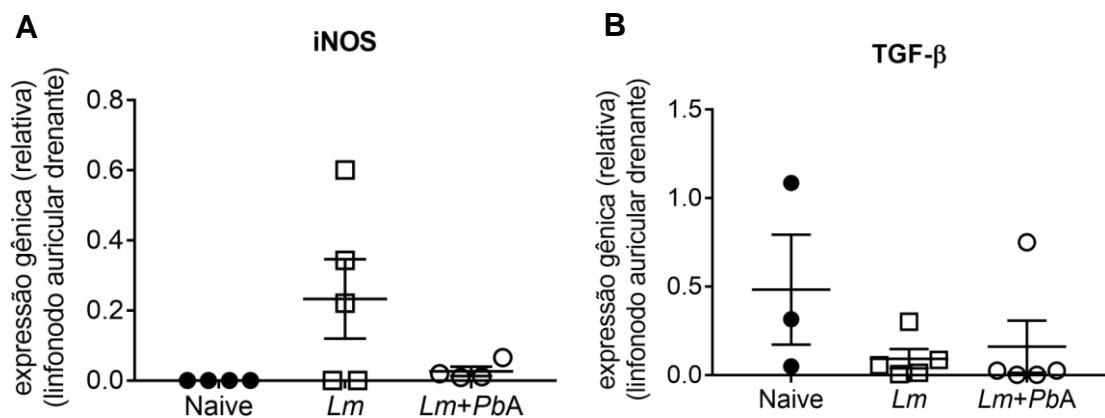


Figura 28. Expressão gênica de citocinas na orelha. Foram analisados os níveis de expressão de mRNA de (A) IFN- γ , (B) IL-10, (C) iNOS e (D) Arginase 1 no tecido da orelha de animais infectados, coinfectedos e animais controle, baseado no modelo do desenho experimental 2 (Camundongos C57BL/6 foram infectados com 2×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. major* (i.d) e coinfectedos com 1×10^6 eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA (i.p). N= 4-5 animais/grupo. Grupos: Naive (animais controle); *Lm* (animais infectados com *L. major*) e *Lm+PbA* (animais infectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os valores são expressos como relações normalizadas entre a expressão de genes alvo e a expressão do gene 18s. Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

Para as amostras de linfonodo auricular drenante, foram escolhidos dois genes de referência: GAPDH e 18s, pois apresentaram as menores diferenças dentre os normalizadores testados. Para o linfonodo, foram analisados os genes iNOS, Arginase 1 e TGF- β (Figura 29 A-C); observamos que não há diferença da expressão de mRNA entre os grupos coinfectedos (*Lm+PbA*) e infectados somente com *L. major* (*Lm*).



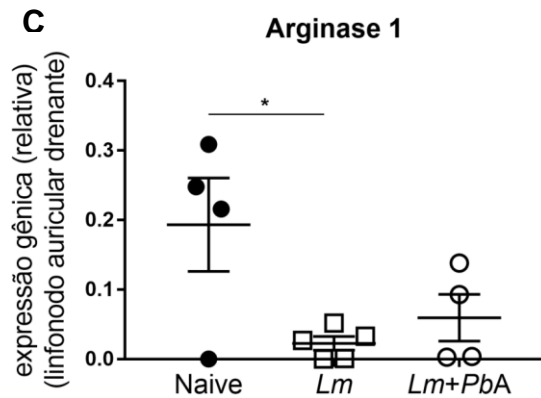


Figura 29. Expressão gênica de citocinas no linfonodo auricular drenante (dLN). Foram analisados os níveis de expressão de mRNA de (A) iNOS, (B) TGF- β e (C) Arginase 1 no linfonodo auricular drenante de animais infectados, coinfectedados e animais controle, baseado no modelo do desenho experimental 2 (Camundongos C57BL/6 foram infectados com 2×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. major* (i.d) e coinfectedados com 1×10^6 eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA (i.p). N= 4-5 animais/grupo. Grupos: Naive (animais controle); *Lm* (animais infectados com *L. major*); *Lm+PbA* (animais infectados com *L. major* e *P. berghei* ANKA). Os valores são expressos como relações normalizadas entre a expressão de genes alvo e a expressão do gene 18s. Os asteriscos assinalam as diferenças estatisticamente significativas, analisadas pelo teste *t* de Student, considerando $p \leq 0.05$.

4.4 Discussão dos resultados do desenho experimental B

Ao analisarmos os resultados do desenho experimental B, observamos que a coinfeção com *P. berghei* alterou, em termos de carga parasitária e tamanho da lesão, o curso da infecção com *L. major*. Já o contrário, ou seja, a coinfeção com *L. major*, não teve um efeito no curso clínico da infecção prévia com *P. berghei* ANKA. Os animais coinfectados apresentaram o mesmo curso clínico e desenvolveram MCE quando comparado ao grupo infectado somente com *P. berghei*. Como esperado, no desenho experimental B, após a infecção com o *P. berghei* observamos diferenças em relação ao peso, temperatura e número total de esplenócitos.

A hiperplasia esplênica é bem conhecida na malária. O aumento estrutural do baço ocorre pelo recrutamento e/ou expansão de células no órgão. Os animais coinfectados apresentam um aumento no número total de esplenócitos em relação aos animais monoinfectados com *L. major*. Mas, interessante, o número dessas células nos animais coinfectados não se equipara ao encontrado nos animais infectados somente com *P. berghei* ANKA. A resposta imune desencadeada pelo *Plasmodium* envolve a ativação de células T e B essenciais para o controle do parasito (MARSH & KINYANJUI., 2006; BEESON *et al.*, 2008).

Nossos dados confirmam a expansão e ativação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ após infecção com *P. berghei* ANKA em relação aos animais controle. No entanto, em animais previamente parasitados com *L. major* e coinfectados com *P. berghei* ANKA, o número dessas células foi maior em relação aos animais monoinfectados com *L. major*, e menor em relação aos animais monoinfectados com *P. berghei* ANKA. A infecção com *L. major* também promoveu o recrutamento e expansão de diferentes subpopulações de células linfóide e, principalmente, mielóide. No entanto, em animais previamente parasitados com *L. major* e coinfectados com *P. berghei* ANKA, o número total das células linfóide foi maior em relação aos animais monoinfectados com *L. major*. Estes dados sugerem que coinfeção com *P. berghei* ANKA em animais previamente infectados com *L. major* promove maior ativação das subpopulações de células linfóides no baço e que esta ativação pode estar relacionada ao controle da lesão e carga parasitária por *L. major*. Interessante, embora a infecção com *PbA* tenha induzido hiperplasia esplênica nos animais previamente parasitados com *L. major*, o número total das subpopulações de células

linfoides foi menor quando comparado ao grupo mono infectado pelo *Plasmodium*. A infecção prévia por *L. major* pode ter reduzido o recrutamento e/ou proliferação de células linfoides no baço após a coinfeção com *Plasmodium* ou induzido a pronta saída (migração) dessas células do baço em direção ao sítio de infecção por *L. major* e/ou linfonodo drenante da lesão, no qual já apresentavam um processo inflamatório.

