

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

(Modalidade: Bacharelado)

LUANA CAROLINE SANTOS PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM MACRÓFAGOS COINFECTADOS
POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi***

São Luís - MA

Setembro, 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM MACRÓFAGOS COINFECTADOS
POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi***

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientanda: Luana Caroline Santos Pinheiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lucilene Amorim Silva

São Luís - MA

2018

LUANA CAROLINE SANTOS PINHEIRO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM MACRÓFAGOS COINFECTADOS

POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão como requisito para conclusão de curso.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva

Monografia _____ em _____ de _____ de _____ pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva
Orientadora
UFMA

Profa. Dra. Thiare Silva Fortes Braga
Membro titular

Prof.^a Esp. Andressa de Souza da Silva Godinho
Membro titular

Prof.^a Dr.^a Mayara Cristina Pinto Da Silva
Membro Suplente

Prof.^o Dr.^o Wanderson Silva Pereira
Membro Suplente

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Santos Pinheiro, Luana Caroline.

AValiação DA RESPOSTA IMUNE EM MACRÓFAGOS COINFECTADOS
POR Leishmania Leishmania amazonensis e Leishmania
Leishmania chagasi / Luana Caroline Santos Pinheiro. -
2018.

52 f.

Orientador(a): Lucilene Amorim Silva.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2018.

1. Coinfecção. 2. Leishmania amazonensis. 3.
Leishmania chagasi. 4. Macrófagos. I. Amorim Silva,
Lucilene. II. Título.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

**Dedico a Deus, a minha família e aos meus amigos que
estão sempre comigo nessa incrível jornada, a vida.**

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida, por me proteger, por me aconselhar e por me dar a oportunidade de melhorar a cada experiência vivida, por me mostrar que as quedas não necessárias para que eu cresça, e por sempre me fazer lembrar que o meu adversário é apenas uma voz que discorda da verdade que eu digo.

Agradeço imensamente aos meus pais Silvio Pinheiro e Ana Margarida Santos, por lutarem com todas as suas forças para que eu tivesse tudo o que precisava, muitas vezes abdicando dos próprios sonhos, por me ensinarem a caminhar e assim poder seguir meus próprios passos. Pela educação que me deram e por sempre estarem ao meu lado, em todos os momentos, meu caráter, meus valores e o que sou hoje devo aos dois igualmente, sou grata e feliz por tê-los em minha vida, amo vocês.

Aos meus irmãos Larissa Santos e Lucas Santos que mesmo com a implicância de irmão, sempre me ajudam como podem, apoiando e sempre torcendo por mim.

As minhas avós Jardira Barbosa e Maria Sebastiana Ferreira, com seus carinhos, cuidados e histórias me ajudam a ser uma pessoa melhor. Ao meu avô Jacinto Pinheiro (*in memoriam*) que se foi, mas que sempre estimulou todos a crescerem, a irem em buscar de algo melhor e que através do estudo e trabalho poderíamos mudar nossa realidade. Amo muito.

As minhas tias Luciana com quem cresci, sou muito grata por seus cuidados, conselhos, sua palavra amiga e por sempre está disposta a me ajudar, a minha tia Rosana com sua alegria e companheirismo que sempre posso contar, muito obrigada.

As minhas tias Gabriela, Núbia, Nilma, Silvia, Patrícia, aos meus tios Rafael, Rogério, Marconi, Marcos Aurélio com quem aprendo diariamente.

Aos meus primos e primas Raissa, Marcos Vinícius, Vitor, Sofia, Athur, Guilherme, Maria Eduarda, Milena, Rildo, Romulo, Ramon, com quem também aprendo.

As minhas amigas Aryana Vasque, Ellainny Glades, Nargylla Karoline, Danielle Serra, Marina Oliveira, Vanessa Assunção que desde a escola estão comigo sempre, torcendo umas pelas outras e sempre prontas para ajudar, sou muito feliz com vocês, obrigada.

As minhas amigas Suelma Maciel, Jessica Freire, Yohana Jardim, Lara Larissa que desde o início da graduação estamos juntas, caindo e levantado, chorando e sorrindo, foi um encontro de almas, obrigada pela amizade, por me ajudarem quando estava confusa ou vivendo algum dilema, e por sempre estarem comigo durante toda a nossa graduação.

Agradeço a Mutual Empresa Jr de Biologia e toda a equipe, Luana Antonia, Edenia, Murilo, Carlos Augusto, Rosangela, aprendi muito, período que amadureci como pessoa e como profissional.

A minha orientadora Lucilene Amorim Silva, por sempre me estimular a dar o meu melhor, pelo carinho, pela palavra amiga, por ser pulso firme me estimulando a ser mais

disciplinada e melhorar na escrita, por ter aberto as portas novamente do laboratório quando voltei, por ter me estendido a mão, por me inspirar e me ensinar todos os dias, muito obrigada professora, o que sou hoje como pesquisadora muito se deve a você.

Agradeço imensamente as Professoras Ana Paula minha primeira orientadora de PIBIC, com quem aprendi e a aprendo muito, por quem tenho grande admiração pela pessoa doce e profissional competente que é e por inspirar a sempre a dar o melhor, Thiare Fortes pelas palavras de carinho, pela força e por sempre me estender a mão quando preciso, aprendo diariamente com você, és uma profissional brilhante.

Ao Professor Eder que com a convivência diária me alegra e me ajuda sempre que pode, por quem tenho um carinho imenso. Ao professor Paulo Vitor que é um exemplo de profissional que me ajuda com sua sagacidade e competência, obrigada. A equipe LIAC, Sulayne, Mirtes, André que sempre estão prontos para ajudar, sempre que podem, tirando dúvidas, auxiliando para solucionar problemas ou conversando e tornando nosso dia- a -dia mais agradável e divertido, obrigada.

Aos meus “co-orientadores migs” Douglas, Jefferson e Lillian que me ajudaram desde o início, tirando minhas dúvidas e me ensinando para que eu caminhe com os próprios pés, pelos dias que ficaram até tarde no laboratório e por me ajudarem a crescer como pesquisadora, sou imensamente grata, vocês são um exemplo para mim.

As migs Liana, Andressa, Carol, Isolda que me ajudaram com palavras de conforto, me dando ideias e alegrando meus dias, sou muito grata ao carinho e amizade de vocês.

Agradeço a dona Sônia que alegra nossos dias no laboratório e com quem podemos contar sempre. A dona Joana pelas palavras de carinho, a Carlene pelas conversas e palavra amiga. A Renata que fez parte do laboratório pelo carinho.

As professoras Flavia Nascimento e Rosane Guerra, pela inspiração e estímulo para todos nós pesquisadores.

Obrigada ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF-UFMA), ao Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC), ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM-UFMA).

Obrigada a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, pelas bolsas nesses anos de iniciação científica.

Muito obrigada a todos que contribuíram com esse trabalho e me estimularam a sempre dar o meu melhor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Epidemiologia	15
1.2. Ciclo e transmissão.....	17
1.3. Aspectos Imunológicos	19
1.4 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral.....	22
1.4.1. Leishmaniose Cutânea (LC).....	22
1.4.1.1 Cutânea localizada única (LCL)	23
1.4.1.2 Cutânea localizada múltipla	23
1.4.1.3 Recidiva “cútis”	23
1.4.1.4 Cutânea difusa (LCD):	23
1.4.2. Leishmaniose Mucosa (LM):	23
1.4.3. Leishmaniose Cutânea Disseminada (LDi):	24
1.4.4 Leishmaniose Visceral (LV)	24
1.5. Infecções e Coinfecções	26
2.OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2. Objetivo Especifico	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Cultura de células RAW 264.7.....	30
3.2. Parasito.....	30
3.3. Infecção dos macrófagos com <i>Leishmania</i>	30
3.4. Confeções das lâminas e análise no microscópio de fluorescência.....	31
3.5. Dosagem de NO	31
3.6. Dosagem de Peróxido.....	31
3.7. Dosagem de citocinas.....	32
3.8. Análise Estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Taxa de infecção.....	33
4.2. Produção de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	35
4.3. Quantificação de citocinas	36
5. DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIA	45

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar	15
Figura 2. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Visceral	16
Figura 3. Vetor e parasitos da leishmaniose	18
Figura 4. Ciclo da leishmaniose visceral	19
Figura 5 A fagocitose de parasitas de <i>Leishmania</i>	20
Figura 6. Macrófagos M1 e M2	22
Figura 7. Lesão típica de leishmaniose cutânea localizada	22
Figura 8. Lesão típica de leishmaniose cutânea disseminada	24
Figura 9. Pacientes com leishmaniose visceral	25
Figura10. Taxa de infecção dos macrófagos (RAW 264.7) coinfectados por <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	32
Figura. 11. Número de amastigota na infecção	32
Figura 12. Porcentagem de promastigota não internalizadas.	33
Figura 13. Imagem de macrófagos (RAW 264.7) coinfectados por promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> (GFP) e <i>Leishmania chagasi</i> no período de 24h	33
Figura 14. Imagem de macrófagos (RAW 264.7) coinfectados por promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> (GFP) e <i>Leishmania chagasi</i> no período de 24h.	34
Figura 15. Produção de Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	35
Figura 16. Quantificação de Citocinas MCP-1	36
Figura 17. Quantificação de Citocinas TNF- α	37

LISTA DE SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
ADO	Adenosina
AMP	Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de variância
B.O.D.	Demanda bioquímica de oxigênio (<i>biochemical oxygen demand</i>)
CBA	Cytometric Bead Array
CCL2/MCP-1	Ligante da proteína 1 de quimiotática de monócitos
CD4 ⁺	Receptor de linfócito T auxiliar
CD8 ⁺	Receptor de linfócito T citotóxico
CO ₂	Gás carbônico
CP	Carga parasitária
CR3	Receptor complemento três
DHR	Dihydrorhodamine 123
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FasL	Receptor Fas-Ligante
GP63	Glicoproteína 63
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina gama
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
kHz	Kilohertz
LPG	Lipofosglicano
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro
MR	Receptor de manose
NO	Nitric Oxide
O - 2	Ânion superóxido
°C	Celsius
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phate Buffered Salin</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
ROS	Espécies reativas ao oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPMI	Roswell park memorial institute medium
SAPK/JNK	Proteína quinase ativada por estresse/quinase amino-terminais Jun
TCD4 ⁺	Linfócito T auxiliar
TCD8 ⁺	Linfócito T citotóxico
Th1	Linfócito T auxiliar perfil 1

Th2
TNFR
TNF- α
U

Linfócito T auxiliar perfil 2
Receptor de fator de necrose tumoral
Fator de necrose tumoral alfa
Mol

RESUMO

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública, podendo causar infecções viscerais, lesões mucocutâneas, cutânea difusa e cutânea. No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LT) e Visceral (LV) atingem todos os estados, e o Maranhão é um dos mais endêmicos, com ampla distribuição e concentração de casos. As Leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania sp.*, transmitido através do repasto sanguíneo da fêmea do gênero *Lutzomyia*. A infecção natural por diferentes espécies de *Leishmania sp.* no mesmo indivíduo, especialmente em áreas de sobreposição de espécies, pode ser mais prevalente do que previamente relatado. Esse tipo de infecção mista pode afetar o diagnóstico e tratamento da doença. Nesse sentido, a identificação e compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento das coinfeções, são de grande importância para o controle da doença. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo investigar a resposta imune em macrófagos coinfectados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. Para tanto, foi calculada a taxa de infecção de macrófagos murinos RAW 264.7 parasitados por uma ou duas espécies de *Leishmanias*, foram realizadas dosagens de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, e quantificação das citocinas IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , MCP-1, através da técnica de CBA-Kit (inflammation mouse cytokine Kit). Nossos dados mostraram que a taxa de infecção pelo parasito no grupo coinfectado, não foi tão expressiva quanto no grupo da infecção simples com *L. amazonensis*, mas foi observado uma prevalência da *L. chagasi* na infecção mista. O grupo coinfectado apresentou discreta produção de peróxido de hidrogênio, porém quando comparada nos períodos de 24h e 48h de infecção, foi percebido aumento dessa produção. Não detectamos a produção de óxido nítrico nos ensaios. A citocina inflamatória TNF- α e a quimiocina MCP-1, também se mostraram aumentadas nesse grupo. Com base nesses dados, podemos concluir que a coinfeção por *L. amazonensis* e *L. chagasi*, demonstrou uma prevalência desta última embora o perfil da resposta destes macrófagos tenha sido semelhante ao quadro de uma infecção por *L. amazonensis*.

Palavra-chave: coinfeção, macrófagos, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*

ABSTRACT

Leishmaniasis is an anthroponosis considered to be a major public health problem, which can cause visceral infections, mucocutaneous lesions, diffuse cutaneous and cutaneous lesions. In Brazil, American Tegumentary Leishmaniasis (LT) and Visceral (LV) reach all states, and Maranhão is one of the most endemic, with a wide distribution and concentration of cases. Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania* sp., Transmitted through the blood reptile of the female of the genus *Lutzomyia*. The natural infection by different species of *Leishmania* sp. in the same individual, especially in areas of species overlap, may be more prevalent than previously reported. This type of mixed infection can affect the diagnosis and treatment of the disease. In this sense, the identification and understanding of the immunological mechanisms involved in the development of coinfections are of great importance for the control of the disease. Thus, this work aimed to investigate the immune response in macrophages coinfecting with *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. In order to do so, the infection rate of RAW 264.7 murine macrophages parasitized by one or two species of *Leishmania* was calculated, hydrogen peroxide and nitric oxide dosages and quantification of IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , MCP-1, by the CBA-Kit (inflammation mouse cytokine Kit) technique. Our data showed that the rate of infection by the parasite in the coinfecting group was not as significant as in the simple infection group with *L. amazonensis*, but a prevalence of *L. chagasi* was observed in the mixed infection. The coinfecting group showed a slight hydrogen peroxide production, but when compared in the 24h and 48h periods of infection, it was noticed an increase in this production. We did not detect the production of nitric oxide in the tests. The inflammatory cytokine TNF- α and the chemokine MCP-1, were also increased in this group. Based on these data, we can conclude that the co-infection by *L. amazonensis* and *L. chagasi*, demonstrated a prevalence of the latter although the response profile of these macrophages was similar to that of a *L. amazonensis* infection.