A hiperplasia esplênica nos animais mono infectados com *L. major* ocorreu, em grande parte, pelo recrutamento de células mieloides CD11b⁺, monócitos inflamatórios e, principalmente neutrófilos. O número de células mieloides (CD11b⁺) expandiu no baço dos animais mono e coinfectados em relação ao controle. Na infecção com *Leishmania*, o neutrófilo foi a principal célula recrutada, embora seu número tenha reduzido após a infecção com *P. berghei* ANKA. Já os monócitos inflamatórios tiveram seus números aumentados, durante a infecção com *L. major* e ampliados quando os animais parasitados com *L. major* foram coinfectados com *P. berghei* ANKA.

Diferente da leishmaniose visceral, no qual os parasitos chegam pela corrente sanguínea a diversos órgãos como fígado, medula óssea e baço, em nosso modelo de leishmaniose cutânea, os parasitos são drenados do sítio de infecção para o linfonodo mais próximo da lesão.

A observação que a infecção com *P. berghei* ANKA no curso da leishmaniose cutânea reduziu o tamanho da lesão e a carga parasitária local nos impulsionou a investigar as células presentes no sítio de infecção e linfonodo drenante e o perfil das citocinas séricas dos animais coinfectados em relação aos animais mono infectados com *L. major*.

Porém, ao analisarmos o recrutamento de células linfoides e mieloides para o sítio de infecção, observamos um menor número de células mieloides, T CD4⁺ e T CD8⁺ ativadas nos animais coinfectados em relação ao grupo de animais infectados somente com *L. major*. De forma similar, no linfonodo drenante da lesão também apresentou redução nas subpopulações de linfócitos nos animais coinfectados em relação aos mono infectados (*Lm*). Embora o percentual das células T ativadas (CD62L⁻) tenha sido semelhante ou maior na orelha e linfonodo drenante, respectivamente, no grupo dos animais coinfectados em relação mono infectados.

Esse dado não corrobora com nossa hipótese inicial de migração de células ativadas no baço para outros sítios inflamatórios, e fortalece a hipótese de inibição

da proliferação e/ou morte dos linfócitos antígeno-específicos. Alguns estudos já demonstraram a diminuição no percentual de células T CD4⁺ no baço de camundongos infectados com *Plasmodium* e relacionam essa redução com o aumento da apoptose e exaustão celular causada pela infecção (HELMBY *et al.*, 2000; SANCHEZ-TORRES *et al.*, 2001; GIGLEY *et al.*, 2012; KESWANI & BHATTACHARYYA, 2013; HORNE-DEBETS *et al.*, 2013; SHANKAR *et al.*, 2018). A exaustão celular também é descrita na infecção por *Leishmania* (GIGLEY *et al.*, 2012) e todo este processo pode ter sido exacerbado durante a coinfeção.

A infecção por *P. berghei* ANKA induz uma forte produção de citocinas do tipo 1 em camundongos C57BL/6, como IFN- γ , TNF- α e IL-6 (GRAU *et al.*, 2003), e estas citocinas ativam e modulam diferentes fagócitos como os macrófagos e células dendríticas. Nos macrófagos, induzem a produção de óxido nítrico e derivados de oxigênio e aumentam a capacidade apresentadora de antígeno das células dendríticas (deWALICK *et al.*, 2007; SAPARNA *et al.*, 2014). O óxido nítrico é considerado um dos mais potentes leishmanicidas, com atividade já descrita como crucial no controle da leishmaniose cutânea murina causada por *L. mexicana*, *L. major* e *L. braziliensis* (LIEW *et al.*, 1990; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; MORGADO *et al.*, 2008).

Ou seja, citocinas como IFN- γ e TNF- α , estão associadas ao controle da infecção por *Leishmania* (de MOURA *et al.*, 2005), induzindo a ativação de macrófagos e morte do parasito. A redução na lesão e carga parasitária ocorreu justamente na fase aguda da malária, quando encontramos níveis aumentados de citocinas IFN- γ e TNF- α que levariam a um ambiente mais pró-inflamatório e, portanto, controlariam o desenvolvimento das lesões nos animais coinfectados. Acreditamos que a redução da carga parasitária na orelha pode estar principalmente relacionada à ativação sistêmica e exacerbada da resposta imune após a infecção com o *Plasmodium*.

Essas observações corroboram com os achados do desenho experimental A e mostram como a infecção com *Plasmodium* induz uma resposta imune dominante em indivíduos coinfectados. Nossos resultados também estão de acordo com recentes publicações que reportaram o curso da coinfeção e resposta imune por *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* em camundongos BALB/c. Os autores observaram que as lesões cutâneas no grupo coinfectado com *P. yoelii* 17XNL são menores que nos animais infectados somente com *L. braziliensis* ou *L.*

amazonensis, devido ao ambiente inflamatório causado pela infecção com o *Plasmodium* (PINNA *et al.*, 2016).

Buscamos também analisar os níveis de expressão de transcritos de algumas citocinas e enzimas por qPCR. A qPCR, permite a coleta de dados, através da detecção de fluorescência, cujo nível é proporcional à quantidade de produto inicial na reação (GACHON *et al.*, 2004). Para o efetivo funcionamento dessa técnica, há a necessidade de uma série de padronizações que incluem o uso de genes de referência adequados, quantidade inicial da amostra, integridade quantidade de RNA e eficiência enzimática da síntese de proteínas (GINZINGER, 2002). O método utilizado nesta dissertação, a expressão gênica relativa, é baseada na relação da expressão de um gene alvo comparada com a expressão de um gene de referência. Esse tipo de quantificação tende a ser muito eficaz, contudo os resultados oriundos dessa comparação são completamente dependentes do gene referência e dos métodos de normalização usados (PFAFFL, 2001). Por isso, é recomendado o uso de múltiplos genes de referência (mínimo três genes de referência) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Os genes escolhidos como normalizadores são aqueles relacionados à codificação de proteínas envolvidas na manutenção estrutural e metabólica das células, já que genes com essas funções não deveriam variar sua expressão nos tecidos. Genes como GAPDH e 18 s já são preconizados na literatura como genes de referência (Tabela 8). Segundo Abershardt e cols., (2012), o GAPDH é um dos genes de referência mais comumente utilizado, baseado na suposição de que sua expressão de mRNA é estável em todas as condições experimentais e em todos os tecidos. Para o tecido da orelha, estudos com camundongos infectados com *L. major* relatam a utilização do gene 18 s como normalizador (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Contudo, não foram encontrados resultados satisfatórios que pudessem responder mais profundamente o papel dessas citocinas na imunomodulação na coinfeção. Uma das principais limitações foi justamente a determinação de genes normalizadores apropriados. Nesse estudo, testamos pelo menos quatro genes de referência, porém nenhum deles se comportou como tal entre as amostras testadas, apresentando variações importantes entre os grupos e por isso não foi possível obter resultados confiáveis de expressão gênica. Frequentemente usado como gene de referência, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), é escolhido baseado na suposição de que sua expressão de mRNA é estável em todas as

condições experimentais (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; HUGGETT *et al.*, 2005; MAMO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2010; HRUZ *et al.*, 2011; GILSBACH *et al.*, 2018). Contudo, alguns estudos demonstram que a expressão gênica dos normalizadores pode variar entre os tecidos e que essa variabilidade na expressão pode alterar significativamente os resultados e conclusões de cada estudo (TRICARICO *et al.*, 2002; BEMEUR *et al.*, 2004; SUGDEN *et al.*, 2010; DHEDA *et al.*, 2005; SULLIVAN-GUNN *et al.*, 2011). De fato, este gene não apresentou uma expressão constante entre as amostras analisadas, o que influenciou o resultado da quantificação relativa dos genes de interesse. Já o gene 18S, descrito para a normalização em orelha, apresentou amplificações inespecíficas, determinadas pela curva de melting. Então, não foi possível obter resultados confiáveis com esta quantificação relativa. Contudo, consideramos que esta análise deve ser repetida usando outras condições que incluam genes que possam ser confiavelmente usados como normalizadores.