Key words: co-infection, macrophages, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As leishmanioses correspondem a um complexo conjunto de doenças com grande espectro clínico e diversidade epidemiológica, a Organização Mundial da Saúde estima 900 000-1.3 milhões de novos casos e 20 000-30 000 mortes ocorrendo anualmente, tanto de leishmaniose tegumentar americana (LTA), quanto leishmaniose visceral (LV). (WHO, 2017). O Brasil segue o mesmo parâmetro mundial, considerado um país endêmico para as leishmanioses segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017).

A Leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais difundida da doença, presente em mais de 18 países das Américas (PAHO 2014). Anualmente, 700 mil a 1,2 milhões de casos de LC se apresentam todo mundo. O Brasil está entre os 10 países que representam cerca de 75% dos casos anuais de LC (ALVAR et al. 2012).

Na América Latina a LV possui ampla distribuição de casos, se estendendo do sul do México ao norte da Argentina (LAINSON E RANGEL 2005). Em 2013 foram notificados 3.231 casos, sendo 96,5% (3.118 casos) concentrados no Brasil. (WHO, 2015).

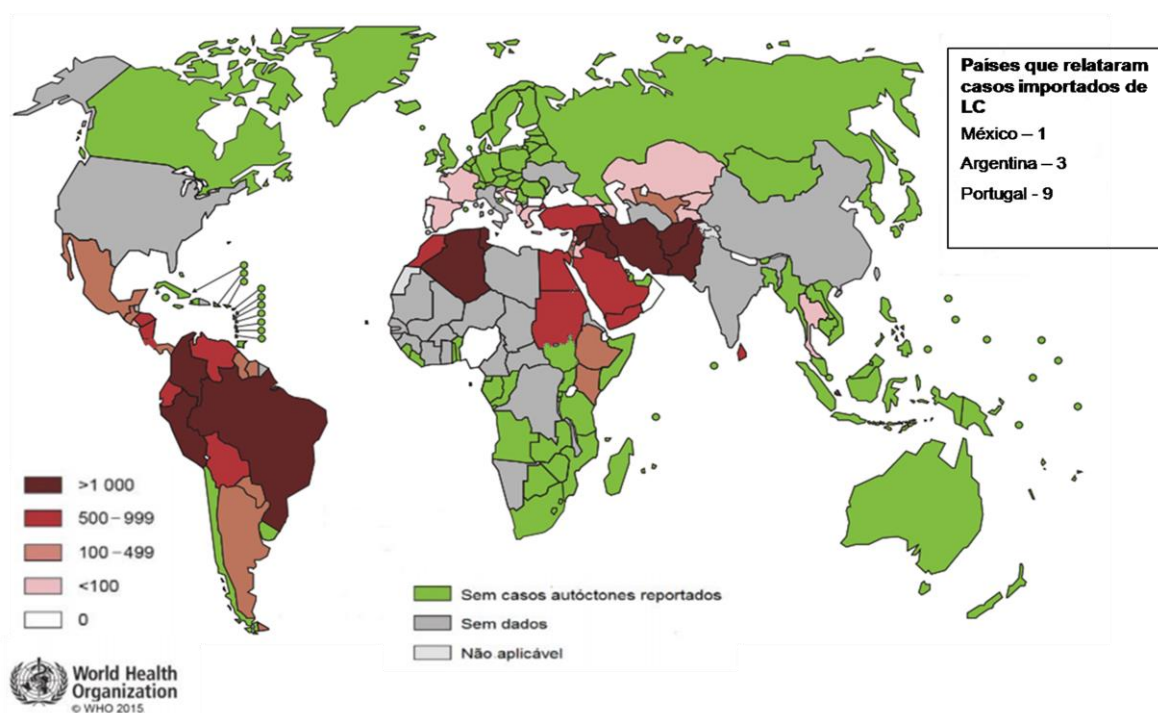


Figura 1. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar: Mapa representando os países em cores de acordo com o número de casos clínicos (Adaptado).*Fonte: WHO, 2015.*

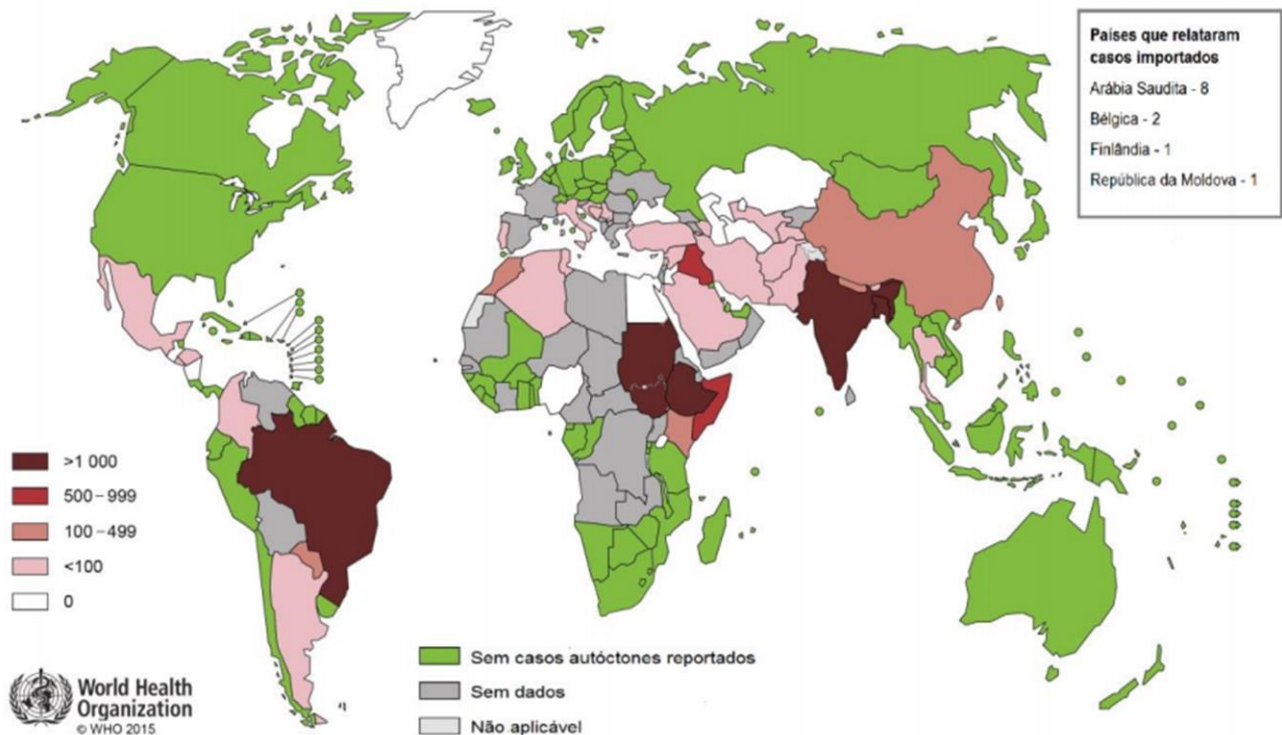


Figura 2. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Visceral: Mapa representando os países em cores de acordo com o número de casos clínicos (Adaptado). *Fonte: WHO, 2015.*

Norte e nordeste são as principais regiões quanto a endemia das duas formas de leishmaniose no país, com prevalência de casos nos Estados do Ceará (CALVACANTE et al. 2014); Piauí (SANTOS et al. 2015) e Bahia (CARNEIRO et al. 2014), sendo que a maioria dos casos acometem principalmente indivíduos com baixa renda e residentes em áreas rurais. O Maranhão entre os anos de 1999 a 2005, foi o estado que liderou em número de casos confirmados da doença no país. Os Municípios de maiores incidências foram São Luís, Caxias, Coelho Neto, Codó, Barra do Corda, Santa Inês e Timon. Dos 7.532 casos registrados da doença, de 2002 a 2012 no Estado, 1.111 casos (14,75%) foram no Município de São Luís (MOURA et al., 2012). Segundo dados da plataforma DATASUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde), no período de 2010 a 2015, foram notificados 944 casos de LV no Município de São Luís. A média no período de 2010 a 2015 do total de casos corresponde a 157,4 casos/ano.

O estado do Maranhão está na quarta posição quanto ao número de casos de LTA com aproximadamente 539 e LV com 1684 casos, segundo o Ministério da Saúde

(2017). A presença de vetores, como demonstrado por Silva e colaboradores (2016), que capturaram e identificaram várias espécies de flebotomíneos no interior do estado do Maranhão e dentre eles, alguns de importância médica como *Nyssomyia whitmani* vetor da *Leishmania braziliensis* e *Leishmania (Viannia) shawi*, e *Bichromomyia flaviscutellata* vetor da *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, ambos agentes etiológicos causadores da LTA, além do vetor *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) responsável pela transmissão do protozoário *Leishmania chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937) causador da LV (MS, 2010; MS, 2014), assim como a disponibilidades de reservatórios humanos e domésticos, são características favoráveis para proliferação da doença no estado.

1.2. Ciclo e transmissão

As leishmanioses são atropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos através da hematofagia da fêmea do gênero *Lutzomyia* (FIGURA 3A E 3C). A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas realizam repasto sanguíneo em mamíferos infectados e ingerem macrófagos parasitados (FIGURA 3B). No tubo digestivo do vetor estes macrófagos se rompem e liberam os parasitas, que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, passam por sucessivas divisões binárias e posteriormente outras formas intermediárias se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas infectantes. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, a fêmea infectada transmite *Leishmania* para um novo hospedeiro (SACKS E KAMHAWI 2001, BATES et al. 2015).

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae* (DOFLEIN, 1901). Cerca de 20 espécies são patogênicas ao homem e apresentam ciclo de vida heteroxênico (alternância entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores). As duas principais formas mais estudadas do parasito são a amastigota, flagelada e forma intracelular presente no interior de células fagocíticas; e a promastigota, forma flagelada e infectante transmitida pelo vetor (ALEMAYEHU & ALEMAYEHU, 2017).

A transmissão da *Leishmania* é feita por dípteras fêmeas do gênero *Lutzomyia* nas Américas, enquanto que na Europa, Ásia e África é pelo gênero *Phlebotomus* (WHO, 2017).

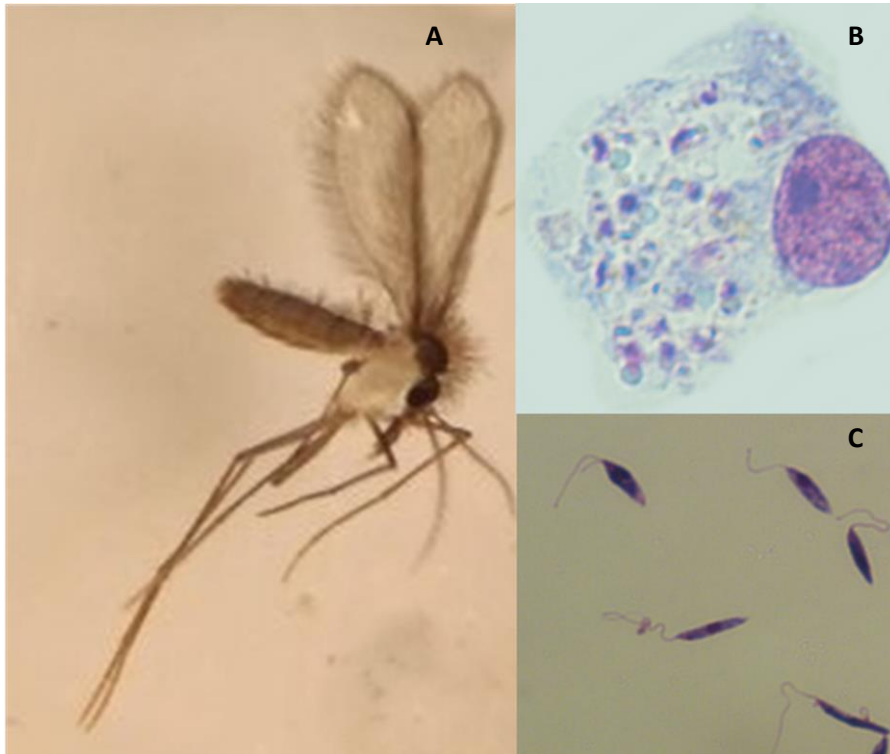


Figura 3. Vetor e parasitos da leishmaniose: A. *Lutzomyia longipalpis* Fonte (LEME-UFMA); **B.** *Leishmania ssp* Fonte (LPBM-UFMA) na forma amastigota no interior do macrófago; **C.** *Leishmania ssp* Fonte (LPBM-UFMA) na forma promastigota com a estrutura flagelar.

Essas doenças possuem diferentes manifestações clínicas, de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida na transmissão (WHO, 2016), que são amplamente distribuídas em todo mundo, desde a Ásia até a América.

Os protozoários se desenvolvem em hospedeiros vertebrados de ambiente silvestre ou peridoméstico com alternância em insetos vetores. (SCLEIN, 1993)

Dentro do tubo digestivo do vetor, as características das promastigotas vão modificando desde a fase de nectomona, nas microvilosidades do tubo digestivo, até a promastigota metacíclica infectante, livre na hipofaringe, passando por uma fase intermediária de haptomona. Este processo é conhecido por metaciclogênese e dura aproximadamente de 6 a 10 dias (FIGURA 4) (GARCIA-ALMAGRO 2005).