5 DISCUSSÃO FINAL

A ocorrência simultânea de mais de uma infecção parasitária em humanos é comumente observada, não sendo considerado um evento isolado (SHATTOCK *et al.*, 1993; BIRGER *et al.*, 2015; DEGAREGE & ERKO, 2016). Infecções concomitantes estão relacionadas à sobreposição de vetores e dos próprios parasitos na mesma região geográfica. Fatores ambientais favoráveis como temperatura e precipitação favorecem o acondicionamento de diversas doenças parasitárias como malária e leishmaniose em regiões tropicais e subtropicais. A maioria dos estudos encontrados em relação à presença dos parasitos causadores dessas infecções em um mesmo hospedeiro humano, dizem respeito à malária e à leishmaniose visceral (YOELI, 1948; NANDY *et al.*, 1995; VAN DEN BOGAART *et al.*, 2014; FERREDE *et al.*, 2017). Em um desses primeiros relatos, Yoeli e *cols.*, (1948) encontraram formas esquizontes de *P. vivax* em esfregaços sanguíneos de um paciente acometido por Calazar (leishmaniose visceral) (YOELI, 1948). Em um estudo mais recente, foi visto que há uma interação a nível imunológico em uma coinfeção com parasitos do complexo *L. donovani* e *P. falciparum* (VAN DEN BOGAART *et al.*, 2014). Nesse estudo, em pacientes sudaneses, ao comparar o perfil de citocinas de pacientes infectados com *L. donovani*, *P. falciparum* e pacientes coinfectados, observou que a coinfeção altera o perfil de citocinas dos pacientes coinfectados, resultando em um aumento de citocinas pró-inflamatórias. Assim, os autores inferem que a infecção concomitante pode ter potenciais implicações no curso dessas doenças (VAN DEN BOGAART *et al.*, 2014).

Recentemente, Adegboye e *cols.*, (2017) realizaram uma análise epidemiológica da ocorrência de malária e leishmaniose cutânea (LC) no Afeganistão. Baseado em dados do sistema de informação de gestão de saúde do país, em 2009, eles mapearam os casos ocorridos de malária e leishmaniose cutânea e observaram que há uma associação entre os casos de malária e LC nas áreas estudadas. A incidência da leishmaniose em um determinado mês está relacionada à incidência de malária no mês anterior. Neste estudo eles descrevem a coexistência de malária e leishmaniose cutânea dentro da mesma área geográfica e destacam que as pessoas que vivem em áreas com malária estão em maior risco de infecção por *Leishmania* (ADEGBOYE *et al.*, 2017). Contudo, são raros os estudos

que investigam a interação dos parasitos causadores da malária e da leishmaniose cutânea em um mesmo paciente, principalmente no que diz respeito à um aumento na gravidade clínica que poderia ser ocasionada pela coinfeção e ao desenvolvimento da resposta imune inata e adquirida à ambos parasitos.

Modelos experimentais murinos são utilizados para acompanhar processos patológicos envolvidos na malária e leishmaniose, além de serem oportunos para elucidar mecanismos imunológicos similares à infecção em humanos. O modelo experimental de infecção de camundongos C57BL/6 com *P. berghei* ANKA é caracterizado como suscetível, desenvolvendo malária cerebral. Em relação à leishmaniose cutânea, a infecção de camundongos C57BL/6 com *L. major* cursa de forma benigna, sendo esta linhagem murina considerada resistente à infecção, pois desenvolve a lesão, mas apresenta cura clínica espontânea da mesma em decorrência da forte resposta imune pró-inflamatória do tipo Th1 (BOGDAN *et al.*, 1996; ALEXANDER & BRYSON, 2005). Os animais C57BL/6 infectados com *L. major* reproduzem os eventos observados na maioria dos pacientes infectados com essa espécie de *Leishmania*.

Nesta dissertação, nos propusemos a investigar os efeitos da coinfeção com *Plasmodium* e *Leishmania* no desenvolvimento da resposta imune inata e adquirida, para analisar se essa interação poderia resultar no controle ou exacerbação da malária ou da leishmaniose cutânea.

Em resumo observamos que no nosso modelo a infecção com *P. berghei*, seja ela prévia ou posterior à infecção com *L. major*, induz uma forte resposta pró-inflamatória, que por um lado leva à morte dos animais por malária cerebral, mas por outro lado controla a proliferação da *Leishmania*.

Nosso estudo pode abrir caminho para um ponto de atenção em relação às coinfeções em áreas endêmicas do Brasil e do Mundo. Para refletirmos sobre a gravidade das infecções causadas por parasitos dermatotrópicos em regiões como Amazônia Legal Brasileira onde há sobreposição de vetores e parasitos da malária e da leishmaniose cutânea. Seria tentador especular que a exposição constante à infecção malárica cria um ambiente pró-inflamatório no hospedeiro, que poderia estar controlando e reduzindo as lesões causadas pela leishmaniose. Com essa hipótese, seria interessante a realização de um estudo epidemiológico nas regiões de possível coinfeção do Brasil, mapeando áreas com ocorrências de leishmaniose

cutânea, e relacionando com o perfil de citocinas de pacientes que apresentam ou já tiveram malária.

Nossos resultados reforçam a necessidade de mais estudos na coinfeção experimental e no campo, para que possamos avaliar essas interações mais a fundo e, mais adiante, entender essa dinâmica nas infecções em hospedeiros humanos.

6 CONCLUSÕES

A coinfeção com *Plasmodium berghei* ANKA seja ela prévia ou posterior à infecção com *Leishmania* modula a resposta imune dos animais coinfectados alterando a evolução da lesão cutânea causada por *Leishmania major*.

6.1 Desenho experimental A

- a) A coinfeção com *Leishmania major* em animais previamente infectados com *Plasmodium berghei* ANKA não apresenta efeitos sobre o curso clínico da malária.
- b) A coinfeção com *L. major* não altera o percentual de células linfoides nem mieloides no baço dos animais previamente infectados com *P.berghei* ANKA.
- c) A infecção prévia com *P.berghei* ANKA tem efeitos benéficos na redução da carga parasitária do linfonodo auricular drenante em animais posteriormente parasitados por *L. major*.
- d) O recrutamento de células CD11b⁺ para a orelha dos animais infectados independe da infecção prévia com *P. berghei* ANKA.
- e) O nível de citocinas no soro dos camundongos infectados não é alterado pela coinfeção com *L. major*.