As amastigotas são resistentes e capazes de “burlar” a resposta microbicida do macrófago para se multiplicar até ocupar grande parte do citoplasma, romper a

membrana dessa célula e infectar outros macrófagos e outras células do sistema imune. Como também, podem infectar uma nova fêmea de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (KAYE & SCOTT, 2011).

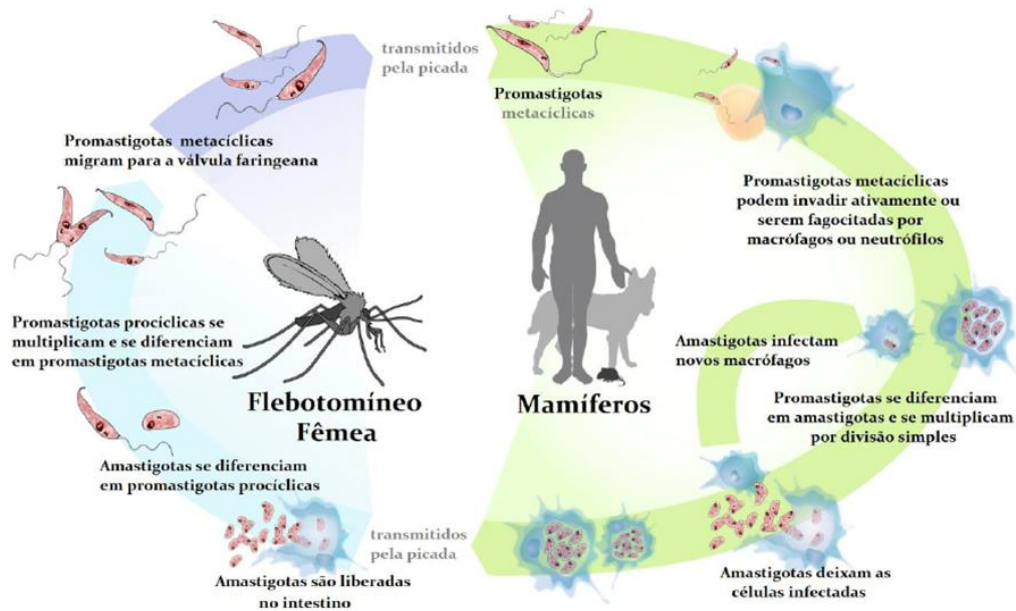


Figura 4. Ciclo de vida da *Leishmania* spp. A leishmaniose é transmitida para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo infectada. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando este ingere macrófagos infectados com a forma amastigota do parasita. As formas amastigotas se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectantes. As formas infectantes migram para o esôfago, faringe e probóscide que durante o repasto sanguíneo promovem novas infecções de hospedeiros vertebrados susceptíveis (adaptado). (Harhay et al., 2011)

1.3. Aspectos Imunológicos

O reconhecimento inicial do parasito ocorre pela adesão da *Leishmania* spp à superfície do macrófago, o que é essencial para sua fagocitose. Diferentes moléculas presentes na superfície da *Leishmania* spp, como a glicoproteína 63 (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG) interagem com receptores nos macrófagos levando a internalização do parasito e a partir daí ocorre uma série de reações bioquímicas. As formas promastigotas desencadeiam um processo inflamatório local inespecífico, constituído inicialmente por células natural killer (NK), polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), macrófagos e pela ativação do sistema complemento. (AZEREDO-COUTINHO e MENDONÇA, 2014)

No que se refere à resposta imune do hospedeiro os estudos (DUQUE & DESCOTEAUX, 2015) têm mostrado que a resistência a leishmaniose está associada à produção de citocinas com capacidade de ativar macrófagos, particularmente o IFN- γ (figura 5), cuja produção é garantida pelo desenvolvimento de uma resposta específica do tipo Th1, que depende de uma instrução dada pela interação do microrganismo com células da resposta imune inata. Assim, em um primeiro contato, as formas promastigotas da *Leishmania spp* interagem com receptores presentes em células da resposta imune inata como células dendríticas (DCs) e macrófagos, que liberam IL-12. Juntas, a IL-12 e o IFN- γ induzem a diferenciação e proliferação de linfócitos CD4+ em células Th1. Estas têm importância na qualidade da resposta imune celular específica na Leishmaniose, pois regulam a atividade leishmanicida no interior dos macrófagos. Os linfócitos T CD4+ são classificados em subpopulações, de acordo com o perfil de citocinas secretado. As evidências demonstram que um infiltrado inflamatório com predomínio de IFN- γ (interferon-gama), produzido principalmente por células Th1, se correlaciona com resistência à infecção (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2014; GOMES-SILVA et al., 2014). Ao contrário, a prevalência de células Th2 se correlaciona à susceptibilidade e incapacidade de controle parasitário (REED & SCOTT, 1993;).

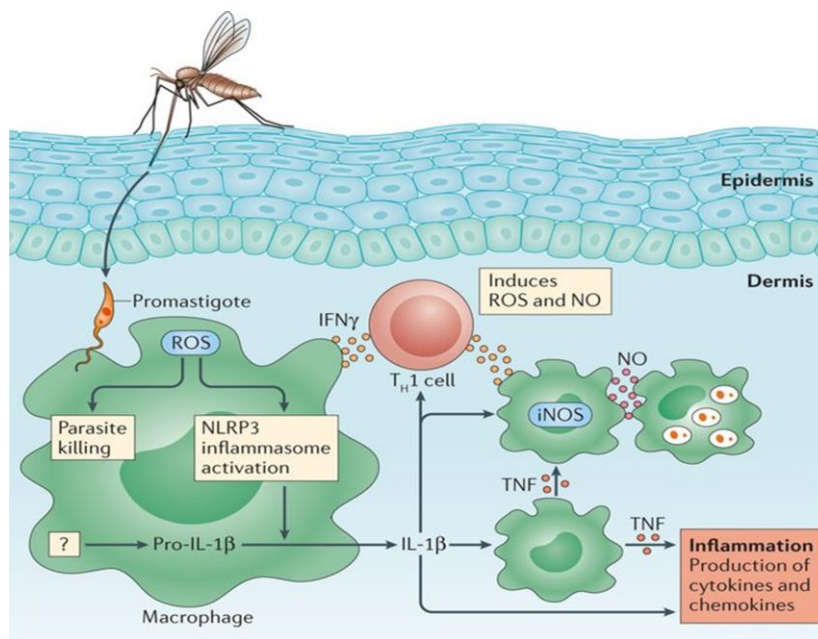


Figura 5 A fagocitose de parasitas de *Leishmania*: A fagocitose do parasito por células fagocíticas leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS podem induzir a eliminação do parasita, bem como ativar o inflamassoma (NLRP3). O fator (ou fatores) que induz a produção de pro-interleucina-1 β (IL-1 β) na pele é atualmente desconhecido. No entanto, a pró-IL-1 β é processada pelo inflamassoma na pele e sua forma madura pode funcionar de várias maneiras durante a infecção por *Leishmania*. A IL-1 β é importante na expansão das células T helper 1 (T_H1) promovendo a produção de IL-12. Além disso, a IL-1 β induz a ativação do óxido nítrico (NO) diretamente, ativando macrófagos, ou indiretamente, promovendo T_HRespostas do tipo 1 e produção de interferão- γ (IFN γ). Fonte: Nature. 2011

O padrão de resposta eficaz que ocorre nos indivíduos com a forma LC é caracterizada por uma produção de citocinas pro-inflamatórias, com predomínio de IFN- γ , interleucina (IL)- 2 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (MENDONÇA et al., 1986; SILVEIRA et al. 2009; CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Bem como as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento-beta (TGF β). Resposta inflamatória exagerada pode levar a dano tecidual e tem sido associada à imunopatogênese da leishmaniose mucocutânea (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; BACELLAR et al., 2002). Assim, a resposta do tipo 1 equilibrada, com produção de citocinas tais como IFN- γ , IL-12 e TNF- α são indispensáveis para o controle da infecção por *Leishmania spp* nos macrófagos (FIGURA 6) (GREEN et al., 1990), as principais células hospedeiras para este parasito nos mamíferos (NADERER & MCCONVILLE, 2011).

Alguns efeitos de citocinas são fundamentais para a evolução das lesões de LTA. IFN- γ leva a estimulação dos macrófagos através da expressão da enzima NOS2 (óxido nítrico sintase do tipo 2) e a consequente produção de NO (óxido nítrico) e radicais superóxidos que são os principais mediadores da morte do parasito. Kima e Soong (2013) demonstraram claramente que a infecção por espécies do subgênero *Viannia* leva a uma ativação significativa de macrófagos nos casos de LCL. Em adição, na forma LCL, quando comparadas as concentrações de macrófagos ativados e não ativados, verificou-se uma densidade 1,5 vezes maior de macrófagos ativados (CASTRO GOMES et al., 2017)

Por outro lado, uma resposta imune com predomínio de citocinas tais como IL-4, IL-5 e IL-10 diminuem a expressão da enzima NOS2 resultando na deficiência de estimulação dos macrófagos ao seu estágio parasiticida com consequente proliferação parasitária e uma doença grave de difícil tratamento, como no caso da forma cutânea difusa (MASPI et al., 2016).

Os macrófagos, quando estimulados com citocinas como IFN- γ , TNF- α ou até mesmo lipopolissacarídeos (LPS), são direcionados à ativação clássica que é caracterizada pela secreção de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-23 e quimiocinas, como MCP-1 (MILLS, 2015). Células do fenótipo M1 também são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como o óxido nítrico (NO) via metabolismo da L-arginina pela enzima iNOS, que culmina na alta atividade microbicida, além de serem capazes de promover a diferenciação de linfócitos T *naive* para o perfil Th1 influenciando no controle do parasita (MILLS & KLAUS, 2014).

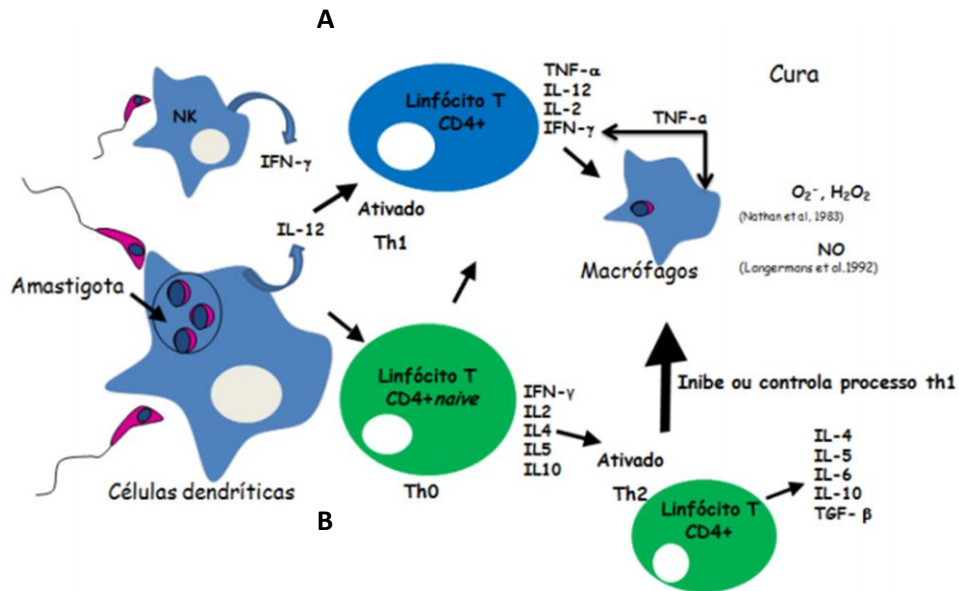


Figura 6. Macrófagos M1 e M2. Macrófagos infectados por *Leishmania* (Mφ). Macrófagos M1 ou M2 estimulam respostas mediada por celular/ CTL(linfocitos T citotóxicos) (tipo Th1) ou mediada por anticorpo/ADCC(células dependentes de anticorpos) (Tipo Th2), respectivamente. (A) Resposta M1 promove a morte do parasita pela produção de reativos de oxigênio e hidrogênio (NO, O₂⁻ e H₂O₂); (B) Resposta M2 promove a sobrevivência do parasita pela produção de poliaminas e citocinas anti-inflamatorias. Fonte: HERNÁNDEZ-RUIZ ,2006

1.4 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral

1.4.1. Leishmaniose Cutânea (LC) é causada por cinco espécies de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. donovani* (TALMI-FRANK ET AL., 2010). Enquanto na Europa, Ásia e África está associada a *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* e *L. amazonensis* (WHO, 2014), e pode se subdividir em:



Figura 7. Lesão típica de leishmaniose cutânea localizada: Úlcera oval de bordas regulares, elevadas e fundo granuloso. Fonte: Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses INI – FIOCRUZ.

1.4.1.1 Cutânea localizada única (LCL) Forma mais frequente, se caracteriza por lesões únicas que se desenvolvem no local da inoculação do parasito muitas vezes da espécie *L. guyanensis* pelo inseto vetor. Geralmente se manifesta como úlcera indolor, de bordas infiltradas e centro eritematoso, granuloso, frequentemente acompanhada de linfadenite satélite. Caso não tratadas, tendem à cura espontânea em 6% dos casos (COTA; SOUSA; FEREGUETTI, 2016), entretanto alguns casos evoluem com lesões mucosas concomitantes ou de surgimento posterior (BRASIL, 2017).

1.4.1.2 Cutânea localizada múltipla: Semelhante à forma anterior, é sugerido estar relacionada com múltiplas picadas do vetor e as lesões não costumam ser numerosas (< 10 lesões). (BRASIL, 2017).

1.4.1.3 Recidiva “cútis”: Esta forma ocorre após cicatrização espontânea ou medicamentosa da úlcera, com reativação localizada geralmente na borda da lesão. (VERMAET et al.,2012)

1.4.1.4 Cutânea difusa (LCD): A leishmaniose cutânea difusa está associada na maioria das vezes à infecção por *L. mexicana* e *L. amazonensis*. Lesões na mucosa geralmente não ocorrem sendo caracterizada por ampla distribuição de nódulos, pápulas, máculas e infiltração difusa na superfície da pele da face e membros. (WHO, 2010). A imunossupressão associada à leishmaniose cutânea difusa causada por outras espécies de *Leishmania* pode ocorrer em pacientes coinfectados com HIV ou com outras doenças, pessoas com outros tipos de imunossupressão (por exemplo, receptores de transplantes) apresentam características atípicas, como ulcerações. (VERMAET et al.,2012; BRASIL, 2017).

1.4.2. Leishmaniose Mucosa (LM): É caracterizada por lesões destrutivas, de evolução arrastada, em geral nas mucosas do nariz, boca, faringe e/ou laringe, causada pelo parasita da espécie *Leishmania braziliensis* (MOREIRA 1994). A LM pode ocorrer vários anos após a cicatrização da lesão cutânea primária (forma mucosa tardia) (LAINSON, 1983), embora possa ocorrer de forma isolada ou concomitante às lesões

cutâneas adjacentes ou à distância (SILVEIRA et al. 2009). Estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa (BRASIL, 2017).

1.4.3. Leishmaniose Cutânea Disseminada (LDi): Causada pelo parasito da espécie *Leishmania braziliensis* Foi primeiramente descrita clinicamente por Costa et al. (1986) e imunologicamente descrita por Turetz et al. (2002). Caracteriza-se por um número elevado (>10) de lesões cutâneas polimórficas (acneiformes, nodulares, ulceradas, papulosas, pustulosas), atingindo partes distintas, não contínuas do corpo, podendo ou não ser acompanhada de acometimento de mucosas em percentual variável de casos (TURETZ et al., 2002; MACHADO et al., 2011), e correspondendo a 2% dos casos (BRASIL, 2017)



Figura 8. Lesão típica de leishmaniose cutânea disseminada: Lesões polimórficas tipo placas infiltradas ulceradas distribuídas em todo corpo. Fonte: Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses INI – FIOCRUZ

1.4.4 Leishmaniose Visceral (LV): A LV é caracterizada em sua forma típica por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, associado a achados laboratoriais incluindo pancitopenia, leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, com intenso e difundido parasitismo em órgãos como fígado, baço e medula óssea. O período de incubação pode variar de dois a quatro meses. A doença

pode ter evolução aguda, subaguda ou crônica. Um espectro de manifestações clínicas ocorre na LV, que vai desde assintomática ou oligossintomática, com a possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes. É causada por *Leishmania (L.) donovani* nas Índias, tendo como reservatório os seres humanos e *Leishmania (L.) infantum* no Sudeste da Europa, na região do Mediterrâneo e nas Américas, incluindo o Brasil, tendo os canídeos como reservatórios domésticos (DESJEUX 2004; OLIVEIRA ET AL. 2004; WHO 2014)



Figura 9. Pacientes com leishmaniose visceral: Paciente apresentando hepatoesplenomegalia e icterícia. Fonte: Ministério da Saúde, 2014

O estudo de Leishmaniose Visceral (LV) em pacientes com o Vírus da Imunodeficiência Humana/ AIDS (HIV) tem grande relevância, visto que, comporta-se como uma infecção oportunista e demonstra substancial modificação no seu quadro clínico-evolutivo e nos índices de mortalidade em pacientes infectados pelo HIV. A relação entre vírus e protozoários na determinação da patogênese da coinfeção parece ser secundária à interação molecular dos dois agentes e à indução da resposta imune do hospedeiro por cada um desses com HIV/AIDS. (RABELLO, 2003)

A LV associada à infecção HIV habitualmente se manifesta em doentes com imunossupressão avançada. Em estudos anteriores, a quantificação do número de linfócitos CD4 nos coinfectados apresentou comprometimento moderado da imunidade celular, o número de linfócitos CD8 estava normal e a relação CD4/CD8 apresentou-se abaixo do normal. (IMPERATRIZ, 2012).

Dos 199 pacientes vivendo com HIV/AIDS, quatro (2,01%) apresentaram coinfeção *Leishmania*-HIV, destes, três pacientes apresentaram coinfeção mista *Leishmania (V.) sp* e *Leishmania (L.) amazonensis*, causadora de LTA, e um apresentou coinfeção com a *Leishmania (L.) chagasi*, causadora de LV, não sendo, entretanto, significativa a diferença entre estas frequências (IMPERATRIZ, 2012).

1.5. Infecções e Coinfecções

A infecção natural por diferentes espécies de *Leishmania* no mesmo indivíduo, especialmente em áreas de sobreposição de espécies, pode ser mais prevalente do que previamente relatado (BABIKER, 2014).

Esse tipo de infecção pode afetar o curso clínico diagnóstico e tratamento da doença, bem como casos de resistência de muitos pacientes, com elevado potencial de evolução para formas mais graves se não for diagnosticada e nem tratada corretamente (CELESTE, 2017).

Poucos estudos foram relatados sobre a infecção naturalmente mista com diferentes espécies ou cepas de *Leishmania* em pacientes imunocompetentes e o grau de detecção laboratorial de um fenômeno dessa natureza ainda não está claro (BABIKER et al., 2013)

Casos de coinfeção com duas espécies de *Leishmania* em diferentes países já foram relatados em seres humanos. No Brasil, as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foram encontradas em lesões diferentes de um paciente (SILVEIRA et al. 1984) e em outro relato, *L. braziliensis* e *L. donovani* encontradas em lesão cutânea e medula óssea respectivamente (OLIVEIRA NETO et al., 1986); no Quênia, um paciente diagnosticado com LV apresentou *L. donovani* e *L. major* na cultura de aspirado do baço (MEBRAHTU et al., 1991); em amostras de aspirado de linfonodos, quatro casos de coinfeção foram relatados em pacientes diagnosticados com LV, um paciente com *L. donovani* e *L. aethiopica*, e três com *L. donovani* e *L. major* no Sudão (IBRAHIM et al., 1994); no Iraque, *L. donovani* e *L. major* encontradas em medula óssea e lesão cutânea respectivamente (AL-DIWANY et al., 1995);

Além desses registros mais antigos, em trabalhos mais recentes já foram encontradas várias evidências de coinfeção, como na Bolívia em que um paciente com leishmaniose cutânea difusa apresentou *L. amazonensis* e *L. infantum* na mesma lesão,

explicando assim as características atípicas encontradas nas lesões cutâneas (MARTINEZ et al., 2002); infecção mista com duas cepas de *L. infantum* em amostras de medula óssea, que foi responsável por falha terapêutica na Grécia (ANTONIOU ET AL., 2004); no Irã foi encontrada *L. tropica* em lesão oral e *L. major* em lesão nasal (SHIRIAN et al., 2012); três pacientes do Sudão, diagnosticados com leishmaniose cutânea e sem sintomas de LV, apresentaram *L. donovani* e *L. major* em amostras de aspirado de lesão ulcerada localizada (BABIKER et al., 2014).

Foram relatados também alguns casos naturais de coinfeção em cães no Brasil. Madeira et al. (2005, 2006), relataram casos de cães com *L. braziliensis* encontrada em lesão cutânea e *L. infantum* no sangue, linfonodos e baço, no estado do Rio de Janeiro. Infecção mista com *L. infantum* em amostras de medula óssea e *L. braziliensis* em lesão no focinho e na pele da orelha, em Minas Gerais (QUARESMA et al., 2011); no Rio de Janeiro, *L. braziliensis* em lesão cutânea no focinho e *L. infantum* em fragmento do baço (SILVA et al. 2011) e *L. braziliensis* em lesão cutânea e *L. infantum* em fragmentos do baço e linfonodos (PIRES et al. 2014).

Soares et al. (2013) relataram em Minas Gerais o primeiro caso no mundo de infecção mista em cavalos (*Equus caballus*) naturalmente infectados por *L. infantum* e *L. braziliensis* encontradas tanto em amostras de aspirado de medula óssea como também em biópsia de lesões ulceradas. Mostrando também a capacidade de visceralização de *L. braziliensis*.

No Brasil, as espécies de *Leishmania* responsáveis pelas formas tegumentar e visceral da doença possuem ampla distribuição geográfica, principalmente *L. brasiliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. Existem áreas de sobreposição onde ocorrem casos autóctones tanto de LV causada por *L. infantum* quanto de LT causada por *L. amazonensis*, como por exemplo, a região Norte (Pará), região Nordeste (Bahia, Maranhão e Ceará), região Sudeste (Minas Gerais) e Centro-Oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) (BRASIL, 2017).

Em áreas de sobreposição de LV e LT o controle torna-se bem complexo, pois, no Brasil, a prevenção e vigilância são totalmente distintas para as duas formas clínicas, e devem se basear em métodos de diagnóstico parasitológico em conjunto com a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida, nesse sentido a detecção e compreensão dessas coinfeções é de grande importância (MADEIRA et al., 2006; SILVA et al. 2011; PIRES 2014), para o controle da doença atualmente.

O espectro clínico da leishmaniose exibida no hospedeiro nas infecções *L. chagasi* ou *L. amazonensis*, nos levar a pensar que tanto características e fatores do hospedeiro e do parasita estão envolvidos na viabilidade clínica da doença. Estudos que levem a compreensão do comportamento dessas espécies são de grande importância devido a essa diversidade clínica-epidemiológica em nosso país. (DAVID & CRAFT, 2009). Atualmente vários trabalhos vêm mostrando comportamentos viscerais em espécies de *L. amazonensis* que comumente desenvolvem características cutâneas da doença, levando a pensar em possível coinfeção com outras espécies de *Leishmania* especialmente *L. chagasi*. Essas hipóteses levantam uma série de questões em relação às espécies causadoras da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar, principalmente em áreas de sobreposição da ocorrência de *L. chagasi* e de *L. amazonensis*, que são espécies com ampla distribuição geográfica no Brasil (ANTONIOU et al. 2004).

Diante do exposto, desenvolvemos os seguintes questionamentos que nortearam esse trabalho: nos casos de coinfeção experimental com essas duas espécies, qual delas ou qual perfil de infecção será predominante? Se as duas espécies poderiam ser encontradas nas células do sistema mononuclear fagocítico concomitantemente, quais das cepas teriam maior taxa de infectividade e como as mesmas modificam a resposta imune durante a infecção *in vitro*?

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a resposta imune em macrófagos coinfectados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*.

2.2. Objetivo Especifico

- Avaliar taxa de coinfeção por *L. amazonensis* e *L. chagasi* em células RAW 264.7
- Quantificar a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por macrófagos infectados com uma ou mais espécies de *Leishmanias*
- Comparar e identificar as formas amastigotas das espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) chagasi* no interior dos macrófagos
- Quantificar as citocinas presentes no sobrenadante da cultura, por citometria de fluxo (CBA –*cytometric beads array*)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células RAW 264.7

As células da linhagem RAW 264.7 foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa de CO₂ a 37 °C. As células foram coradas com cristal violeta para contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico de luz comum, e ajustada na concentração de 1x10⁵ células/poço.

3.2. Parasito

As formas promastigotas de cepas *L. amazonensis* (MHOM/BR/1987/BA-125), marcadas com proteína verde fluorescente (GFP) e *L. chagasi* (MHOM/BR/1970/BH-46) foram cultivadas em meio Schneider suplementado com Soro Fetal Bovino a 10% e acondicionadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio a 27°C, e posteriormente foi feito a contagem em câmara de Neubauer e o ajuste na concentração de 1x10⁶ *Leishmania*/poço.

3.3. Infecção dos macrófagos com *Leishmania*

A suspensão de célula RAW 264.7 foi colocada em placa de 24 poços, com lamínula redonda, a uma concentração de 1x10⁵ células/ml por poço em um volume final de 500 µl, e foram mantidas por 2 horas em de CO₂ a 37 °C, para sua aderência na placa. Passada às 2 horas a placa foi lavada com Tampão fosfato Salino (PBS) para retirada das células não aderidas. Então foi adicionado meio com as duas espécies *L. amazonensis* e *L. chagasi* nos grupos coinfectados e apenas uma das espécies nos grupos controles, em uma proporção de 1 macrófago /10 *Leishmania*, mantendo-as em cultura por 4 horas em estufa de CO₂ a 37 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS para retirada do sobrenadante e realizado a contagem dos parasitos não fagocitados, através da câmara de Neubauer. Posteriormente as placas foram colocadas novamente em estufa de CO₂ a 37°C e mantidas em cultura em dois tempos, 24 e 48 horas, passado esse tempo às lamínulas foram retiradas para análise no microscópio de fluorescência, e contagem das amastigotas.

3.4. Confeções das lâminas e análise no microscópio de fluorescência

As lamínulas foram retiradas da placa de cultura, lavadas com água destilada, e posteriormente foram coradas com Giemsa 10%, por 10 minutos. Após 24hs, foi adicionado o glicerol à 50% nas lamínulas que foram seladas nas lâminas.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência (invertido NIKON®, modelo eclipse Ti-U) e do programa NIS-Elements advanced research (Nikon Corporation®, Japão) com sobreposição de imagens em campo claro e escuro. Esta sobreposição é realizada para diferenciar as espécies de *Leishmania* nas lâminas de coinfeção. A espécie *L. amazonensis* (GFP) quando estimulada no filtro *Emission Green Fluorescent Protein* (EGFP), esta proteína é excitada e visualizada em campo escuro. Enquanto que, *L. chagasi* não marcada é visualizada em campo claro.