6.2 *Desenho experimental B*

- a) A infecção prévia com *L. major* não impede que animais posteriormente infectados com *P. berghei* ANKA desenvolvam malária cerebral.
- b) A coinfeção com *P. berghei* ANKA altera o número de células linfóides e mielóides no baço de animais previamente parasitados com *L. major*.
- c) A coinfeção com *P. berghei* ANKA reduz a lesão e carga parasitária na orelha de animais parasitados com *L. major*.
- d) O recrutamento/expansão de linfócitos para/no linfonodo auricular drenante é alterado com a coinfeção.
- e) A coinfeção *L. major* e *P. berghei* ANKA altera o perfil de citocinas séricas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, PATRICIA & SILVEIRA, HENRIQUE (2009). Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. Rev. Port. Sau. Pub. v.27 n.2

ADAMS, S., TURNER, G. D., NASH, G. B., MICKLEM, K., NEWBOLD, C I., CRAIG, A G (2000). Differential binding of clonal variants of *Plasmodium falciparum* to allelic forms of intercellular adhesion molecule 1 determined by flow adhesion. Infect Immun, 68: 264-269

ADEGBOYE, O. A *et al* (2017). Joint spatial time-series epidemiological analysis of malaria and cutaneous leishmaniasis infection. Epidemiol. Infect. (2017), 145, 685–700

ADEMOLA, I O & ODENIRAN, P O (2016). Co-infection with *Plasmodium berghei* and *Trypanosoma brucei* increases severity of malaria and trypanosomiasis in mice. Acta Trop. Jul;159:29-35

AHMED, M A & COX-SINGH, J (2015). *Plasmodium knowlesi*—an emerging pathogen. SBT Science Series, 10(Suppl. 1), 134–140

AKHOUNDI, M., KUHLS, K., CANNET, A., VOTYPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P *et al* (2016). A Historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS neglected tropical diseases.;10(3):e0004349

ALEXANDER, J & BRYSON, K (2005). T helper (Th)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol Lett., Jun 15;99(1):17-23

ALVAR, JORGE., VELÉZ, IVAN D., BERN, CARYN *et al* (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. pLOS One, Volume 7, pg 5, e35671

AMANTE, F H *et al* (2010). Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J Immunol*, v. 185, n. 6, p. 3632–3642

AMINO, R., THIBERGE, S., SHORTE, S., FRISCHKNECHT, F., MÉNARD, R (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol. Nov*; 329(11):858-62

AMINO, R., THIBERGE, S., BLAZQUEZ, S., BALDACCI, P., RENAUD, O., SHORTE, S., MÉNARD, R (2007). Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc.* 2(7):1705-12

ANDRADE, A., PINTO, S C., OLIVEIRA, R S., *orgs* (2002). *Animais de laboratório: criação e experimentação* . Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p. ISBN: 85-7541-015-6

ANVERSA, T; TIBURCIO, MONIQUE G S *et al* (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev Assoc Med Bras*; 64(3):281-289

ARTAVANIS-TSAKONAS, K & RILEY, E M (2002). Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of immunology*, v. 169, n. 6, p. 2956–2963

AWASTHI, A., MATHUR, R., SAHA, B (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, 119, 238-258

BACELLAR, O., LESSA, H., SCHRIEFER, A., MACHADO, P., RIBEIRO DE JESUS, A., DUTRA, W O., GOLLOG, K J., CARVALHO, E M (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*70: 6734-6740

BAJENOFF, M., EGEN, J. G., KOO, L. Y., LAUGIER, J. P., BRAU, F., GLAICHENHAUS, N *et al* (2006). Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 25, 989–1001

BAKIR, HANNA Y; TOMYIAMA, CHIKAKO; ABO, TORU (2011). Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Biomedical Research*, 32 (3) 203-208

BEESON, J G., OSIER, F H., ENGWERDA, C R (2008). Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends in parasitology*. 2008;24(12):578-84.337

BELKAID, Y., BUTCHER, B., SACKS, D L (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol*. 1998 Apr;28(4):1389-400

BEMEUR, C., STE-MARIE, L., DESJARDINS, P., HAZELL, A S., VACHON, L., BUTTERWORTH, R., MONTGOMERY, J (2004). Decreased beta-actin mRNA expression in hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience Letters* 357(3):211-4

BELHADJ, S., PRATLONG, F., HAMMAMI, M., KALLEI, K., DEDET, J P., CHAKER, E (2003). Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the Sidi Bourouis focus (Northern Tunisia): epidemiological study and isoenzymatic characterization of the parasites. *Acta Trop*; 85:83-86

BIHL, F., PECHEUR, J., BRÉART, B., POUPON, G., CAZARETH, J., JULIA, V., GLAICHENHAUS, N., BRAUD, V M (2010). Primed antigen-specific CD4⁺ T cells are required for NK cell activation in vivo upon *Leishmania major* infection. *J Immunol*. Aug 15;185(4):2174-81

BIRGER, R B *et al* (2015). The potential impact of coinfection on antimicrobial chemotherapy and drug resistance. *Trends in Microbiology*. Volume 23, no.9

BLUM, J., BUFFET, P., VISSER, L., HARMS, G., BAILEY, M S., CAUMES, E *et al* (2014). Leishmaniasis recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers. *J TravelMed*;21(2):116–29

BOGDAN, C *et al* (1996). Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 8: 517-525

BREWIG, N; KISSENPFFENING, A; MALISSEN, B *et al* (2009). Priming of CD8⁺ and CD4⁺ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *Journal Immunology*, 182 (2): 774-83

CONCEA (2016). Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 4: primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino e pesquisa científica. 1^o edição

DONDORP, A M., INCE, C., CHARUNWATTHANA, P., HANSON, J., VAN KUIJEN, A., FAIZ, M A *et al* (2008). Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *J Infect Dis*;197(1):79-84

BUFFET, P A *et al* (2011). The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malária in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, v.117, n.2

BRITTINGHAM, A., MORRISON, C J., MCMASTER, W R., MCGWIRE, B S., CHANG, K P., MOSSER, D M (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* 155: 3102-3111

BRUCHEFELD, J; CORREIA-NEVES, M; KALLENIOUS, G (2015). Tuberculosis and HIV coinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 5:a017871

BURZA, S *et al* (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*.;392(10151):951–70

CARLTON, J M., SINA, B J., ADAMS, J H (2011). Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis*.Jun;5(6):e1160

CARRERA, L., GAZZINELLI, R T., BADOLATO, R., HIENY, S., MULLER, W., KUHN, R., SACKS, D L (1996). *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12

induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. J Exp Med. Feb 1;183(2):515-26

CARVALHO, L J., LENZI, H L., PELAJO-MACHADO, M., OLIVEIRA, D N., DANIEL-RIBEIRO, C T., FERREIRA-DA-CRUZ, M F (2000). *Plasmodium berghei*: cerebral malaria in CBA mice is not clearly related to plasma TNF levels or intensity of histopathological changes. Exp Parasitol. May;95(1):1-7

CASTELLANO L R, FILHO D C, ARGIRO L, DESSEIN H, PRATA A, DESSEIN A *et al* (2009). Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. Human immunology; 70(6):383-90

CHAPPUIS, F; SUNDAR, S *et al* (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. Nature Reviews Microbiology volume 5, pgs, 873–882

CHORILLI, M., MICHELIN, D C., SALGADO, H R N (2007). Animais de laboratório: o camundongo. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.28, 11-23

CLARK, I A & ROCKETT, K A (1994). The cytokine theory of human cerebral malaria. Parasitol Today, 10(10): 410-412