Foram quantificados 100 macrófagos (infectado e não infectados) por lamínula e as amastigotas nos macrófagos infectados. E calculada a taxa de infecção (LIMA JUNIOR et al., 2014), segundo equação abaixo:

$$\text{Taxa de infecção} = \% \text{ macrófagos infectados} \times \frac{\text{Total de amastigotas}}{\text{Total de macrófagos}}$$

3.5. Dosagem de NO

Após os tempos de 24 e 48 horas, 50µL do sobrenadante foi retirado para realizar a dosagem de NO através da adição de 50µL do Reagente de Griess. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540nm (DING, 1988).

3.6. Dosagem de Peróxido

Após as 24 e 48hs de infecção foi retirado o sobrenadante da placa e adicionado o PBS. A placa foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em PBS, e foi adicionado o DHR (100nM); posteriormente incubada em estufa a 37°C, por 10 minutos, após o tempo de reação com o DHR, adicionou-se o estímulo do PMA (50 nM) nos poços pré- definidos e foram incubadas novamente por 60 min a 37 °C. A suspensão celular foi então lavada com PBS, centrifugada a 4°C, e ressuspenso em 200µL de PBS e as células foram lida em citômetro de fluxo. A leitura foi feita no canal

FL-1 ou Green, com os parâmetros de complexidade (SSC) e tamanho celular (FSC) definindo o *gate* de aquisição das células. (CHEN & JUNGER, 2012)

3.7. Dosagem de citocinas

Para a quantificação das citocinas IL-12, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e MCP-1 foi utilizada a técnica de Cytometric Bead Array (CBA), o ensaio citométrico de esferas ordenadas. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do Mouse Inflammation Kit, obtidos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA).

Foi transferido 25 μ L do sobrenadante da cultura de 24 e 48hs para a placa de 96 poços de fundo U. Em seguida foi adicionado 25 μ L de cada reagente “cytokine beads” para marcar a produção de cada citocina e 25 μ L de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE. Os tubos foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 2 horas protegidos da luz. Após o período de incubação, as amostras foram ressuspensas com 200 μ L de solução tampão. A placa foi centrifugada por 10 minutos à 1500 rpm e o sobrenadante descartado. As amostras foram então ressuspensas em 200 μ L de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

3.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software Inc.), utilizando o teste normalidade Komogorov-Smirnov seguido do teste ANOVA, para variáveis paramétricas ou seguido do teste de Kruskal-Wallis, para variáveis não-paramétricas. Em todos os casos os resultados foram considerados significantes quando, $p \leq 0,05$. Os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Taxa de infecção

Foi observado que tanto no período de 24h quanto de 48h, a taxa de infecção do grupo coinfectado com duas espécies de *Leishmania*, foi baixa em comparação a infecção somente por *L. amazonensis* ou *L. chagasi*. No grupo *L. amazonensis* a taxa de infecção foi maior nos dois períodos avaliados.

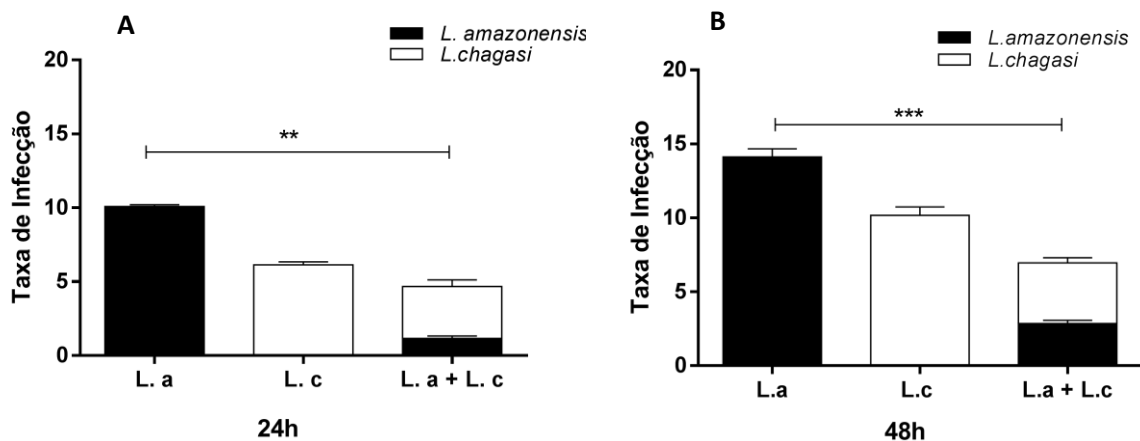


Figura 10. Taxa de infecção. Os macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 /poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e/ou *L. chagasi* (1×10^6 /poço) durante dois períodos. (A) Taxa de infecção por 24 horas. (B) Taxa de infecção por 48 horas. ** Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$ diferença entre os grupos.

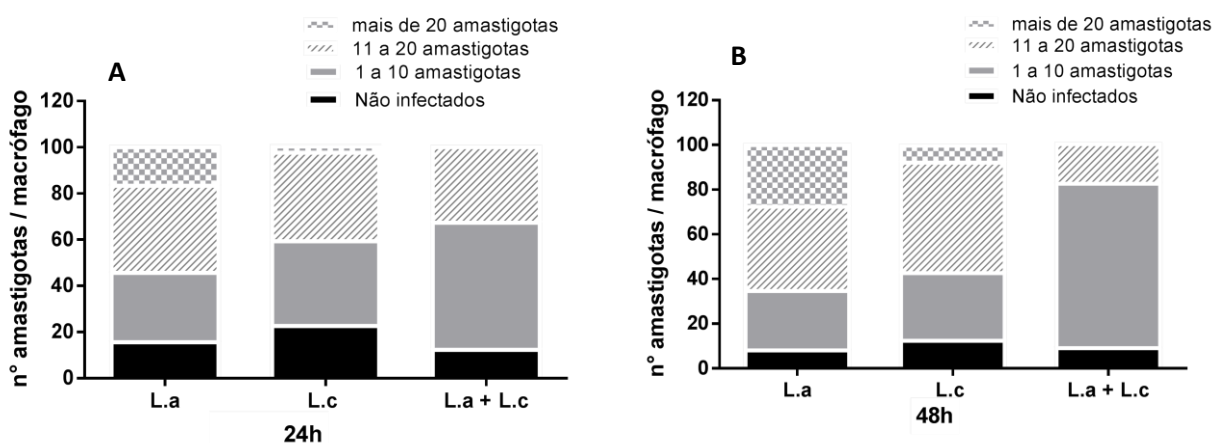


Figura 11 Número de amastigota na infecção. Macrófagos (RAW 264.7) coinfecados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. Os macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 /poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (1×10^6 /poço) durante dois períodos. (A) Número de amastigotas no interior do macrófago no período de 24h. (B) Número de amastigotas no interior do macrófago período de 48h. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, onde * indica $p < 0,05$ diferença entre os grupos.

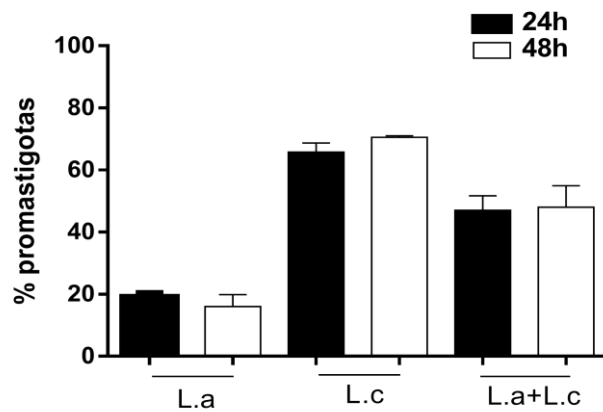


Figura 12. Porcentagem de promastigota não internalizadas. Macrófagos (RAW 264.7) coinfetados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. Os macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 /poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (1×10^6 /poço). Foi retirado o sobrenadante após 4h, para a verificação do promastigota não internalizadas, no período de 24h e foi retirado o sobrenadante após 24h, para a verificação do promastigota não internalizadas no período de 48h, e foi realizada a contagem. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$ diferença entre os grupos.

4.2. Imagem de macrófagos (RAW 264.7) infectados e coinfetados com promastigotas de *L. amazonensis* (GFP) e *L.chagasi*.

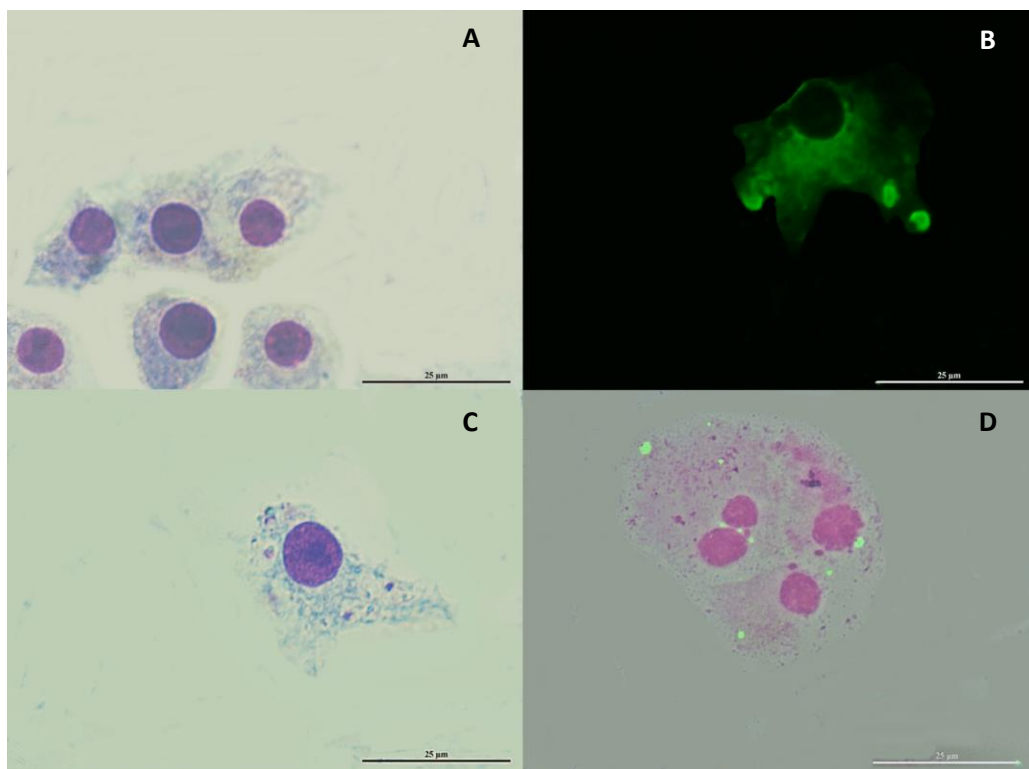


Figura 13. Imagem de macrófagos (RAW 264.7) infectados e coinfetados por promastigota de *Leishmania amazonensis*(GFP) e *Leishmania chagasi* no período de 24h: Macrófagos (RAW 264.7) infectados e coinfetados por *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Os macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 /poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (1×10^6 /poço). As lamínulas foram retiradas da placa de 24 poços, coradas com Giemsa e visualizadas através do MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA NIKON ECLIPSE TI. (A) Macrófagos (RAW 264.7) sem infecção; (B) Macrófagos (RAW 264.7) infectados por *L. chagasi*; (C) Macrófagos (RAW 264.7) infectados por *L. amazonensis*; (D) Macrófagos (RAW 264.7) coinfetados por *L. amazonensis*(GFP) e *L. chagasi*. Escala 25µm.

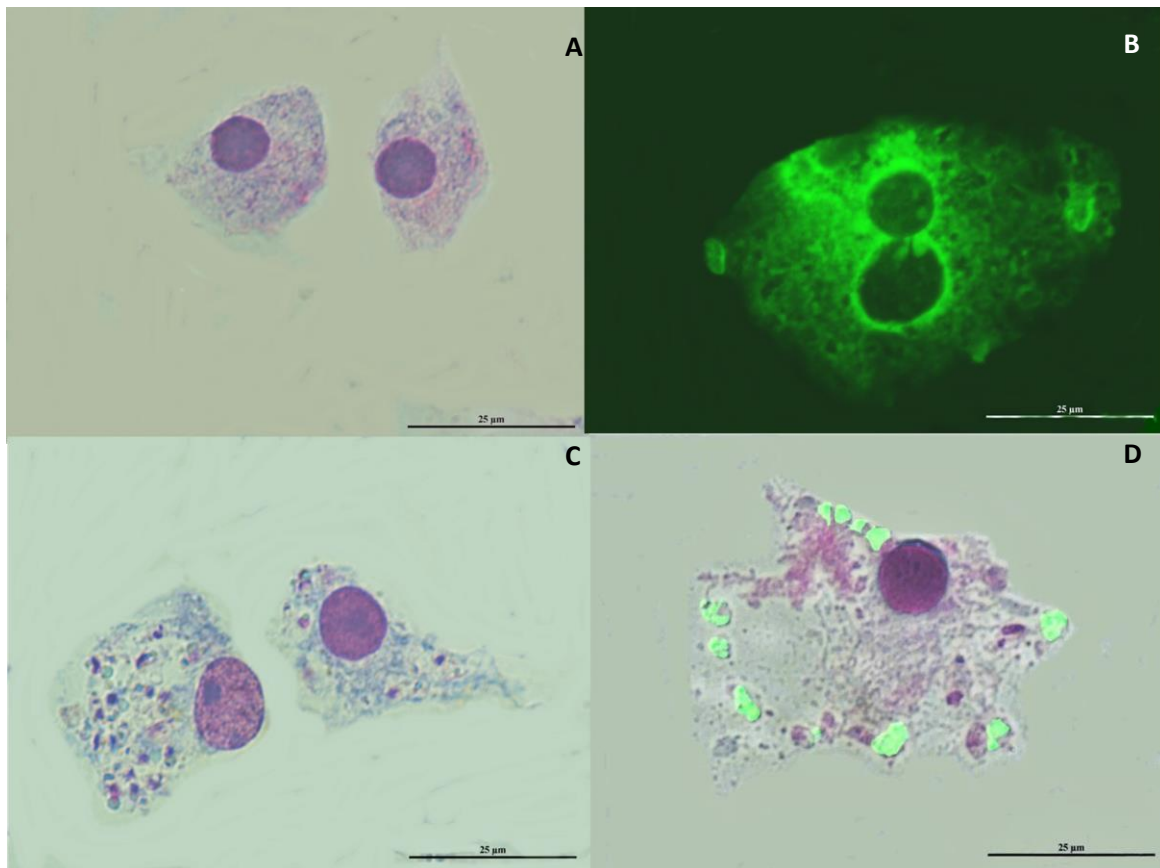


Figura 14. Imagem de macrófagos (RAW 264.7) infectados e coinfetados por promastigota de *Leishmania amazonensis* (GFP) e *Leishmania chagasi* no período de 48h: Macrófagos (RAW 264.7) infectados e coinfetados por *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Os macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 /poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (1×10^6 /poço). As lamínulas foram retiradas da placa de 24, coradas com Giemsa e visualizadas através do MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA NIKON ECLIPSE TI. (A) Macrófagos (RAW 264.7) sem infecção; (B) Macrófagos (RAW 264.7) infectados por *L. chagasi*; (C) Macrófagos (RAW 264.7) infectados por *L. amazonensis* (GFP); (D) Macrófagos (RAW 264.7) coinfetados por *L.*

4.2. Produção de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

A produção de óxido nítrico não foi detectada no sobrenadante das culturas. Porém quando avaliado a produção de peróxido de hidrogênio no período de 24h e 48h o grupo coinfetado teve produção menor, comparado ao grupo *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Analisando os grupos em relação ao período (Figura 13c) o grupo coinfetado aumentou a produção em 48h, ocorrendo o mesmo com o grupo *L. chagasi*.

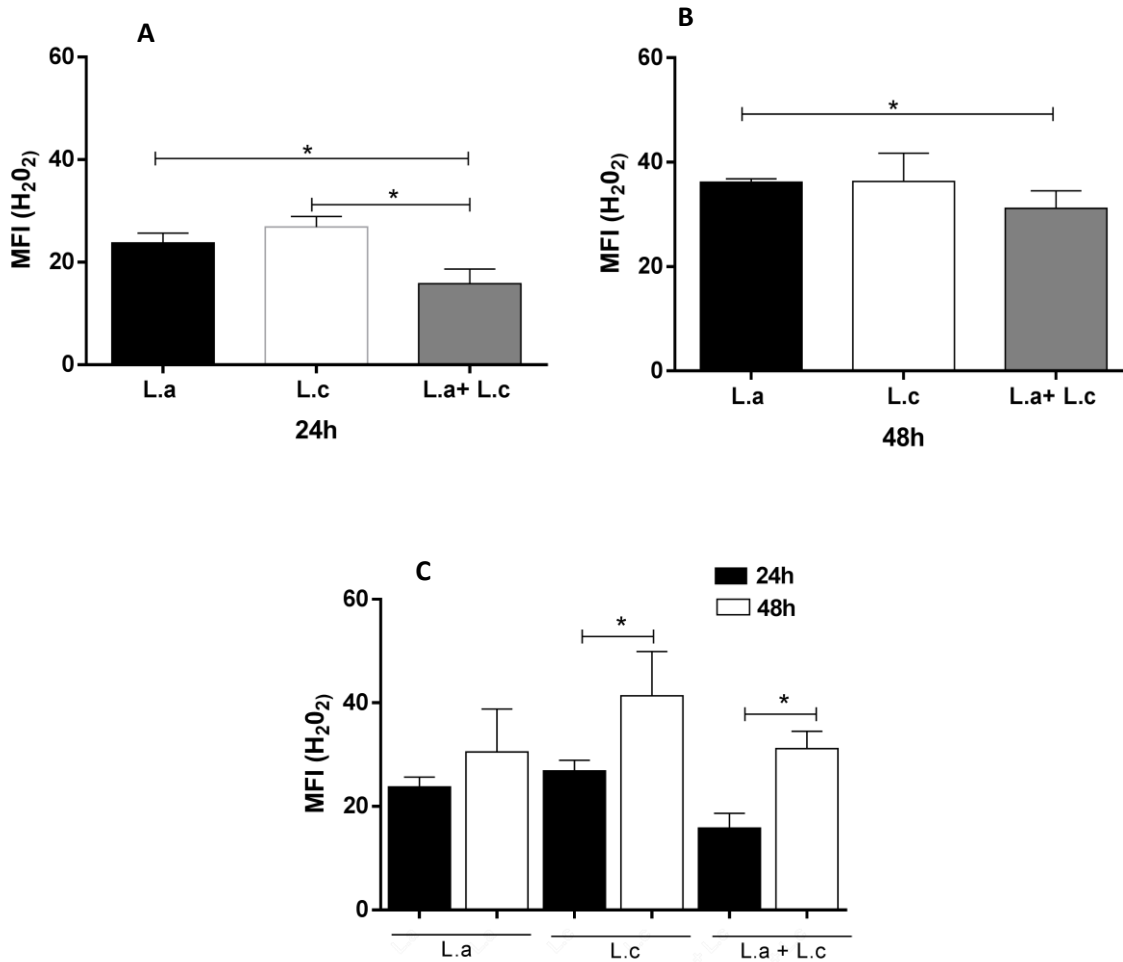


Figura 15. Produção de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os macrófagos RAW 264.7 (1x10⁵/poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e/ou *L. chagasi* (1x10⁶/poço). Em seguida foram marcados via DHR para avaliação da produção de H₂O₂. (A) Produção de H₂O₂ no período de 24h. (B) Produção de H₂O₂ no período de 48h. (C) Produção de H₂O₂ correlacionando os dois períodos. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, onde * indica p < 0,05 diferença entre os grupos.

4.3. Quantificação de citocinas

Quanto à quantificação das citocinas, foram detectadas de forma significativas no ensaio, apenas a produção de TNF- α no período de 24h assim como no de 48h no grupo coinfestado, que foi maior quando comparada ao grupo *L. chagasi*, comportamento semelhante ao grupo *L. amazonensis*. A produção de MCP-1 foi expressiva no grupo coinfestado, no período de 24h assim como no grupo *L. amazonensis*. No período de 48h todos os grupos demonstram elevada produção da citocina.

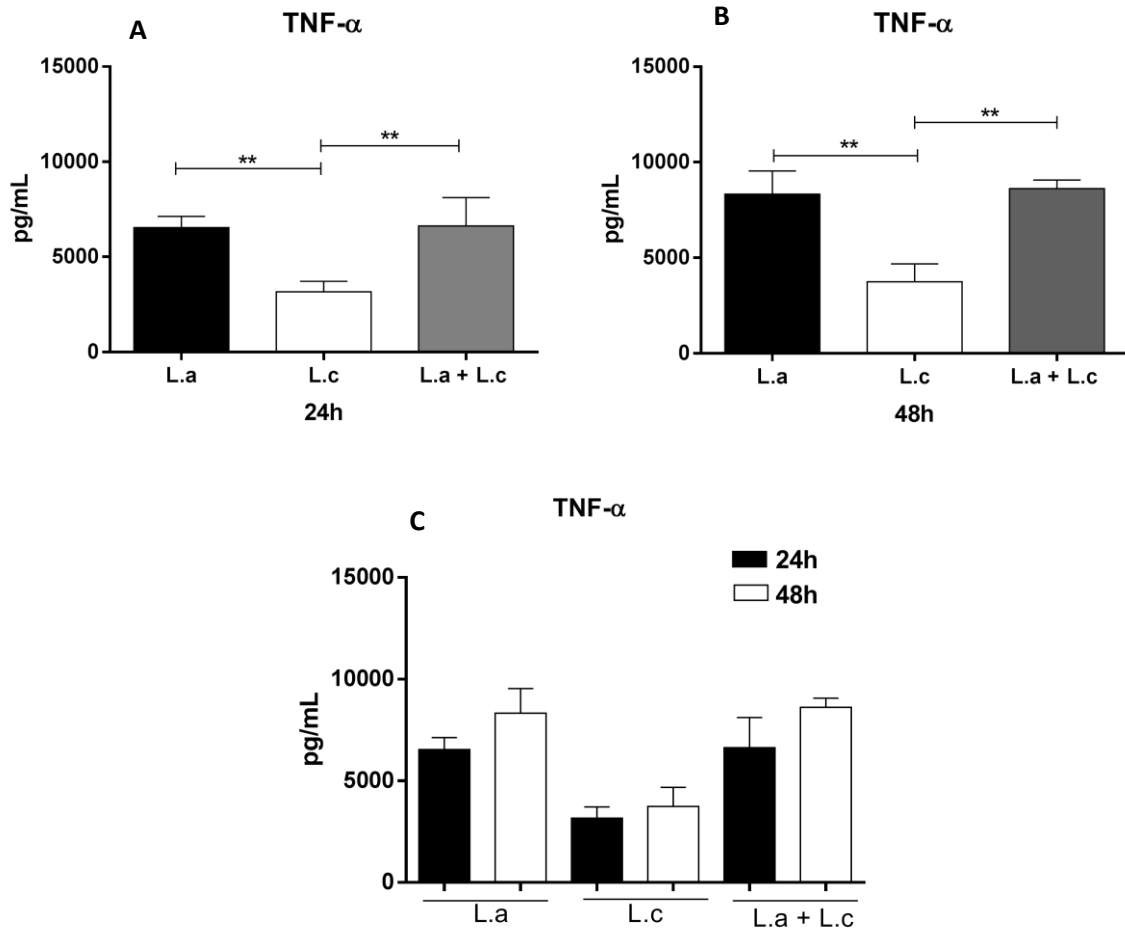
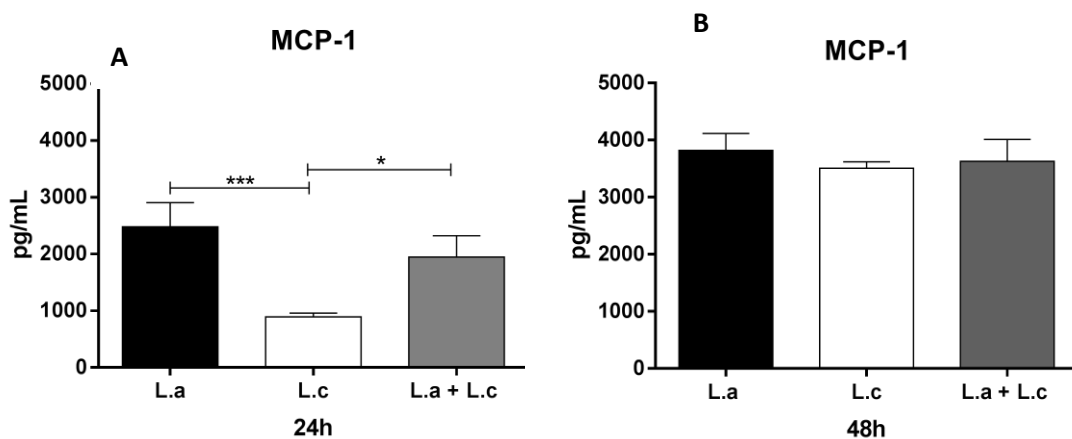


Figura 16. Quantificação de Citocinas TNF- α . Os macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 /poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e/ou *L. chagasi* (1×10^6 /poço) em dois períodos. O sobrenadante da cultura foi utilizado para quantificação de citocinas pela técnica de CBA. (A) Quantificação TNF- α em 24h. (B) Quantificação de TNF- α em 48h. (C) Quantificação de TNF- α correlacionado nos dois períodos. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$ diferença entre os grupos.



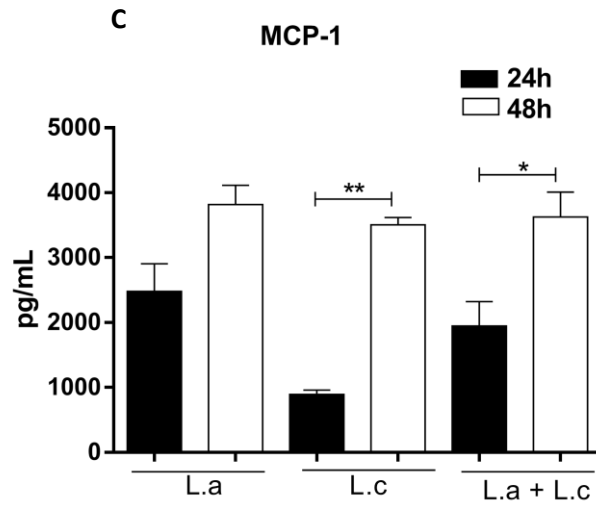


Figura 16. Quantificação de Citocinas MCP-1. Os macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 /poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e/ou *L. chagasi* (1×10^6 /poço) em dois períodos. O sobrenadante da cultura foi utilizado para quantificação de citocinas via técnica de CBA (A) Quantificação MCP-1 em 24h. (B) Quantificação de MCP-1 em 48h. (C) Quantificação de MCP-1 correlacionado nos dois períodos. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, onde * indica $p < 0,05$ diferença entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

A ocorrência e frequência de infecção natural com mais de uma espécie de *Leishmania*, especialmente onde focos em que duas espécies se sobrepõem, acredita-se ser mais prevalente do que relatado na literatura científica. A infecção por espécies *L. chagasi* e *L. amazonensis* como citado anteriormente, apresenta diversidade quanto à manifestação clínica, por conta do parasito, bem como do hospedeiro envolvido, e estes fatores estão diretamente ligados a variabilidade de quadros encontrados da doença, principalmente em áreas endêmicas (BABIKER, 2014).

O trabalho de AL-DIWANY e colaboradores (1995) foi um dos primeiros a descrever casos de coinfeção de LT e LV causadas pelas espécies *L. major* e *L. donovani* no Iraque, sendo essa sobreposição prevalente em várias regiões deste país.

Em teste *in vivo*, realizado em hamster (*Mesocricetus auratus*) foi observado que em macrófagos coinfectados com *L. amazonensis* e *L. infantum*, a espécie *L. amazonensis* foi uma das responsáveis por esplenomegalia precoce e lesões de pele no local do inóculo e nas lesões disseminadas, demonstrando uma possível visceralização da *L. amazonensis*. (CELESTE, 2015).

Nesta pesquisa, foi analisada a coinfeção diretamente em macrófagos murinos por *L. amazonensis* e *L. chagasi*, de forma que fosse possível ter um perfil da resposta imunológica diante dessa situação. Observamos que na avaliação da taxa de infecção, o grupo coinfectado não apresentou uma taxa expressiva quando comparado aos grupos com infecções única de espécie, como o grupo *L. amazonensis* que apresentou uma taxa de infecção maior, nos períodos de 24h e 48h. Embora, quando esse período se estendeu para 48h, o grupo coinfeção tenha se mostrado aumento na taxa de infecção, possivelmente em decorrência da semelhante proliferação das espécies isoladas.

Alguns trabalhos como Tolezano et al., 2007; Dias et al., 2011; Hoffmann et al., 2012, têm demonstrado o desenvolvimento de LV causada por *L. amazonensis* acometendo cães de área urbana nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Foi relatado que 68 animais com suspeita clínica de LV, todos positivos na sorologia e, com o isolamento de *Leishmania* a partir de medula óssea, foram encontrados por PCR-RFLP 39% de animais infectados por *L. amazonensis* e 61% infectados por *L. infantum*. Essa porcentagem elevada de animais infectados por *L. amazonensis* ficou acima do esperado, principalmente por ter sido identificada a partir de amostras isoladas de medula óssea, indicando visceralização (FONSECA et al., 2011).

No cultivo em laboratório de mais de uma espécie de *Leishmania*, trabalhos anteriores demonstraram que as espécies dominantes tendem a inibir o crescimento da outra, dificultando a detecção e compreensão do fenômeno da infecção mista. (BABIKER, 2014).

Casos de culturas mistas com espécies diferentes sugerem que a eliminação de uma espécie provavelmente ocorra porque elas são propensas a apresentarem crescimentos diferentes, ocasionando a seleção rápida. Assim, no momento em que um isolado se adapta à cultura e cresce em quantidade suficiente para permitir a caracterização, uma espécie originalmente presente pode se perder. Este pode ser um processo rápido, indicando que as infecções mistas naturais *in vivo* podem não ser detectadas devido à seleção em procedimentos de isolamento e caracterização. (ABREU-SILVA et al. 2004).

Se observarmos a taxa de infecção mista, é importante notar que *L. chagasi* se mostrou com maior infectividade, tanto no período de 24h, quanto de 48h, entretanto o grupo *L. amazonensis* isolado no período de 48h mostrou um aumento evidente da infecção, supondo que exista uma competição, que inicialmente *L. chagasi* se sobressai. A suposta competição presente no grupo coinfestado pode definir possivelmente a visceralização *in vivo* da espécie *L. amazonensis* como um mecanismo adaptativo.

Outros autores observaram *in vivo* coinfeção em uma mesma lesão e consideram que as características atípicas nas lesões da pele estejam relacionadas com a infecção mista. Acredita-se que a maior gravidade na coinfeção possa estar relacionada a diversos fatores como: o inóculo que foi dobrado, levando a uma exacerbação da doença com comprometimento sistêmico e maior disseminação; a presença de duas cepas virulentas que causam uma diversidade de manifestações clínicas em seus hospedeiros, além de ambas serem espécies viscerotrópicas. Além disso, a presença destas espécies em órgãos como o baço pode ser causador de uma imunossupressão no hospedeiro, levando à replicação descontrolada do parasito, comprometendo a função efetora dos macrófagos e tornando a doença mais grave, juntamente com o fato de ser utilizado um modelo experimental altamente susceptível a estas espécies (MARTINEZ ET AL. 2002).

Na presente pesquisa, foi verificada também, a produção de peróxido de hidrogênio nos macrófagos, através da marcação por DHR, onde os dados demonstraram produção no grupo de infecção única tanto de *L. chagasi*, quanto de *L. amazonensis*, nos dois períodos (24h e 48h). Entretanto, no grupo da coinfeção, no

período de 24 h a produção não foi expressiva, se comparada ao período de 48h, onde o grupo coinfestado demonstrou um aumento da produção de H_2O_2 . (Figura 11c). Esse aumento de H_2O_2 na coinfeção possivelmente deve estar ligada sobretudo a esta maior produção causada pela *L. chagasi*, que na infecção única mostrou comportamento semelhante.

Os macrófagos quando infectados por parasitos, se destacam pela variedade de mecanismos microbicidas para controlar e eliminar o agente intracelular, dentre estes destacamos a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio que são considerados principais mediadores leishmanicidas (BOGDAN, 2015).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um metabólito de oxigênio extremamente deletério devido a sua participação na reação que produz o radical OH (FERREIRA E MATSUBARA, 1997) e é formado a partir da dismutação do $z'O_2$, uma reação catalisada pela enzima dismutase de superóxido (SOD) (ASSCHE et al, 2011)

Durante o reconhecimento por receptores de membrana e consequente fagocitose do parasito, o “burst oxidativo” via NADPH oxidase é iniciado. Este mecanismo é de suma importância na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), onde destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que atua em componentes celulares do parasito, como proteínas e lipídios, além de causar aumento da permeabilidade da membrana e danos ao DNA que culmina na morte da *Leishmania* (SCOTT & NOVAIS, 2016).

O objetivo da agressão oxidativa do hospedeiro é eliminar a intrusão parasitária, mas sua produção persistente também pode levar a danos nos órgãos ou tecidos. Espécies reativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 , etc.) são potencialmente prejudiciais quando trazem modificação funcional e estrutural de proteínas, a peroxidação lipídica, que altera ainda mais a arquitetura ordenada das células. Esses radicais também ajudam na ativação da resposta inflamatória regulando tirosina e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e ativação de fatores transcricionais como NF- κ B, AP-1, que levam à produção de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias. (SRIVASTAVA, 2012)

Nesse sentido, a produção exagerada de H_2O_2 não é saudável para a célula, uma vez que a produção equilibrada possibilita maior reação da célula contra o patógeno, como sugerido diante dos resultados desta pesquisa.

Concentrações elevadas de H_2O_2 produzidos na fase de proliferação de *L. amazonensis*, podem estar indicando que esta molécula é importante para o parasita crescer. Atualmente, é aceito que os organismos não apenas se adaptaram para lidar com

espécies oxidantes, mas também desenvolveram mecanismos para fazer uso desses radicais livres (DRÖGE, 2002)

O fato é que o perfil imunológico do hospedeiro interfere fortemente na resistência ou suscetibilidade à infecção. O equilíbrio entre a ativação de linfócitos e macrófagos leva ao controle da infecção e o desequilíbrio frequentemente determina a taxa de sobrevivência dos parasitos dentro dos macrófagos (LIU e UZONNA, 2012; MENEZES et al., 2015).

Já foi mostrado que o aumento da produção de citocinas como IL-6 e TNF- α durante a infecção por espécies de *Leishmania sp.* é induzido via degradação da GP63, sendo esta uma das moléculas relacionadas a virulência, muito abundante na superfície celular do parasito (OLIVIER et al., 2012). Essas citocinas desempenham função no recrutamento, assim como a quimiocina MCP-1, e na ativação celular de fagócitos para o sítio inflamatório, o que pode favorecer a infecção de novas células na fase aguda principalmente em modelos *in vivo* (DUQUE & DESCOTEAUX, 2015).

Quando avaliamos a quantificação de citocinas anti e pró-inflamatórias, damos destaque a produção de TNF- α , onde foi observada produção acentuada nos grupos coinfectado e *L. amazonensis*, em comparação com o grupo *L. chagasi*, tanto no período de 24h, quanto no de 48h. Já o MCP-1 foi verificado também uma produção expressiva no grupo coinfectado e no grupo *L. amazonensis* no período de 24h. E no período de 48h, a produção desta citocina foi elevada em todos os grupos, mas sem diferença estatística entre eles.

Trabalhos anteriores avaliando perfil da leishmaniose visceral, realizado com sobrenadante de culturas *in vitro* de macrófagos oriundos dos linfonodos de cães infectados pelo parasito, mostrou baixa atividade de arginase, enquanto que prostaglandina em maior concentração, sugerem a predominância de macrófagos M1 na resposta imune e conseqüentemente o aumento da citocina inflamatória TNF- α (VENTURIN et al., 2016)

Com relação ao perfil de resposta para *L. amazonensis*, responsável pela Leishmaniose Cutânea (LC), apresenta-se de forma mais complexa, visto ser um perfil mediado por linfócitos Th1/Th2 diferindo das espécies presentes na Eurásia e África, o que dificulta os estudos para tratamento e controle da LC (BOGGIATTO et al., 2009). O controle da infecção por *L. amazonensis* ainda é muito controverso, pois assim como em humanos, camundongos infectados por este parasito apresentam uma resposta

atenuada e mista, onde vale ressaltar que estes perfis de resposta mediados por células T estão diretamente relacionados a polarização de macrófagos para perfis “clássicos” (M1) ou “alternativos” (M2), respectivamente (SOOG, 2012) (MILLS & LEY, 2014).

Macrófagos infectados com *L. amazonensis*, mesmo na presença de IFN- γ e TNF, não conseguem eliminar os parasitos. Isso acontece, provavelmente, pois no caso dessa espécie há formação do vacúolo parasitóforo, o que pode comprometer a ação leishmanicida do NO e das espécies reativas de oxigênio (ROS). Recentemente, relatou-se que a infecção por *L. amazonensis* dificulta a migração de células dendríticas do sítio de infecção para os linfonodos drenantes. Esses modelos de suscetibilidade estão ligados a uma baixa quantidade de citocinas como IFN- γ , IL-10 e IL-17, sendo que esse cenário inicial pode ser crucial para a sobrevivência do parasito e para a manutenção da carga parasitária (HERMIDA, 2014)

Já MCP-1, por exercer um efeito quimioatraente sobre populações de linfócitos T CD4+, em altas concentrações pode ativar mecanismos que eliminam espécies de *Leishmania*, como eliminação parasitária em macrófagos humanos infectados por *L. infantum*, pela indução de reativos intermediários do oxigênio ou via a produção de óxido nítrico, pelo macrófago ativado (DEY et al. 2007).

Observou-se que o comportamento das espécies na coinfeção *in vitro* se mostrou complexo, visto que *in vivo* pode ser bastante diferente, mesmo se falando em um ambiente controlado, contudo os resultados até aqui mostraram que a relação das espécies na infecção mista possivelmente seja de competição, embora o perfil da resposta destes macrófagos tenha sido semelhante ao de infecção simples por *L. amazonensis*. Dessa forma, se faz necessárias análises posteriores para elucidar possíveis dúvidas em relação ao contexto de coinfeção de duas espécies de *Leishmania*.

CONCLUSÃO

- Na coinfeção a espécie que se mostrou mais prevalente inicialmente foi *L. chagasi*, entretanto supõem-se que houve um comportamento competitivo entre as espécies.
- A capacidade infectiva de *L. amazonensis* mostrou ser maior quando avaliada individualmente, enquanto a produção de TNF- α , citocina inflamatória, mostrou-se expressiva neste grupo e no grupo coinfectado nos dois períodos avaliados.
- O perfil da resposta imune das células coinfectadas se mostrou complexo, uma vez que notou-se maior taxa de infecção de *L. chagasi*, com características de respostas semelhante a infecção por *L. amazonensis*

REFERÊNCIA

ABDULLAH, S.M.; FLATH, B.; PRESBER, W. **Mixed infection of human U-937 cells by two different species of *Leishmania***. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1998.

ABREU-SILVA AL, CALABRESE KS, CUPOLILO SMN, CARDOSO FO, SOUZA CSF, GONÇALVES DA COSTA SC **Histopathological studies of visceralize *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected**. Vet Parasitol. 2004.

AL-DIWANY LJ, AL-AWKATI NA, ATIA M, RASSAM MB. **Concomitant natural infection with *L. donovani* and *L. major*: a case report from Iraque**. Journal Sozial- Und Praventivmedizin . 1995

ALEMAYEHU, B., & ALEMAYEHU, M. **Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host**. Health Science Journal, 2017.

ALVAR J, CAÑAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. **Canine leishmaniasis**. Adv Parasitol. 2004

ALVARENGA, D.G.; ESCALDA, P.M.F.; COSTA, A.S.V.; MONREAL, M.T.F.D. **Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados a letalidade**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2010

ANTONIOU M, DOULGERAKIS C, PRATLONG F, DEDET JP, TSELENTIS Y **Short report: treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite *Leishmania infantum***. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2004.

AZEREDO-COUTINHO, R.B.; MENDONÇA, S.C.F. **Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas**. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. (Ed). **Leishmanioses do Continente Americano**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

BABIKER AM, RAVAGNAN S, FUSARO. **Concomitant Infection with *Leishmania donovani* and *L. major* in Single Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Patients from Sudan**. Journal of Tropical Medicine.2014.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A. **Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients**. InfecImmun. 2002.

BATES, P. A., J. DEPAQUIT, E. A. GALATI, S. KAMHAWI, M. MAROLI, M. A. MCDOWELL, A. PICADO, P. D. READY, O. D. SALOMON, J. J. SHAW, Y. M. TRAUB-CSEKO AND A. WARBURG. **Recent advances in phlebotomine sand fly research related to Leishmaniasis control**. Parasit Vectors 2015.

BOGDAN, C.. **Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update**. Trends In Immunology, 2015.

BOGGIATTO, P. M., JIE, F., GHOSH, M., GIBSON-CORLEY, K. N., RAMER-TAIT, A.E., JONES, D. E., & PETERSEN, C. A. **Altered Dendritic Cell phenotype in response to *Leishmania amazonensis* amastigote infection is mediated by MAP Kinase, ERK.** *The American Journal Of Pathology*, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas**, 1990 a 2011. 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 edição. Atualizada. Brasília, 2017.

CARNEIRO M, MORAIS MHF, ARAÚJO VEM, MENEZES FC, FIUZA VOP, ASSUNÇÃO RM. **Avaliação e aperfeiçoamento de sistema de informação sobre o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral e estudo de fatores associados à infecção e ao óbito em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.** *Gerais: Rev Saude Publica SUS/MG*. 2013; 1(1): 65-6.

CASTRO GOMES, C.M.; SOUZA, M.G.T.; MENEZES, J.P.B. **Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania (Viannia) spp*** . in *Amazonian Brazil*. 2017.

CAVALCANTE, ÍTALO JOSÉ MESQUITA; VALE, MARCUS RAIMUNDO. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011.** *Revista Brasileira Epidemiologia*. 2014

CELESTE, JORDANNA LUÍZA DE LIMA; MOURA, ANA PAULA VENUTO MOURA, FRANÇA-SILVA, JOÃO CARLOS. Dissertação. **Experimental mixed infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*).** Cambridge University Press. 2015

CHAN, M. M., ADAPALA, N., & CHEN, C. **Peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated polarization of macrophages in *Leishmania* infection.** *Ppar Research*, 2012.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; COUTINHO, S.G. A Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. (Ed). **Leishmanioses do Continente Americano**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; DA COSTA-SANTOS, M.. ***Leishmania braziliensis* and in situ immune response: dispute or partnership?** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010.

COTA, G. F.; SOUSA, M. R. DE; FEREGUETTI, T. O. **The Cure Rate after Placebo or No Therapy in American Cutaneous Leishmaniasis : A Systematic Review and Meta-Analysis.** 2016.

COUTINHO, ALAN CÁSSIO CARVALHO; DA SILVA, ELZA LIMA; CALDAS, ARLENE DE JESUS MENDES. **Análise dos casos e óbitos por leishmaniose visceral no estado do Maranhão, no período de 2000 a 2008/ casos e mortes por leishmaniose visceral no estado do Maranhão, de 2000 to 2008.** Revista de Pesquisa em Saúde, 2012.

CUNHA AM, CHAGAS E. **Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp.** Nota prévia. Hospital (Rio J) 1937;

DAVID, C. V. & CRAFT, N. **Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** Dermatologic Therapy, Vol. 22. 2009.

DESJEUX P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** Journals Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 2004.

DEY, R.; MAJUMDER, N.; BHATTACHARYYA MAJUMDAR, S.; BHATTACHARJEE, S.; BANERJEE, S.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. **Induction of Host Protective Th1 Immune Response by Chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c Mice.** Scandinavian Journal of Immunology, Stockholm, , 2007

DING, AIHAO H.; NATHAN, Carl F.; STUEHR, DENNIS J. **Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production.** The Journal of Immunology, 1988.

DRÖGE W. **Radicais livres no controle fisiológico da função celular,** Physiol. Rev.,2002

DUQUE, A.; DESCOTEAUX, A. **Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means.** Curr. Opin. Microbiol, 2015. Elsevier BV.

FERREIRA,A.L.A., MATSUBARA L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo** Rev. Assoc. Med. Bras. vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997

FONSECA AM, CELESTE JL, FRANÇA-SILVA JC. **Caracterização das espécies de *Leishmania* em amostras coletadas de cães infectados no município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil.** Apresentado na XXVII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e XV Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 26-28 de outubro de 2011.

GARCÍA-ALMAGRO D. **Cutaneous leishmaniasis,** Actas Dermosifiliogr. 2005
GREEN, S.J.. ***Leishmania* major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha.** J Immunol. 1990.

HARHAY MO, OLLIARO PL, COSTA DL, COSTA CH. **Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil.** Trends Parasitol. 2011;

HERMIDA, M. D., DORIA, P. G., TAGUCHI, A. M., MENGEL, J. O., DOS-SANTOS, W. **Leishmania amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node.** BMC Infect Dis , 2014

IBRAHIM, M. E. SMYTH, A. J. ALID, M. H. BARKER, D. C. AND KHARAZMI, A. **The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with Leishmania parasites,** Acta Tropica.1994.

IMPERATRIZ. **Programa municipal de DST/Aids no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA). Imperatriz, 2012.**

KAYE P, SCOTT P. **Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface.** Nat Rev Microbiol. 2011

LAINSON, R. **The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983.

LAINSON, RALPH; RANGEL, ELIZABETH F. **Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review .** Memoria Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

LIMA-JUNIOR D, COSTA D, CARREGARO V, CUNHA L, SILVA A, MINEO T, GUTIERREZ F, BELLIO M, BORTOLUCI K, FLAVELL R, BOZZA M. **Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania.** Nature Medicine, , 2013.

LIMA-JUNIOR D, COSTA D, CARREGARO V, CUNHA L, SILVA A, MINEO T, GUTIERREZ F, BELLIO M, BORTOLUCI K, FLAVELL R, BOZZA M. **Inflammasome derived IL-1 β production induces nitric oxide mediated resistance to Leishmania.** Nature Medicine, 2013.

LIU, Y. C., ZOU, X. B., CHAI, Y. F., & YAO, Y. M. **Macrophage polarization in inflammatory diseases.** International Journal of Biological Sciences, 2014

LUTZ, A. & NEIVA, A. – **Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero Phlebotomus existentes no Brasil.** Memoria Instituto Oswaldo Cruz, 1912

MACHADO, NATHÁLIA ROCCO-, GOMES DANIELA COSENTINO-, - FERNANDES JOSÉ ROBERTO MEYER. **Modulação de Na⁺/K⁺ ATPase Activity pelo peróxido de hidrogênio gerado através de heme em L. amazonensis** 2014.

MADEIRA MF, SCHUBACH A, SCHUBACH TPM, PACHECO RS, OLIVEIRA FS, MARTINEZ E, MOLLINADO S, TORREZ M, MUÑOZ M, BAÑULS AL, LE PONT F. **Coinfection by Leishmania amazonensis and L. infantum /L. chagasi in a case of diffuse cutaneous Leishmaniasis in Bolivia.** Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2002.

MASPI, N; ABDOLI, A. & GHAFARIFAR, F. Artigo de revisão. **Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis** . October, 2016.

MATLASHEWSKI, G. **Leishmania infection and virulence**. Medical Microbiology and Immunology. 2001

MEBRAHTU YB, LAWYER PG, HENDRICKS LD, MUIGAI. **Concurrent infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania major* in a Kenyan patient: Clinical description and parasite characterization**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1991

MENDONÇA, S.C. **Human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy**. ClinExpImmunol. 1986.

MENEZES, JA; FERREIRA, EC; ANDRADE-FILHO, JD; SOUSA, AM; MORAIS, MHG; ROCHA, AMS; MACHADO-COELHO, GLL; LIMA, FP; MADUREIRA, AP; GARCIA, TC; FREITAS, CR; SOARES, RP; MARGONARI, C. **An integrated approach using spatial analysis to study the risk factors for leishmaniasis in area of recent transmission**. BioMed Research International, 2015.

MILLS, C. D., THOMAS, A. C., LENZ, L. L., & MUNDER, M. Macrophage: SHIP of Immunity. Frontiers in Immunology, 2014.

MILLS, C. D.. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. Frontiers in

MILLS, C. D.; LEY, K. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, Ministério da Saúde. 2017

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, Ministério da Saúde, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, Ministério da Saúde 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – 2. ed. atual. – Brasília 2017**.

MOURA, G. S. **Factors associated with asymptomatic infection in family members and neighbors of patients with Visceral Leishmaniasis**. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, Dezembro, 2012.

MS – Ministério da Saúde. **Vigilância de A a Z - Leishmaniose Visceral**, 2014.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M.J. **Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites**. EssaysBiochem. 2011.

OLIVEIRA CI. **Animal models for infectious diseases caused by parasites: leishmaniasis.** Drug Discovery Today - Journal: Disease Models. 2004

OLIVEIRA NETO MP, MARZOCHI MC, GRIMALDI JÚNIOR G, PACHECO RS, TOLEDO LM, MOMEN H. **Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1986.

OLIVIER, M., ATAYDE, V. D., ISNARD, A., HASSANI, K., & SHIO, M. T. **Leishmaniavirulence factors: focus on the metalloprotease GP63.** *Microbes and Infection*, 2012..

PACHECO R. S., GRIMALDI G. J'UNIOR, AND MOREL, C.M., **Inhibition of growth of *Leishmania mexicana mexicana* by *Leishmania mexicana amazonensis* during “in vitro” co-cultivation,** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1987

PEREIRA SA. **Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro.** *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005.

PIRES MQ, MADEIRA MF, BITTENCOURT VP, PACHECO RS. **Cutaneous and visceral leishmaniasis coinfection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014.

QUARESMA PF, RÊGO FD, BOTELHO HA, SILVA SR, JÚNIOR AJM, NETO RGT, MADEIRA FM. **Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil.** *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011.

RABELLO A, ORSINI M, DISCH J. ***Leishmaniose/HIV co-infection in Brazil: na appraisal.*** *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 2003.

REBÊLO, J. M. M., OLIVEIRA, S. T. de, SILVA, F. S., BARROS, V. L. L., COSTA, J. M. L., **Sandflies (diptera: psychodidae) of the Amazônia of Maranhão. V. Seasonal Occurrence in ancient colonization area and Endemic for cutaneous leishmaniasis.** *Revista Brasileira de Biologia*. 2001

REED, S. G.; SCOTT, P. **T-cell and cytokine responses in leishmaniasis.** *Current Opinion in immunology* 1993

RIBEIRO-DE-JESUS, A. **Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis.** *Braz J Med Biol res*. 1998.

ROGERS MB, DOWNING T, SMITH BA, IMAMURA H, SANDERS M, SVOBODOVA M, VOLF P, BERRIMAN M, COTTON JA, SMITH DF. **Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population.** *PLOS Genetics*. 2014.

SACKS, D. AND S. KAMHAWI. **Molecular aspects of parasite-vector and vectorhost interactions in Leishmaniasis.** Annu Rev Microbiol 55: 453-483. 2001

SANTOS, JAMILE PRADO DOS. **Leishmaniose visceral no município de Bom Jesus, Piauí, Brasil.** Acta Veterinaria Brasilica 2015.

SCLEIN, Y, . **Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission.** Parasitology Today. 1993.

SCOTT , P. & NOVAIS F.O. **Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis.** Nature Reviews Immunology, 2016.

SHIRIAN S, ORYAN A, HATAM GR, DANESHBOD Y., **Mixed Mucosal Leishmaniasis Infection Caused by Leishmania tropica and Leishmania major.** Journal of Clinical Microbiology. 2012

SILVA DA, MADEIRA MF, TEIXEIRA AC, DE SOUZA CM, FIGUEIREDO FB **Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program.** Journal Veterinary Parasitology Journal 2011.

SILVA R.B.S., MENDES R.S., SANTANA V.L., SOUSA H.C., RAMOS C.P.S., SOUSA A.P., ANDRADE P.P. & MELO M.A. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico.** Pesq. Vet. Bras. 2016.

SILVEIRA FT, LAINSON R, CORBETT C. **Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the 93 Disease in Amazonian Brazil – A Review.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004.

SILVEIRA FT, LAINSON R, SHAW JJ, RIBEIRO RSM. **Leishmaniose cutânea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de Leishmania: Leishmania braziliensis e Leishmania mexicana amazonensis.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1984

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. **Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review ,** 2004.

SILVEIRA, F.T; CORBETT, C. E.P. **Leishmania chagasi Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão.** Artigo de revisão, Rev Pan-Amaz Saude, 2010

SOARES IR, SILVA SO, MOREIRA FM. **First evidence of autochthonous cases of Leishmania (Leishmania) infantum in horse (Equuscaballus) in the Americas and mixed infection of Leishmania infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis.** Veterinary Parasitology. 2013

SOONG, L. **Subversion and Utilization of Host Innate Defense by Leishmania amazonensis.** Frontiers In Immunology, 2012.

SOUZA, M.A.; CASTRO, M.C.; OLIVEIRA, A.P. et al. **American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy.** Scand J Immunol. 2012.

SRIVASTAVA A, SINGH N, MISHRA M. **Identificação de TLR induzindo antígenos específicos de amastigotas *Leishmania donovani* responsivos a Th1 .** Mol Cell Biochem. 2012.

TALMI-FRANK, D., NASEREDDIN, A., SCHNUR, L. F., SCHÖNIAN, G., TÖZ, S. O., JAFFE, C. L & BANETH, G, **Detection and Identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis.** PLOS Neglected Tropical Diseases. 2010.

TUON FF, AMATO VS, BACHA HA, ALMUSAWI T, DUARTE MI, NETO VM. **Toll-like receptors and leishmaniasis.** Infection and Immunity. 2008.

TURETZ, M.; MACHADO, P.R.; KO. **Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil.** The Journal of

VAN ASSCHE, MAARTJE DESCHACHT. Artigo de revisão. **Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology.**Laboratory of Microbiology Parasitology, and Hygiene, University of Antwerp. Antwerp, Belgium 2011.

VENTURIN , B. F. M, CHIKU, V. M., SILVA, K. L. O., DE ALMEIDA, G. L., LEAL, A. A. C., DE MARTINI, C. C. DE LIMA, V. M. F. **PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis.** Immunobiology, 2016

VERMA, G. K. **A rare case of diffuse cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient from sub-Himalayan India.** Tropical doctor, 2012.

VERMA, SANDEEP. **Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis.** PLoS One, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** WHO p. 201. 2014

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** WHO p. 201. 2015

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** WHO p 2010.