COLEMAN, R E., EDMAN, J D., SEMPREVIVO, L H (1988). Interactions between *Plasmodium yoelii* and *Leishmania mexicana amazonensis* in Leishmania resistant C57BL/6 mice. Am J Trop Med Hyg. Dec;39(6):540-4

COX, F E (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. Parasitology, 122, S23-S38

DE SOUZA J B, *et al* (2009). Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. Parasitology; 23:1–18

DEANE, L M.; CAUSEY, O R.; DEANE, M P (1948). Notas sôbre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública. P: 827-965

DEDET, JP & PRATLONG, F: Manson's tropical diseases (2003). In: COOK, G. C & A. ZUMBA (ed.) 21st. Leishmaniasis. Londres, 1339-1364

DEGAREGE, A & ERKO, B (2016). Epidemiology of *Plasmodium* and Helminth Coinfection and Possible Reasons for Heterogeneity. Biomed Res Int. 2016;2016:3083568

DESJEUX P (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. May-Jun;95(3):239-43

DESJEUX, P (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004

DESRUISSEAU, M S., GULINELLO, M., SMITH, D N., LEE, S C., TSUJI M, WEISS, LM *et al* (2008). Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. J Infect Dis. 2008 Jun 1; 197(11):1621-7

deWALICK, S *et al* (2007). Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. J. Immunol. 178, 6033- 6037

DIETMANN, A., LACKNER, P., HELBOK, R., SPORA, K., ISSIFOU, S., LELL, B *et al*. (2008). Opposed circulating plasma levels of endothelin-1 and C-type natriuretic peptide in children with *Plasmodium falciparum* malaria. Malar J. 7:253. 10.1186/1475-2875-7-253

DING, YAN *et al* (2012). The Plasmodium Circumsporozoite Protein, a Novel NF- κ B Inhibitor, Suppresses the Growth of SW480. Pathol. Oncol. Res. 18:895-902

DHEDA, K., HUGGETT, J F., CHANG, J S., KIM, L U., BUSTIN, S A., JOHNSON, M A., ROOK, G A., ZUMLA, A (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochememistry*, 344, 141-143

DOMINGUEZ, M; MORENO, I; AIZPURUA, C, TÓRANO, A (2003). Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect.*, Maio;5(6):507-13

DOOLAN, D L & HOFFMAN, S L (1999). NK cells and IL-12 are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD81T cells. *J. Immunol.* 163:888

EGIMA, C M *et al* (2007). Co-infection with *Trypanosoma cruzi* protects mice against early death by neurological or pulmonary disorders induced by *Plasmodium berghei* ANKA. *Malaria Journal*, v. 6, p. 90

EHRCHEN, J. M.; ROTH, J.; ROEBROCK, K.; VARGA, G.; DOMSCHKE, W.; NEWBERRY, R.; SORG, C.; MULLER-TIDOW, C.; SUNDERKÖTTER, C.; KUCHARZIK, T.; SPAHN, T. W (2008). The absence of cutaneous lymph nodes results in a Th2 response and increased susceptibility to *Leishmania major* infection in mice. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 9, p. 4241-4250

EHRCHEN, J M., ROEBROCK, K., FOELL, D., NIPPE, N., VON STEBUT, E., WEISS, J M., MÜNCK, N A., VIEMANN, D., VARGA, G., MÜLLER-TIDOW, C., SCHUBERTH, H J., ROTH, J., SUNDERKÖTTER, C (2010). Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog.* Apr 29;6(4):e1000871

FEREDE, G; DIRO, E; GETIE, S *et al* (2017). Visceral Leishmaniasis-Malaria Coinfection and Their Associated Factors in Patients Attending Metema Hospital, Northwest Ethiopia: Suggestion for Integrated Vector Management. *Malaria Research and Treatment*, 6 pgs

FILIPPI, C., HUGUES, S., CAZARETH, J., JULIA, V., GLAICHENHAUS, N., UGOLINI S (2003). CD4-I- T cell polarization in mice is modulated by strain-specific majorhistocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. J. Exp.Med. 198(2): 201-9

FISCHER, MARTA LUCIANE & TAMIOSO, PRISCILLA REGINA (2016). Environmental bioethics: college students' conception of the use of animals for food, work, entertainment and company purposes. Ciênc. Educ., Bauru, v. 22, n. 1, p. 163-182

GACHON, C., MINGAM, ANNAÏCK., CHARRIER, BÉNÉDICTE (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies? Journal of Experimental Botany, volume 55, pg 1445-1454

GARCIA-BASTEIRO, A L., BASSAT, Q., ALONSO, P L. (2012). Approaching the target: the path towards an effective malaria vaccine. Mediterr J Hematol Infect Dis,4 (1), e2012015

GIGLEY, JASON P., BHADRA, RAJARSHI., MORETTO, MAGALI., KHAN, IMTIAZ (2012). T cell exhaustion in protozoan disease. Trends Parasitology; 28(9): 377-384

GILSBACH, R., KOUTA, M., BONISCH, H., BRUSS, M (2018). Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. Biotechniques, volume 40, no.2

GINZINGER, DAVID G (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Internacional Society of Exp. Hematol. 30, 503-512

GOMES, A. P. *et al* (2011). Severe *Plasmodium falciparum* malaria. Rev Bras Ter Intensiva, v. 23, n. 3, p. 358–369

GONTIJO, BERNARDO & CARVALHO, MARIA DE L RIBEIRO DE (2003). Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(1):71-80

GOUGH,P.J & GORDON,S (2000). The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect.*,v.2,p.305-311

GRAU, G E; MACKENZIE, C D; CARR, R A (2003). Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis*, 187:461-6

GRIFFITHS, EMILY C *et al* (2011). The nature and consequences of coinfection in humans. *The Journal of Infection*, 63(3): 200-206

GRIFFITHS, EMILY C *et al* (2014). Analysis of a summary network of co-infection in humans reveals that parasites interact most via shared resources. *Proc Biol Sci.* 11; 281 (1782): 20132286

GUIMARÃES-COSTA, A B., NASCIMENTO, M T., FROMENT, G S., SOARES, R P., MORGADO, F N., CONCEIÇÃO-SILVA, F., SARAIVA, E M (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 21;106(16):6748-53

HARHAY, M O, OLLIARO, P L., COSTA, D L., COSTA, C H (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*, 27, 403-409

HELMBY, H; KULLBERG, M; TROYE-BLOMBERG, M (1998). Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infect Immun*, Nov;66(11):5167-74

HELMBY, H; JÖNSSON, G; TROYE-BLOMBERG, M (2000). Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect Immunology*, 68(3):1485-90

HERNANDEZ-RUIZ, J *et al* (2010). CD8 Cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR2 agonists. PLoS Neglected Tropical Disease, vol.4, e871

GARCIA, L S (2010). Malaria. Clin Lab Med. Mar;30(1):93-129

GETAHUN, H., GUNNEBERG, C., GRANICH, R., NUNN, P (2010). HIV infection-associated tuberculosis: the epidemiology and the response. Clin Infect Dis 50: Suppl 3S201–S207

GOMES, A P *et al* (2011). Severe Plasmodium falciparum malaria. Rev Bras Ter Intensiva, v. 23, n. 3, p. 358–369

GRIFFITHS, E C; PEDERSEN, A B *et al* (2011). The nature and consequences of co-infection in humans. J Infect, 63(3):200-206

GRIFFITHS, E C; PEDERSEN, A B *et al* (2014). Analysis of a summary network of co-infection in humans reveals that parasites interact most via shared resources. Proceeding of the Royal Society B, 281:20132286.

GUEIRARD, P., TAVARES J., THIBERGE, S., BERNEX, F., ISHINO, T., MILON, G., FRANKE-FAYARD, B., JANSE, C J., MÉNARD, R., AMINO, R (2010). Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Oct 26;107(43):18640-5

HAFALLA, J C., SILVIE, O., MATUSCHEWSKI, K (2011). Cell biology and immunology of malaria. Immunol Rev. Mar;240(1):297-316

HERNÁNDEZ-RUIZ, J., SALAIZA-SUAZO, N., CARRADA, G., ESCOTO, S., RUIZ-REMIGIO, A., ROSENSTEIN, Y., ZENTELLA, A., BECKER, I (2010). CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR2 agonists. PLoS Negl Trop Dis, Nov 2;4(11):e871

HORNE-DEBETS, J. M *et al* (2013). PD1 dependent exhaustion of CD8+ T cells drives chronic malaria. *Cell Reports*. 5, 1204–1213

HISAEDA, H., YASUTOMO, K., and HIMENO, K (2005). Malaria: immune evasion by parasite. *Int.J. Biochem. Cell Biol.* 37, 700-706

HRUZ, T., WYSS, M., DOCQUIER, M., PFAFFL, M W., MASANETZ, S., BORGHI, L., VERBRUGGHE, P., KALAYDJIEVA, L., BLEULER, S., LAULE, O., DESCOMBES, P., GRUISSEM, W., ZIMMERMANN, P (2011). RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics* 12, Article number: 156

HUGGETT, J., DHEDA, K., BUSTIN, S., ZUMLA, A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 1-6

ISHINO, T., YANO, K., CHINZEI, Y., YUDA, M (2004). Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol.* Jan;2(1): e4

KAMHAWAI, S (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, v.22, p.439-445

KESWANI, T & BHATTACHARYYA, A (2013). Splenocyte apoptosis in *Plasmodium berghei* ANKA infection: possible role of TNF-alpha and TGF-beta. *Parasite immunology*; 35(2):73-90

KILLEEN, G F., FILLINGER, U., KICHE, I., GOUAGNA, L C., KNOLS, BG (2002). Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? *Lancet Infect Dis.* Oct;2(10):618-27

KING, T & LAMB, T (2015). Interferon- γ : The Jekyll and Hyde of Malaria. *PLOS Pathogens*, 11(10): e1005118

KOSSODO, S. & GRAU, G. E (1993). Profiles of cytokines production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J. Immunol*, 151: 4811-4820

KROPF, P. *et al* (2004). Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.*, v. 72, n. 4, p. 1920-8

KROTOSKI, W A (1985). Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(1):1-11

LACERDA-QUEIROZ, *et al* (2008). Imunopatôgenese da malaria cerebral. *Rev Bras Neurol*, 44 (1): 13-19.

LAMB, T J., BROWN, D E., POTOCHNIK, A J., LANGHORNE, J (2006). Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med.* Mar 23;8(6):1-22

LANDAU, I (1965). Description of *Plasmodium chabaudi* sp., parasite of african rodents. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences.* 1965; 260:3758-61.130.

LAUFS, H., MULLER, K., FLEISCHER, J., REILING, N., JAHNKE, N., JENSENIUS, J C., *et al* (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and immunity*; 70(2):826-35

LAINSON, R., SHAW, J J., SILVEIRA, F T., BRAGA, R R (1987). American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*;81(3):517

LANGHORNE, J., NDUNGU, F M., SPONAAS, A M., MARSH, K (2008). Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol.* 2008 Jul;9(7):725-32

LEON, L R (2002). Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol*;92(6): 2648-55

LEÓN, B., LÓPEZ-BRAVO, M., ARDAVÍN, C (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. Apr;26(4):519-31

LI, C., SEIXAS, E., LANGHORNE, J (2001). Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol*. Apr; 189(3):115-26

LIEHL, P., ZUZARTE-LUIS, V., CHAN, J., ZILLINGER, T., CARAPAU, D., *et al* (2014). Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat. Med.* 20, 47–53. doi: 10.1038/nm.3424

LIEVIN-LE, V M & LOISEAU, P M (2016). *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. *EBS Journal* 283, 598–607

LIEW, FY., LI, Y., MILLOTT, S (1990). Tumor necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*. Dec;71(4):556-9

MAC-DANIEL, L.; BUCKWALTER, M. R.; BERTHET, M.; *et al* (2014). Local Immune response to injection of *Plasmodium* sporozoites into the skin. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 3, p. 1246–1257

MACHADO, P., KANITAKIS, J., ALMEIDA, R., CHALON, A., ARAÚJO, C., CARVALHO, E M (2002). Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol*. Sep-Oct;12(5):449-51

McCONVILLE, M J; NADERER, T (2011). Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annual Review of Microbiology*, vol. 65:543-561

MALHERBE, L., FILIPPI, C., JULIA, V., FOUCRAS, G., MORO, M., APPEL, H., WUCHERPFENNIG, K., GUERY, J.C., AND GLAICHENHAUS, N (2000). Selective

activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity*13:771-782

MAMO, S., GAL, A B., BODO, S., DINNYES, A (2007). Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC developmental biology*, 7, 14

MARKUS, M B (2011). The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res. Jan*;108(1):247-52

MARSH, K & KINYANJUI, S (2006). Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite immunology*. 28(1-2):51-60

MEDANA, I. M.; HUNT, N. H.; CHAUDHRI, G (1997). Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol.*, 150(4): 1473-148

MEYER, KC., KLATTE, J E., DINH, H V., HARRIES, M J., REITHMAYER, K., MEYER, W., SINCLAIR, R., PAUS, R (2008). Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. *Br J Dermatol. Nov*;159(5):1077-85.2

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Set/05/jarbas_malaria_050911.pdf

MORGADO, FERNANDA N, *et al* (2008). Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol* 158:50–58

MORIYASU, T; NAKAMURA R; DELOER, S *et al* (2018). *Schistosoma mansoni* infection suppresses the growth of *Plasmodium yoelii* parasites in the liver and reduces gametocyte infectivity to mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* 12(1): e0006197.

MOSSER, D M., WEDGWOOD, J F., EDELSON, P J (1985a). *Leishmania* amastigotes: resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. J Immunol. 134: 4128-4131

MOSSER, D M., EDELSON, P J (1985b). The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. J Immunol.Oct; 135(4):2785-9

MOTA, M.M., PRADEL, G., *et al* (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. Science, Jan 5; 291: 141–144

MOTAZEDIAN, H., KARAMIAN, M., NOYES, H. A. & ARDEHALI, S (2002). DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. Annals of Tropical Medicine and Parasitology,96,31–34

MOTAZEDIAN, M. H., MEHRABANI, D., ORYAN, A., ASGARI, Q; KARAMIAN, M. & KALANTARI, M (2006). Life cycle of cutaneous leishmaniasis in Larestan, Southern Iran.Infectious Diseases and Tropical Medicine ResearchCenter,1, 137–143

MOUGNEAU, E; BIHL, F; GLAICHENHAUS, N (2011). Cell biology and immunology of *Leishmania*. Immunology Rev, Mar, 240(1):286-96

MURRAY, H W., BERMAN, J D., DAVIES, C R., SARAVIA, N G (2005). Advances in leishmaniasis. The Lancet, 366, 1561-1577

NATEGHI, ROSTAMI., M., KESHAVARZ, H., EDALAT, R., SARRAFNEJAD, A., SHAHRESTANI, T., MAHBOUDI, F., AND KHAMESIPOUR, A (2010). CD8⁺ T cells as a source of IFN-gamma production in human cutaneous leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis4: e845

NEILL, A. L. & HUNT, N. H (1992). Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. Parasitology. 105: 165-175

OAKLEY, M S., GERALD, N., MCCUTCHAN, T F., ARAVIND, L., KUMAR, S (2011). Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol.* Oct; 27(10):442-9

OCAÑA-MORGNER, C.; MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A (2003). Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 197, n. 2, p. 143–151

OLIVEIRA, F., LAWYER, P G., KAMHAWI, S., VALENZUELA, J G (2008). Immunity to Distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis*; 2: e226.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2018). World Malaria Report

SAPARNA, PAI *et al* (2014). Real-time imaging reveals the dynamics of leukocyte behaviour during experimental cerebral malaria pathogenesis. *Plos Pathog*, 10, e1004236.

PAIN, A *et al* (2001). Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 4, p. 1805–1810

PETERS, N C., EGEN J G., SECUNDINO, N., DEBRABANT, A., KIMBLIN, N., KAMHAWI, S., LAWYER, P., FAY, M P., GERMAIN, R N., SACKS, D (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 15;321(5891):970-4

PFAFFL, M W (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleid Acids Rs.*

PFAFFL, M W (2006). Real Time PCR. Capítulo 3: Relative Quantification. *Internacional University Line*, p 63-82

PINNA, R A; SILVA-DOS-SANTOS, D; PERCE-DA-SILVA, D *et al* (2016). Malaria-cutaneous leishmaniasis co-infection: Influence on disease outcomes and immune response. *Frontiers in Microbiology*,7

PRUDÊNCIO, M., RODRIGUEZ, A., MOTA M M (2006). The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews*, v.4, p.849-856

RACOOSIN, E L & BEVERLY, S M (1997). *Leishmania major*: Promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Experimental Parasitology*, 85,283–295

RADTKE, ANDREA J.; KASTENMÜLLER, WOLFGANG; ESPINOSA, DIEGO A *et al* (2015). Lymph-Node Resident CD8 α + Dendritic Cells Capture Antigens from Migratory Malaria Sporozoites and Induce CD8+ T Cell Responses. *PLoS Pathogens*, v. 11,n. 2, p. 1–23

RAMOS, T. N., D. C. BULLARD, M. M. DARLEY, K. MCDONALD, D. F. CRAWFORD, AND S. R. BARNUM (2013). “Experimental cerebral malaria develops independently of endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)”. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 16, pp. 10962–10966

RIBEIRO-GOMES, F L., OTERO, A C; GOMES N A *et al* (2004). Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. *J.Immunol.* 172:4454-4462

RIBEIRO-GOMES, F L., PETERS, N C., DEBRABANT, A. & SACKS, D L (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*leishmania* response. *PLoS.Pathog.* 8, 1-12 e1002536

REIS, L. DE C; BRITO, M E F; SOUZA, M. DE A E PEREIRA, V.R.A (2006). Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Patologia Tropical.* vol.55(2):103-115

REIS, P A., COMIMCM, HERMANI FV, SILVA, B R., BARICHELO, T, SAB I M, FRUTUOSO V S, BOZZA P T, DAL-PIZZOL F, ZIMMERMAN GA, QUEVEDO J, CASTRO., -FARIA- NETO, H C (2010). Cognitive impairment after cerebral malária in chloroquine treated mice is reversed by antioxidante adjuvante therapy. PLoS Pathog. Jun 24;6 (6):e1000963

RILEY, ELEANOR M & STEWART, V. ANN (2013). Immune mechanisms in malaria: New insights in vaccine development. Nature Medicine, v. 19, n. 2, p. 168–178

RODHAIN J (1920). *Plasmodium vinckei* n. sp.; second plasmodium parasite of wild rodents at Katange. Annales de la Societe belge de medecine tropicale. 1952;32(3):275-9.129

RUSSO D M., CHAKRABARTI, P., HIGGINS, A Y (1999). *Leishmania*: naive human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8(+) cytotoxic effectors. Exp Parasitol. Nov;93(3):161-70

SACKS, D L & MELBY, P C (2001). Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. In: Coligan JE. Current Protocols in Immunology. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience;. Capítulo 19: Unidade 19.2

SACKS, D & NOBEN-TRAUTH, N (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol. Nov;2(11):845-58

SAHA, S., MONDAL, S., BANERJEE, A., GHOSE, J., BHOWMICK, S., ALI, N (2006). Immune responses in kala-azar. Indian J Med Res, 123, 245-266

SANCHEZ-TORRES, L., RODRIGUEZ-ROPON, A., AGUILAR-MEDINA, M., FAVILA-CASTILLO, L (2001). Mouse splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. Parasite immunology.;23(12):617-26

SCHLEIN, Y; JACOBSON, R L.; MESSER, G (1992). *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 9944-9948

SCHUBACH, ARMANDO DE O *et al.* (1998). Cutaneous scars in american tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* persistence and a viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, no 58 (6), pp. 824-7.

SCORZA *et al* (2017). Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. Int. J. Mol. Sci,18, 1296

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana, 2017. Versão eletrônica.

SHANKAR, ESAKI M; VIGNESH, R; DASH, A.P (2018). Recent advances on T-cell exhaustion in malaria infection. Medical Microbiology and Immunology, 207:167-174

SHATTOCK, R J., FRIEDLAND, J S., GRIFFIN, G E (1993). Modulation of HIV transcription in and release from human monocytic cells following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis*. Res Virol 144: 7–12

SHAW, J J.; ROSA, A T.; SOUZA, A.; CRUZ, A C. Transmissão de outros agentes. In: RANGEL, E.; LAINSON, R. (Org.) (2003). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, v. 1, p. 337-351

SOE, S., THEISEN, M., ROUSSILHON, C., AYE, K S., DRUILHE, P (2004). Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. Infect Immun. Jan;72(1):247-52

SOUZA, MARIANA C.; PADUA, TATIANA A; HENRIQUES, MARIA G (2015) Endothelial-Leukocyte Interaction in Severe Malaria: Beyond the Brain. Mediators of Inflammation (Print)., p. 1-10, issn: 0962-9351

STOBIE, L., GURUNATHAN, S., PRUSSIN, C., SACKS, D L., GLAICHENHAUS, N., WU, CY., SEDER, R A (2000). The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. Proc Natl Acad Sci USA;97:8427-32

SUGDEN, K., PARIANTE, C M., MCGUFFIN, P., AITCHISON, K J., D'SOUZA, U M (2010). Housekeeping gene expression is affected by antidepressant treatment in a mouse fibroblast cell line. Journal of Psychopharmacol, volume 24, pgs:1253-1259

SULLIVAN D. Hemozoin : a Biocrystal Synthesized during the Degradation of Hemoglobin in Miscellaneous biopolymers, biodegradation of synthetic polymers, vol. 9. (Matsumura S, Steinbüchel A, eds.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2002:129-163

SULLIVAN-GUNN, M., HINCH, E., VAUGHAN, V., LEWANDOWSKI, P (2011). Choosing a stable housekeeping gene and protein is essential in generating valid gene and protein expression results. Br J Cancer

SUPALI, T., *et al.* (2010). Polyparasitism and its impact on the immune system. International Journal for Parasitology, 40, 1171-1176

SUSI, H *et al* (2015). Co-infection alters population dynamics of infectious disease. Nature Communications v. 6, n. 5975

SUTHERLAND, COLIN J *et al* (2010). Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. ID 2010:201

STURM, A., AMINO, R., VAN DE SAND, C., REGEN, T., RETZLAFF, S., RENNENBERG, A., KRUEGER, A., POLLOK, J M., MENARD, R., HEUSSLER, V T

(2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. Sep 1; 313(5791):1287-90

SYPEK, J P., CHUNG, C L., MAYOR, S E., SUBRAMANYAM, J M., GOLDMAN, S J., SIEBURTH, D S., WOLF, S F., SCHAUB, R G (1993). Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.*, v. 177, p. 1797-1802

TEMEL, ASLI BILGIC *et al* (2019). Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. *International Journal of Women's Dermatology* 5 (2019) 158–165

TORGLER, R., BONGFEN, S E., ROMERO, J C., TARDIVEL, A., THOME, M., CORRADIN, G (2008). Sporozoite mediated hepatocyte wounding limits *Plasmodium* parasite development via MyD88 mediated NF-kappa B activation and inducible NO synthase expression. *The Journal of Immunology*; 180:3990–3999

TRICARICO, C., PINZANI, P., BIANCHI, S., PAGLIERANI, M., DISTANTE, V., PAZZAGLI, M., BUSTIN, S A., ORLANDO, C (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochem*, 309, 293-300

URIARTE, S M., RANE, M J., LUERMAN, G C., BARATI, M T., WARD, R A., NAUSEEF, W M., MCLEISH, K R (2011). Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. *J Immunol*. Jul 1;187(1):391-400

UTSUYAMA M & HIROKAWA K (2002). Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice. *Exp Gerontol*;37(2-3): 411-20

VAN DEN BOGAART, E ; BERKOUT, M. M Z, NOUR, A B *et al* (2013). Concomitant malaria among visceral leishmaniasis in-patients from Gedarif and Sennar States, Sudan: a retrospective case-control study. *BMC Public Health*, volume 13, 332

VAN DEN BOGAART, E; TALHA, A. B. A; STRAETEMANS, M *et al* (2014). Cytokine profiles amongst Sudanese patients with visceral leishmaniasis and malaria coinfections. BMC Immunology, 15:16

VAN DER HEYDE, H. C.; BAUER, P.; SUN, G.; CHANG, W. L.; YIN,L.; FUSELER, J.; GRANGER, D. N (2001). Assessing vascular permeability during experimental cerebral malaria by a radiolabeled monoclonal antibody technique. Infect Immun, 69(5):3460-3465

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internalcontrol genes. Genome Biology, 3, no. 0034.1

VAN GRIENSVEN, J & DIRO, E (2012). Visceral leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am, 26, 309-322

VAN ZANDBERGEN, G., KLINGER, M., MUELLER, A., DANNENBERG, S., GEBERT, A., SOLBACH, W., LASKAY, T (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J Immunol.Dec 1;173(11):6521-5

VETHANAYAGAM, R R., ALMYROUDIS, N G., GRIMM, M J., LEWANDOWSKI, D C., PHAM, C T., BLACKWELL, T S., PETRAITIENE, R., PETRAITIS, V., WALSH, T J., URBAN, C F., SEGAL, B H (2011). Role of NADPH oxidase versus neutrophil proteases in antimicrobial host defense. PLoS One.6(12):e28149

VIEIRA, L. Q.; HONDOWICZ, B.D.; AFONSO, L.C.C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P (1994). Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo. Immunology Letters, v. 40, p. 157-161

VINCKEY, I H & LIPS, M (1948). Un nouveau Plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo, Plasmodium berghei n. sp. Ann Soc belge Méd Trop. 1948, 28: 197-204

VON STEBT, E., METZ, M., MILON, G., KNOP, J., & MAURER, M (2003). Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha/beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNF alpha. *Blood*101, 210-215.

VON STEBUT, E., BELKAID, Y., JAKOB, T., SACKS, D L., UDEY, M C (1998). 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*;188:1547-52

VON STEBUT, E (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. Mar-Apr;17(2):115-22

WANG, F., WANG, J., LIU, D., SU, Y (2010). Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. *Analytical Biochem*, volume 399, pgs: 211-217

WASSMER, S C., DE SOUZA, J B., FRÈRE, C., CANDAL, F J., JUHAN-VAGUE, I, GRAU, G E (2006). TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *J Immunol*. 176:1180–4

WASSMER, S C & GRAU, G E R (2017). Severe malaria: What's new on the pathogenesis front? *International Journal for Parasitology*, n. fev; 47 (2-3): 145-152

WENISCH, C., WENISCH, H., WILAIRATANA, P., LOOAREESUWAN, S., VANNAPHAN, S., WAGNER, O *et al* (1996). Big endothelin in patients with complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 173:1281–4

WERY, M (1968). Studies on the sporogony of rodent malaria parasites. *Annales des Societes belges de medecine tropicale, de parasitologie, et de mycologie*.;48(1):11-137

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). Leishmaniasis. Disponível em: <
<https://www.who.int/leishmaniasis>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). Malaria. Disponível em: <
<https://www.who.int/ith/diseases/malaria/en/>>

WRIGHT, D H (1968). The effect of neonatal thymectomy on the survival of golden hamsters infected with *Plasmodium berghei*. British Journal of Experimental Pathology. v. 49, p. 379-384

WRIGHT, D H & SILVERSTEIN S C (1983). Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. Journal Exp Med, v.158(6): 2016-2023

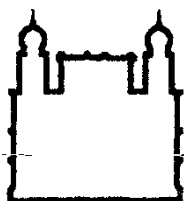
YAMAUCHI, L M., COPPI, A., SNOUNOU, G., SINNIS, P (2007). *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. Cellular Microbiology, v.9, p.1215-1222

YOELI, M (1948). Non-pigmented malaria parasites in the bone marrow from a mixed infection of *Leishmania* and *Plasmodium vivax*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.42, n.1

ZIMMERMAN, R H (1992). Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. Mem Inst Oswaldo Cruz ;87 Suppl 3:371-83

8 ANEXOS

8.1 Licença do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-030/2017

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-024/2017), intitulado “Eventos imunes na coinfeção por *Plasmodium* e *Leishmania*”, sob a responsabilidade de **FLÁVIA LIMA RIBEIRO GOMES** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/07/2021 e inclui o uso total de:

Animal	espécie e linhagem	quant (total)	♀	Idade	peso	origem (*)
Camundongo	<i>Mus musculus</i> C57BL/6	378	X	6-8 semanas	18-20g	ICTB

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 12 de julho de 2017.

Cecília Jacques de Almeida

**Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz**