



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARILIA BERGAMINI VALENTINI

PARASITISMO SIMULTÂNEO POR *SCHISTOSOMA MANSONI* E
LEISHMANIA AMAZONENSIS EM MODELO MURINO:
COINFECÇÃO OU COABITAÇÃO?

CAMPINAS
2019

MARILIA BERGAMINI VALENTINI

**PARASITISMO SIMULTÂNEO POR *SCHISTOSOMA MANSONI* E
LEISHMANIA AMAZONENSIS EM MODELO MURINO: COINFECÇÃO OU
COABITAÇÃO?**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra
em Biologia Animal, na Área de Relações Antrópicas,
Meio Ambiente e Parasitologia.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
MARILIA BERGAMINI VALENTINI E ORIENTADA PELA
PROF.^a DR.^a SILMARA MARQUES ALLEGRETTI.

Orientadora: PROF.^a DR.^a SILMARA MARQUES ALLEGRETTI
Coorientador: PROF. DR. DANILO CICCONE MIGUEL

**CAMPINAS
2019**

Agência de fomento: CAPES.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

V234p Valentini, Marília Bergamini, 1992-
Parasitismo simultâneo por *Schistosoma mansoni* e *Leishmania amazonensis* em modelo murino : coinfeção ou coabitação? / Marília Bergamini Valentini. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Silmara Marques Allegretti.
Coorientador: Danilo Ciccone Miguel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Coinfeção. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. *Leishmania amazonensis*. I. Allegretti, Silmara Marques, 1963-. II. Miguel, Danilo Ciccone, 1984-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Schistosoma mansoni* and *Leishmania amazonensis* simultaneous parasitism in murine model: coinfection or co-habitation?

Palavras-chave em inglês:

Coinfection

Schistosoma mansoni

Leishmania amazonensis

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Silmara Marques Allegretti [Orientador]

Selma Giorgio

Veronica de Lourdes Sierpe Jeraldo

Data de defesa: 30-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5995-6734>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7235772702297639>

Campinas, 30 de agosto de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Silmara Marques Allegretti

Prof.^a Dr.^a Selma Giorgio

Prof.^a Dr.^a Veronica de Lourdes Sierpe Jeraldo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa de mestrado.

Aos meus colegas do Laboratório de Helminologia e do LEBIL, por sempre terem me dado todo o suporte necessário durante as experimentações.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, por todo o conhecimento transmitido e por terem tornado a parasitologia ainda mais apaixonante.

À Prof.^a Alexandra Ivo de Medeiros e à Leticia do ImunoLab da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus Araraquara pelo acolhimento e colaboração com toda a parte imunológica deste trabalho.

À Prof.^a Silmara e ao Prof. Danilo por terem confiado a mim este projeto.

Agradeço imensamente aos meus pais por toda a base e estrutura que sempre me ofereceram. E, à todos os meus amigos que de alguma forma me deram forças pra me manter de pé e com a cabeça no lugar.

Resumo

Existe uma sobreposição na distribuição epidemiológica do helminto *Schistosoma mansoni* e de algumas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* em vários países da África, América Central e América do Sul, incluindo o Brasil. Em virtude dessa extensa sobreposição geográfica, *S. mansoni* e espécies de *Leishmania* podem, ocasionalmente, coinfectar os mesmos indivíduos. Apesar de predominantes em muitas partes do mundo, relativamente pouco se conhece sobre as coinfeções parasitárias e os impactos que uma infecção latente pode causar na capacidade do hospedeiro em responder a um parasito recém adquirido. O presente projeto avaliou os efeitos da presença simultânea do helminto *Schistosoma mansoni* e do protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em modelo de camundongo BALB/c levando em conta parâmetros de caracterização da progressão das doenças comparando os grupos de infecções controle com os grupos de estudo, de modo a estabelecermos se a presença de um dos parasitos alterou o perfil de infecção do outro patógeno (modelo de coinfeção) ou se as espécies não causam interferências nos cursos da infecção uma da outra (modelo de coabitação). Fatores como a ordem da infecção e o intervalo de tempo entre a infecção pelo primeiro parasito e a infecção pelo segundo parecem ter influência nos efeitos causados no hospedeiro, porque foram observadas diferenças no curso da leishmaniose quando a infecção por *S. mansoni* sucedeu a infecção por *L. (L.) amazonensis* e também no curso da esquistossomose quando a infecção por *L. (L.) amazonensis* sucedeu a infecção por *S. mansoni*.

Palavras-chave: coinfeção; *Schistosoma mansoni*; *Leishmania amazonensis*.

Abstract

There is a geographic overlapping between the helminth *Schistosoma mansoni* and some protozoan species of the genus *Leishmania* in several countries from Africa, Central America, and South America, including Brazil. Due to this extended geographic overlapping, *S. mansoni* and *Leishmania* species may, occasionally, coinfect the same individuals. Although predominant in several parts of the world, little is known about parasitic coinfections and the impacts that a latent infection may cause in the hosts' capacity to respond to a recently acquired parasite. This project evaluated the effects of simultaneous presence of the helminth *S. mansoni* and the protozoan *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in murine model BALB/c considering several parameters that characterize the progress of the diseases and comparing single infection groups with the study groups, to evaluate if the presence of one of the parasites changed the infection profile of the other pathogen (coinfection model) or if the species do not cause interferences through the course of each other infection (co-habitation model). Factors such as the order of infection and the time laps between the infection of the first and second parasite have a direct influence in the effects caused in the host, since differences were observed in the course of leishmaniasis when the infection by *S. mansoni* proceeded the infection with *L. (L.) amazonensis* and also in the course of schistosomiasis when the infection with *L. (L.) amazonensis* proceeded the infection by *S. mansoni*.

Keywords: coinfection, *Schistosoma mansoni*; *Leishmania amazonensis*.

SUMÁRIO

Introdução.....	11
1. Coinfecção por <i>S. mansoni</i> e protozoários	13
1.1 Coinfecção por <i>S. mansoni</i> e protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	14
2. Esquistossomose.....	15
3. Leishmaniose.....	20
4. A coinfecção por <i>Schistosoma mansoni</i> e <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	24
Justificativa.....	27
Objetivos	29
1. Objetivo Geral	29
2. Objetivos Específicos	29
Capítulo I – Avaliação das alterações patológicas e imunológicas provocadas por <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos previamente infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	31
1. Introdução	31
2. Material e Métodos.....	32
2.1 Configuração Experimental	32
2.2 Animais.....	33
2.3 Parasitos e Infecções.....	33
2.4 Determinação das Cargas Parasitárias	34
2.5 Ensaio para Determinar a Produção de Citocinas	35
2.6 <i>Imprint</i>	36
2.7 Comissão de Ética	36
2.8 Análises Estatísticas	36
3. Resultados	36
3.1 Pesagens	36
3.2 Avaliação da Progressão das Doenças.....	42
3.3 Avaliação do Perfil de Produção de Citocinas.....	49
4. Discussão.....	56
Capítulo II - Avaliação das alterações patológicas e imunológicas provocadas por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> em camundongos previamente infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	62
1. Introdução	62
2. Material e Métodos.....	63

2.1	Configuração Experimental	63
2.2	Animais.....	64
2.3	Parasitas e Infecções.....	64
2.4	Determinação das Cargas Parasitárias	65
2.5	Ensaio para Determinar a Produção de Citocinas	66
2.6	<i>Imprint</i>	67
2.7	Comissão de Ética	67
2.8	Análises Estatísticas	67
3.	Resultados	67
3.1	Pesagens	67
3.2	Avaliação da Progressão das Doenças.....	73
3.3	Avaliação do Perfil de Produção de Citocinas.....	79
4.	Discussão.....	86
	Conclusões	91
	Referências	93
	Anexos.....	101
1.	Certificado CEUA/UNICAMP.....	101
2.	Declaração de direito autoral.....	102

INTRODUÇÃO

Introdução

A suscetibilidade dos hospedeiros a variados patógenos diverge desde a microflora simbiótica até os patógenos. As interações entre organismos infectantes e seus hospedeiros variam desde aquelas em que há benefício mútuo (mutualismo), até aquelas em que há unilateralidade de benefícios, sendo que um dos organismos explorado pode ser prejudicado (parasitismo)¹. A maioria das espécies conhecidas está envolvida no parasitismo, atuando como parasito ou hospedeiro. Por esse fato, a parasitologia desempenha um papel central nas ciências biológicas, não só porque os parasitos constituem um grande número de seres vivos, mas também porque regulam inúmeras populações dentro dos mais diversos ecossistemas².

A parasitologia contempla não apenas as interações entre espécies, mas também destas com o ambiente (que pode ser o próprio hospedeiro), logo, seu viés ecológico é indissociável³. Porém, o fenômeno parasitismo ainda recebe um enfoque tradicional, antropocêntrico e militarista no qual um ou mais organismos necessariamente causam danos ao hospedeiro. Lenzi e Vannier-Santos⁴, no entanto, nos trazem uma visão alternativa a essas ideias convencionais, oferecendo uma abordagem ecológica da coabitação parasito-hospedeiro a qual sugere que o termo *coabitante* é mais preciso que o termo *parasito* porque é cada vez mais claro que todo ser vivo compõe um sistema adaptativo que flui em uma dinâmica contínua de trocas onde é difícil mensurar os ganhos e perdas dos respectivos parceiros.

Grande parte das populações hospedeiras naturais estão constantemente expostas a diversas espécies de parasitos, consequência de uma sobreposição geográfica de suas distribuições, tornando cada vez mais prevalente a ocorrência de infecções parasitárias concomitantes em um mesmo hospedeiro⁵. O termo *infecções concomitantes* refere-se então a uma situação onde dois ou mais agentes infecciosos, geneticamente diferentes, coexistem em um mesmo hospedeiro, podendo ou não gerar importantes consequências nos cursos de suas infecções⁶.

Na natureza, as infecções concomitantes não são exceção e há registros pré-históricos de sua ocorrência^{7,8}. O que é menos conhecido e abordado pelos principais textos de parasitologia é que existem inúmeras interações, intensas ou sutis, entre esses organismos presentes em um mesmo hospedeiro, sendo portanto necessário considerar a natureza das possíveis consequências dessas interações, que incluem organismos como: vírus, bactérias, helmintos e protozoários, interagindo entre si ou entre as diferentes espécies de um mesmo grupo⁶.

Partindo de um ponto de vista em que um hospedeiro que abriga um organismo A se infecta com um organismo diferente B, existem três possíveis cenários para B: a infecção pode ser aumentada, suprimida ou não sofrer qualquer alteração. No entanto, a situação é recíproca para a infecção causada por A, que também pode ser aumentada, suprimida ou não sofrer qualquer alteração. Ainda assim, esse exemplo só leva em conta uma infecção subsequente adquirida em certo tempo durante outra infecção em curso. As consequências da infecção causada por B poderiam ser completamente diferentes se o hospedeiro portador de A se infectasse com B no início da infecção, no seu pico ou durante uma fase crônica. Existem, portanto, muitas consequências diferentes, imprevisíveis e complexas resultantes de infecções concomitantes.

Portanto, as relações entre parasitos presentes em um mesmo hospedeiro podem agir alterando o curso normal de uma infecção, gerando importantes consequências fisiológicas, epidemiológicas, ecológicas e imunológicas⁹⁻¹¹. Do ponto de vista ecológico, essas interações podem ser positivas (facilitação) ou negativas (competição) e variam através de uma gama de mecanismos que incluem a competição por espaço e recursos e, a própria interferência direta entre os organismos¹². No entanto, as interações mais sutis que ocorrem em hospedeiros coinfectados são aquelas envolvendo a resposta imunológica. Essencialmente, a partir do momento em que um hospedeiro imunologicamente competente é infectado por qualquer agente infeccioso, o hospedeiro passa então a desenvolver uma resposta imune protetora apropriada, envolvendo principalmente linfócitos Th (T helper) que irão se diferenciar em células Th₁ e Th₂, produtoras de citocinas específicas e que são mutuamente exclusivas para cada tipo de resposta. Em suma, a resposta Th₁, predominante em infecções causadas por protozoários, representa o braço da resposta imune celular enquanto a resposta Th₂, importante na imunidade das infecções helmínticas, representa o braço da resposta imune humoral¹³. Muitas das interações imunológicas que ocorrem em hospedeiros coinfectados estão ligadas aos efeitos que os parasitos tem sobre o sistema imune, particularmente ao induzirem a imunodepressão e aos efeitos das citocinas controlando a polarização para os braços Th₁ ou Th₂ da resposta imune.

Apesar de predominantes em muitas partes do mundo, relativamente pouco se conhece sobre as coinfeções parasitárias e os impactos que uma infecção latente pode causar na capacidade do hospedeiro em controlar um parasito recém adquirido ou os impactos que um parasito recém adquirido pode provocar em uma infecção latente. Até então, os estudos sobre coinfeções helmintos/protozoários têm-se centrado, principalmente, nos mecanismos imuno-mediados, devido aos conhecidos efeitos imunomoduladores causados pelos helmintos¹⁴⁻¹⁶.

Nos últimos anos, estudos demonstraram que infecções helmínticas, incluindo a infecção pelo helminto trematódeo *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose, são capazes de modular negativamente a resposta inflamatória tipo Th₁ das células T CD4⁺ ^{17,18}.

No entanto, parece pouco provável que possa haver qualquer interação entre protozoários unicelulares e helmintos multicelulares, principalmente porque a maioria deles ocupa diferentes localizações no corpo humano e provocam diferentes tipos de resposta imune. A infecção por *S. mansoni* é bem descrita em seu hospedeiro vertebrado, mas ainda há pouca informação sobre a coinfeção com outros organismos. Alguns estudos de coinfeção por *S. mansoni* e diferentes grupos de protozoários incluindo espécies de *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Entamoeba*, *Trypanosoma* e *Leishmania* descreveram coinfeções de ocorrência natural em populações humanas e estudos experimentais em modelo murino. Fatores como a ordem da infecção e o intervalo de tempo entre a primeira e a segunda infecção parecem ter influência direta nos efeitos causados no hospedeiro vertebrado ¹¹.

1. Coinfeção por *S. mansoni* e protozoários

Os estudos envolvendo diferentes espécies de *Plasmodium* tanto em hospedeiros naturais quanto em hospedeiros experimentais, no geral, indicaram que a coinfeção provocou efeitos no hospedeiro tanto em termos patológicos quanto em termos imunológicos, como o aumento na parasitemia, na mortalidade do hospedeiro e mudanças nos padrões de resposta imunológica com base na produção de citocinas ¹⁹⁻²³. As diferenças no efeito da coinfeção observadas no hospedeiro parecem ser dependentes da espécie de *Plasmodium* e da linhagem murino utilizada.

Nos estudos envolvendo coinfeção por *Toxoplasma gondii*, foram observados dois padrões distintos tanto em hospedeiros naturais quanto em hospedeiros experimentais: a coinfeção após uma infecção crônica por *S. mansoni* pareceu aumentar a severidade da infecção subsequente por *T. gondii* enquanto a infecção prévia por *T. gondii* modulou ou diminuiu a severidade da infecção subsequente por *S. mansoni*, apresentando uma redução no número de parasitos, ovos no fígado e granulomas ²⁴⁻²⁸.

Estudos envolvendo a coinfeção *S. mansoni* e *Entamoeba histolytica* mostraram que a infecção prévia por *S. mansoni* seguida pela infecção por *E. histolytica* promoveu o aumento da invasão tecidual amebiana e da mortalidade, além de causar danos severos comparados aos animais infectados somente por *E. histolytica*. Os resultados dos estudos em hospedeiros naturais foram similares aos resultados dos hospedeiros experimentais ²⁹⁻³². Um

dos estudos levantou a hipótese de que os danos causados pelos ovos de *S. mansoni* na mucosa intestinal podem ajudar a promover a proliferação e invasão de *E. histolytica* na mucosa enquanto outro sugeriu que a infecção por *S. mansoni* pode suprimir a resposta imune e assim aumentar a capacidade de invasão tecidual por *E. histolytica*^{33,34}.

Estudos que examinaram o efeito da coinfeção quando a infecção por *S. mansoni* precedeu a infecção por *Trypanosoma* bem como quando a infecção por *Trypanosoma* precedeu a infecção por *S. mansoni* sugerem que a infecção por *S. mansoni* foi suprimida independentemente da ordem da infecção. Os hospedeiros coinfectados apresentaram diminuição no número de ovos, vermes e granulomas comparados à infecção singular por *S. mansoni*³⁵⁻³⁷.

1.1 Coinfeção por *S. mansoni* e protozoários do gênero *Leishmania*

Estudos experimentais da coinfeção *S. mansoni* e *Leishmania* examinaram a infecção por *S. mansoni* seguida pela coinfeção por *Leishmania*. Três principais espécies de *Leishmania* são utilizadas como modelo, sendo elas: *Leishmania (Leishmania) major* e *L. (L.) mexicana*, espécies causadoras da leishmaniose cutânea no Velho e Novo Mundo, respectivamente; e *L. (L.) donovani*, espécie causadora da leishmaniose visceral no Velho Mundo.

Na maioria dos estudos, a infecção prévia por *S. mansoni* possibilitou que a coinfeção por *Leishmania* se desenvolvesse mais cedo, fosse mais pronunciada e até mais persistente quando comparado às infecções singulares por diferentes espécies de *Leishmania*. Essas consequências parecem ser dependentes do intervalo de tempo entre a coinfeção³⁸⁻⁴⁵. Um dos estudos propôs que esses efeitos foram devido ao estabelecimento precoce de uma forte resposta imunológica do tipo Th₂ estimulada pela infecção prévia por *S. mansoni* que modulou negativamente a resposta imunológica Th₁ estimulada pela infecção por *L. (L.) major*⁴⁴.

Um outro estudo relatou que os maiores efeitos patológicos ocorreram quando a coinfeção por *L. (L.) donovani* posterior a uma infecção crônica por *S. mansoni* aumentou a carga parasitária de *L. (L.) donovani* no fígado e no baço, e levantou a hipótese de que o granuloma formado pela resposta imune contra ovos de *S. mansoni* formou um nicho que facilitou a sobrevivência e crescimento intracelular de *L. (L.) donovani*⁴⁵.

Relatos de casos de coinfeção em populações humanas na China e África parecem apoiar esses dados de que a coinfeção com helmintos tende a provocar um atraso na resposta de cura da leishmaniose^{46,47}. No Brasil, foi descrito um caso reportando manifestações clínicas atípicas da leishmaniose visceral acompanhadas de um envolvimento intestinal em um paciente

imunocompetente. Mesmo após extensas investigações, nenhuma condição imunossupressora foi encontrada exceto a coinfeção por *S. mansoni* ⁴⁸.

Recentemente, outro caso reportado em um paciente vivendo em áreas endêmicas da esquistossomose e leishmaniose revelou apresentações clínicas polimórficas da esquistossomose, com dermatite granulomatosa crônica causada pela presença de ovos de *S. mansoni* na pele. Apesar do tratamento, lesões cutâneas persistiram e, através de novas biópsias, foi revelada a presença de amastigotas de *Leishmania*. Portanto, a presença de infiltrados granulomatosos semelhantes nas lesões cutâneas causadas pelos dois agentes infecciosos levou a um atraso no diagnóstico da leishmaniose cutânea, que pode ser um fator importante de alteração da patologia da doença ⁴⁹.

Os casos reportados podem apresentar mais exemplos da modulação imune induzida por *S. mansoni* e podem adicionar novas provas na busca por elucidar os complexos mecanismos envolvidos nos estados de suscetibilidade e resistência à infecção por *Leishmania* spp.

2. Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária negligenciada prevalente em regiões tropicais e subtropicais de países em desenvolvimento (Figura 1) que causa grande impacto socioeconômico, superado apenas pela malária dentre todas as doenças parasitárias, causando perdas anuais de 1.7 a 4.5 milhões de *DALYs* (*Disability Adjusted Life Year* – soma dos anos de vida perdidos devido à doença). Apesar dos esforços para o seu controle, estima-se que mais de 261 milhões de pessoas estejam infectadas, e outras 780 milhões estejam em risco de infecção ao longo de 76 países em regiões de climas tropicais e subtropicais, causando cerca de 200.000 mortes anuais, valor que se acredita estar bastante subestimado devido à falha de diagnósticos ^{50,51}.

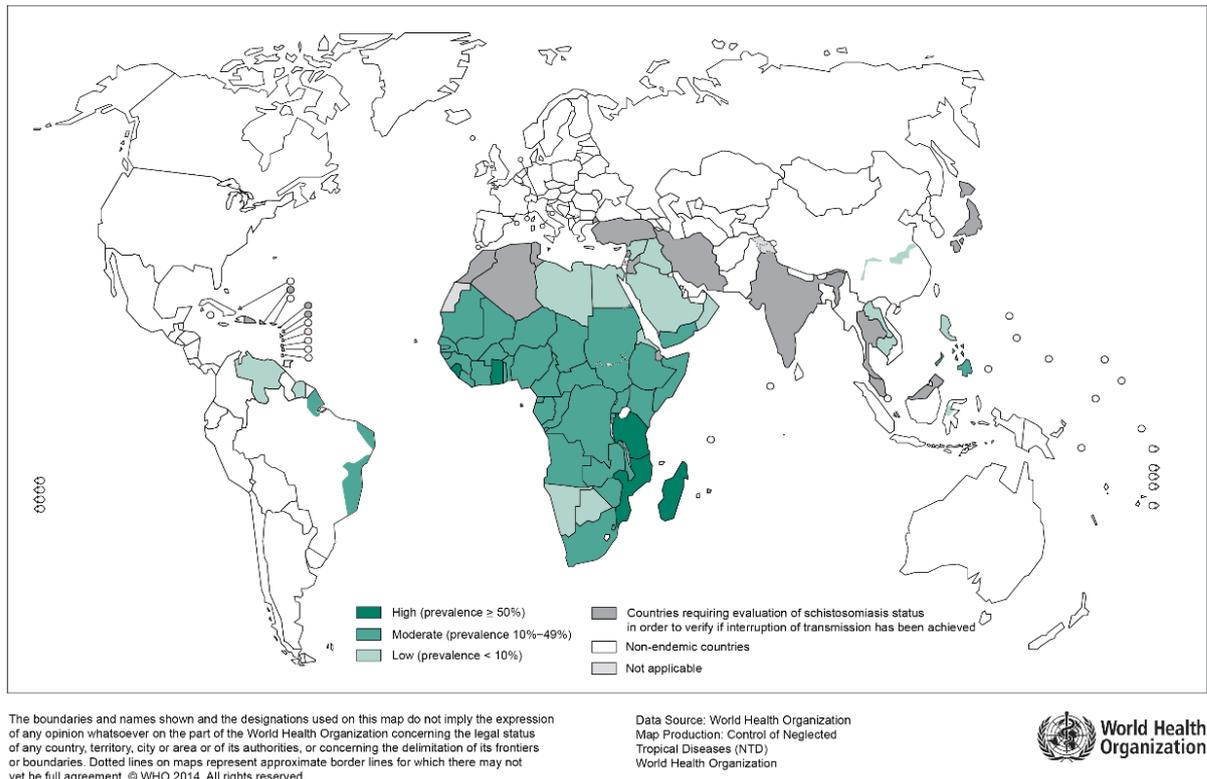


Figura 1| **Distribuição global da esquistossomose em 2012.** Estima-se que mais de 261 milhões de pessoas estejam infectadas, e outras 780 milhões estejam em risco de infecção ao longo de 76 países em regiões de climas tropicais e subtropicais. Adaptado de WHO ⁵².

Helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma* (família Schistosomatidae) são agentes etiológicos da doença, sendo a esquistossomose urogenital causada por *S. haematobium* e a esquistossomose intestinal causada por várias outras espécies: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. guineensis* e *S. malayensis*. *S. mansoni*, endêmico em 54 países da África e América do Sul, é a espécie mais amplamente distribuída, sendo o Brasil o país mais afetado das Américas, com cerca de 7 milhões de indivíduos infectados e outros 43 milhões expostos ao risco de infecção ^{53–56}.

S. mansoni possui um complexo ciclo biológico, representando uma notável interação adaptativa entre o parasito e seus hospedeiros intermediário e definitivo com o ambiente natural onde o ciclo ocorre. No Brasil, os moluscos *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (Família Planorbidae) são os três hospedeiros intermediários mais importantes na transmissão da doença, que ocorre invariavelmente quando fezes de indivíduos infectados contendo os ovos do parasito contaminam coleções hídricas. Na água doce as larvas ciliadas (miracídeos) irão eclodir dos ovos e, nadando de forma ativa e guiadas pela luz e estímulos químicos, irão encontrar e penetrar o molusco (hospedeiro intermediário) onde se replicarão assexuadamente através dos estágios de esporocistos e eventualmente eliminarão

milhares de cercárias. Os humanos se infectam quando as outras formas larvais do parasito (cercárias), liberadas do molusco, penetram a pele através do contato com a água doce, geralmente durante atividades recreativas ^{57,58}. Uma vez no hospedeiro definitivo, os esquistossômulos migram através do sangue até o sistema porta hepático onde ocorre a maturação em vermes adultos machos e fêmeas que irão então se reproduzir. Os casais emparelhados migram para as veias mesentéricas intestinais onde ocorre a oviposição. É estimado que cerca de 50 % dos ovos atravessem o lúmen do intestino sendo excretados nas fezes e que os restantes 50 % entrem na circulação sanguínea sendo retidos no fígado, pulmões e outros tecidos (Figura 2) ⁵⁹⁻⁶¹.

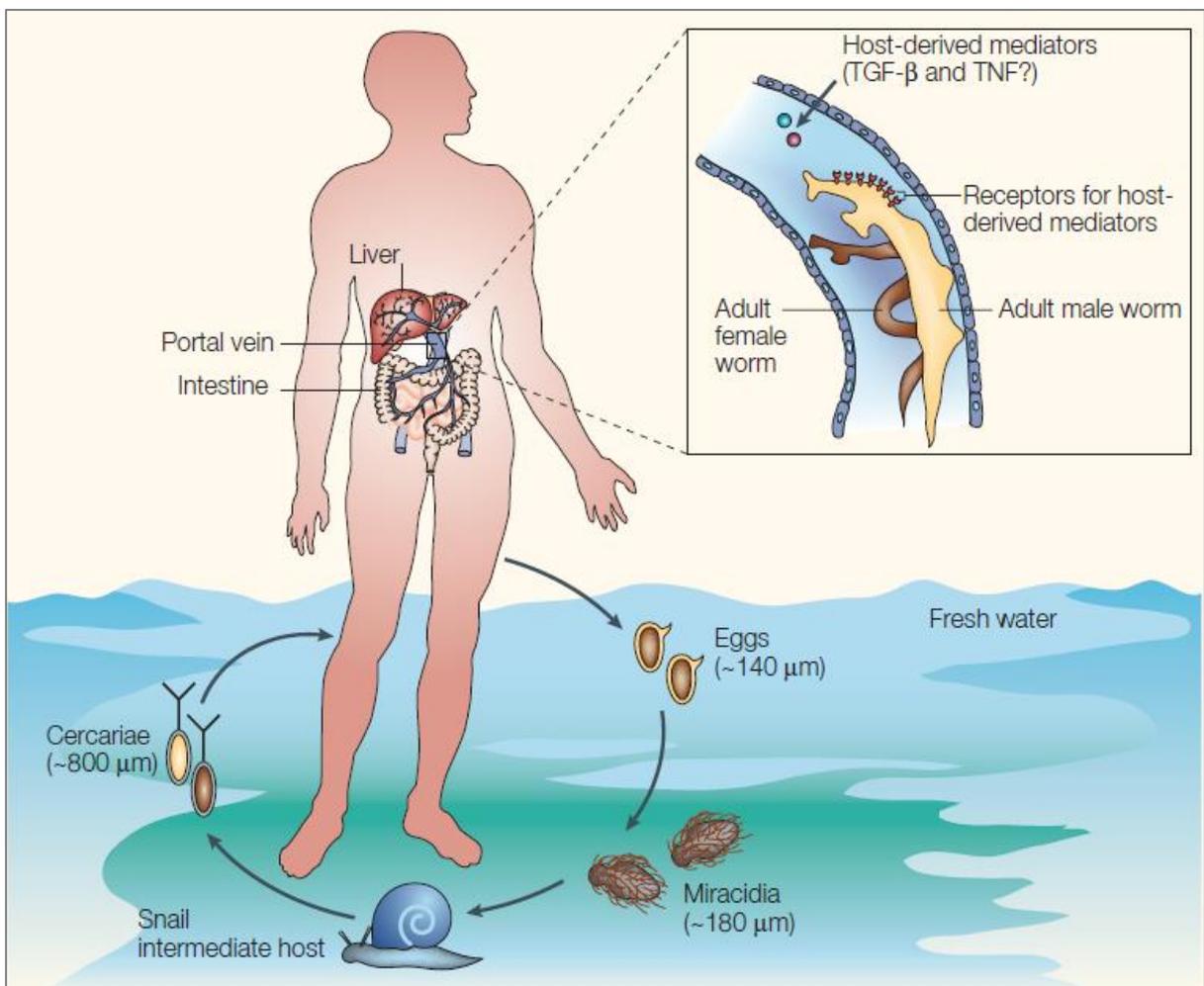


Figura 2| **Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.** A infecção em humanos por *S. mansoni* é iniciada pelas cercárias que penetram a pele, se desenvolvem em esquistossômulos e migram através do sangue até o sistema porta hepático onde amadurecem em adultos que se acasalam nos vasos sanguíneos. Os ovos liberados pelas fêmeas atravessam o endotélio intestinal até a passagem para o exterior. Depois de atingirem a água doce, os ovos eclodem e liberam a larva ciliada miracídio que busca ativamente e penetra o molusco hospedeiro intermediário. A reprodução assexuada no molusco produz milhares de cercárias que irão infectar os humanos. Adaptado de Dunne & Cooke ⁶².

De um modo geral, a patogenia da esquistossomose é ligada a vários fatores como a cepa do parasito, carga parasitária adquirida, idade, estado nutricional e resposta imunológica do indivíduo, sendo mais frequente a forma hepatoesplênica e as formas pulmonares. Sabe-se também que as alterações cutâneas (dermatites) e hepáticas são grandemente influenciadas pela resposta imunológica do indivíduo frente aos antígenos dos esquistossômulos e dos ovos. Muitos ovos não são excretados e ficam permanentemente retidos nos intestinos ou no fígado. Uma vez retidos nesses tecidos, os ovos induzem uma resposta imune granulomatosa do hospedeiro caracterizada principalmente pela presença de linfócitos (que produzem citocinas Th₂ como as Interleucinas 4, 5 e 13); eosinófilos e, eventualmente, macrófagos ativados^{63,64}. Esses granulomas ainda contêm enzimas proteolíticas dos ovos que previnem a necrose tecidual, mas o processo de formação do granuloma induz uma forte resposta inflamatória que leva às manifestações clínicas da esquistossomose⁶⁵.

Embora o complemento e outros fatores da resposta imune natural possam contribuir para a defesa contra a infecção por helmintos, a resposta imune específica com a produção de anticorpos e citocinas é importante. A resposta imunológica inicial após a infecção por *S. mansoni* consiste na produção de células Th₁ durante as primeiras cinco semanas de infecção. No entanto, conforme a infecção progride e há o acasalamento dos vermes e a produção de ovos, as células NK (Natural Killer) são ativadas e as células dendríticas passam a produzir mais Interleucina-10 (IL-10) e menos IL-12, nesse momento a resposta Th₂ emerge e a resposta Th₁ diminui, como ilustrado na Figura 3⁶⁶. Então, há uma resposta Th₂ fortemente polarizada, com um aumento no número de eosinófilos, basófilos e mastócitos e elevados níveis circulantes de IgE, componentes fundamentais na defesa contra helmintos⁶⁷. Porém, os esquistossomos são extremamente adaptados e possuem uma variedade impressionante de mecanismos de reparo e evasão imunológica, que incluem a capacidade de revestir-se com antígenos do hospedeiro, de clivar enzimaticamente anticorpos e de substituir rapidamente seus antígenos de superfície^{14,68-70}.

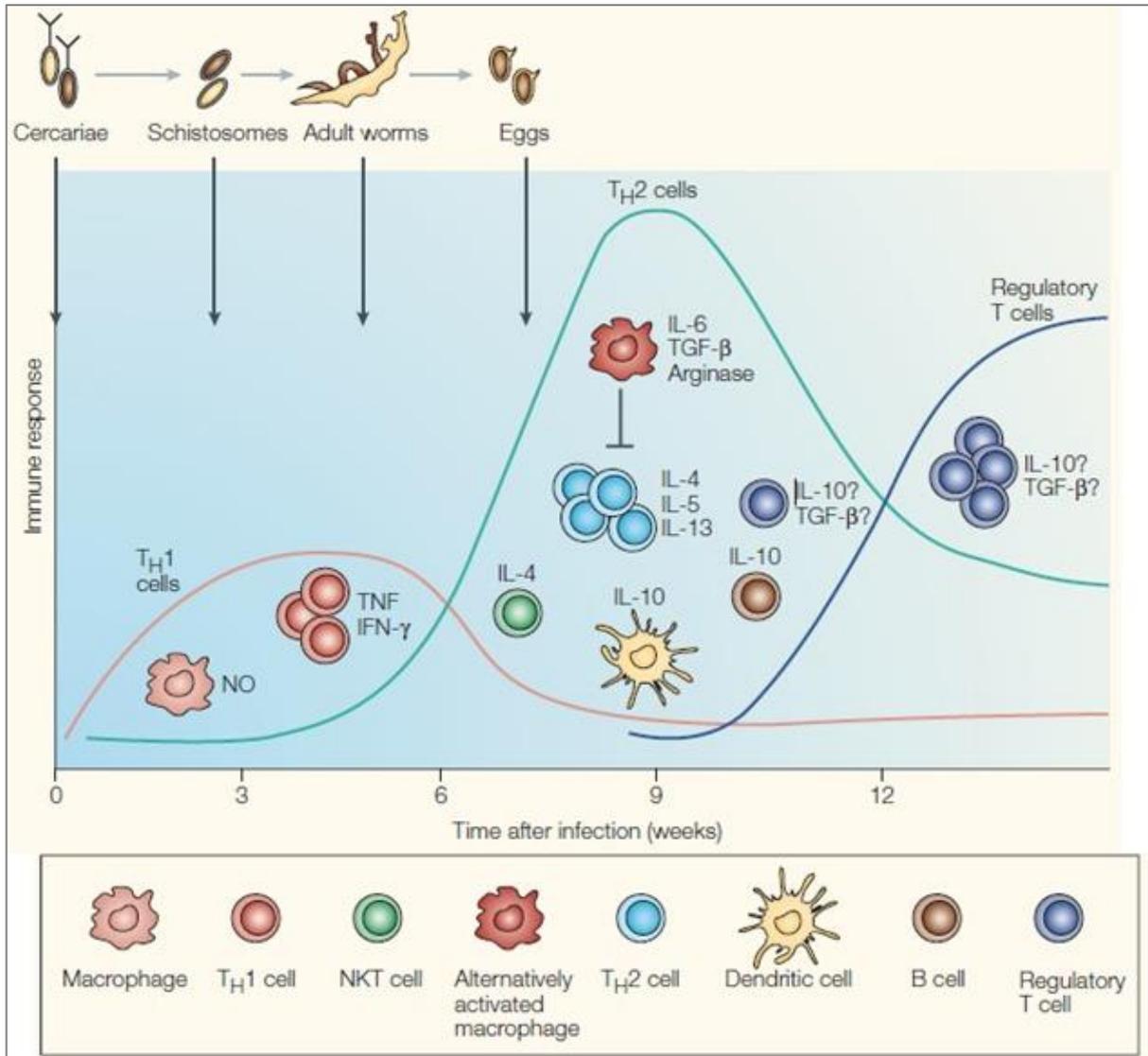


Figura 3| **Aspectos imunológicos da esquistossomose.** Após a infecção por *S. mansoni* a primeira resposta imune inicial é uma resposta Th₁. Com o desenvolvimento dos vermes adultos e a produção de ovos, as células NK são ativadas e as células dendríticas passam a produzir mais IL-10 e menos IL-12, desenvolvendo uma resposta Th₂. Adaptado de Dunne & Cooke ⁶².

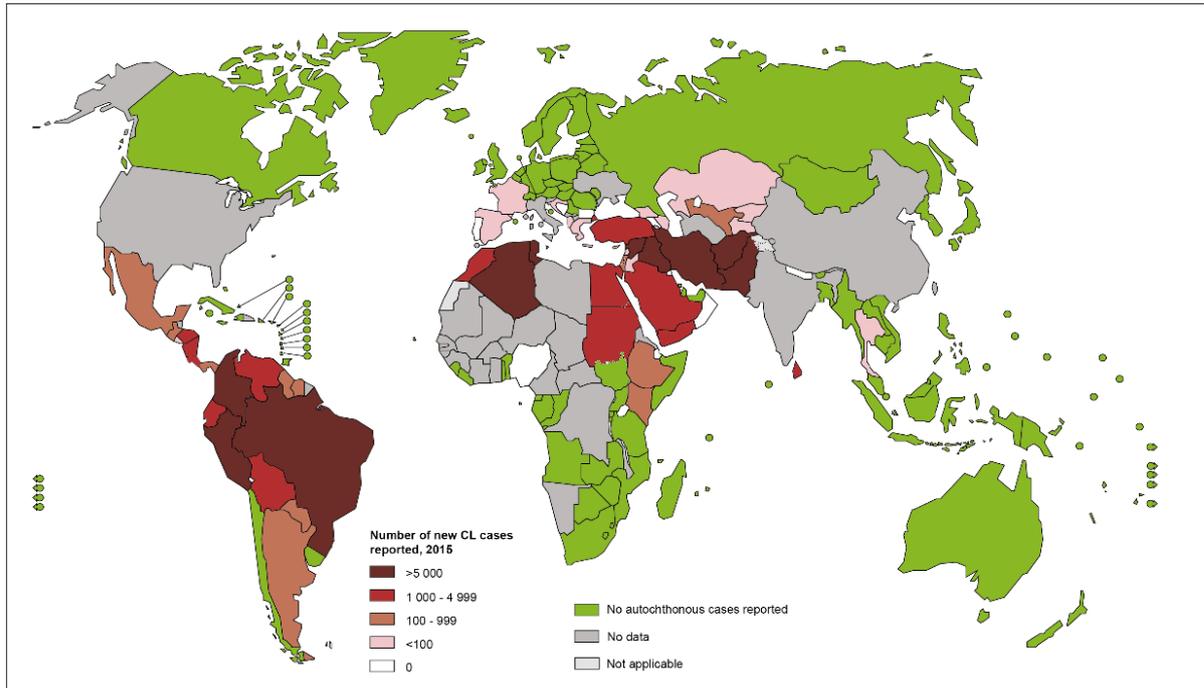
Durante a fase aguda, as manifestações clínicas de febre, astenia, perda de peso, dor abdominal, diarreia e tosse, além de complicações como pleurite e pericardite, são decorrentes da presença de TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-6, e da deposição de complexos imunes. A melhora da sintomatologia coincide com a produção de IL-10 induzida pelos antígenos dos ovos na fase crônica. Nessa fase também ocorre secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 que em modelos experimentais participam da formação do granuloma e da fibrose hepática, e, portanto, da patogênese da esquistossomose ⁷¹⁻⁷³. Além dos graves danos promovidos a diversos órgãos, a esquistossomose é responsável por causar morbidade significativa, prejudicando o desenvolvimento na infância e a produtividade em indivíduos adultos ⁷⁴.

Infraestrutura adequada e a conscientização educacional podem ser altamente eficazes para o controle da esquistossomose, entretanto seu alto custo e o alto nível de organização exigidos ainda são realidades distantes dos países mais afetados pela doença. A utilização de moluscicidas para a eliminação do hospedeiro intermediário é outro método de controle, mas também é custoso e produz efeitos limitados e de curto prazo além de causar importante impacto ambiental ⁵⁴. A ausência de uma vacina como medida profilática faz com que a quimioterapia ainda seja o principal recurso adotado pelos programas de controle da esquistossomose. Atualmente encontra-se disponível apenas um fármaco para o tratamento da esquistossomose, o praziquantel (PZQ). No entanto, o emprego do PZQ em larga escala e os tratamentos sequenciais têm demonstrado uma suscetibilidade reduzida no campo e o aparecimento de tolerância/resistência sobre algumas linhagens de *Schistosoma* spp. em diferentes regiões geográficas ^{75,76}.

3. Leishmaniose

A leishmaniose, doença infecciosa de evolução crônica causada por mais de vinte espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae; ordem Kinetoplastida), é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, com prevalência mundial de todas as formas da doença estimada em 12 milhões e incidência de até 2 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500.000 novos casos de leishmaniose visceral por ano ^{77,78}, e com cerca de 350 milhões de pessoas em 88 países ao redor do mundo vivendo sob risco de desenvolver uma das formas da doença (Figura 4) ⁷⁹.

Levantamentos recentes estimam cerca de 20 a 40 mil mortes anuais causadas por esta doença no mundo. No Brasil, aproximadamente 20 mil casos de leishmaniose cutânea por ano foram reportados em 2014 e, para este mesmo período, cerca de 3.500 casos anuais de leishmaniose visceral ⁸⁰. Também preocupantes são as estatísticas que apontam para o aumento da incidência da doença devido às mudanças no padrão de transmissão, decorrentes de modificações socioambientais como o desmatamento e o processo migratório, resultando em uma expansão das áreas de transmissão, evidenciando o aspecto recente de urbanização da leishmaniose, antes predominante em regiões rurais ^{81,82}.



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2017. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 4| **Status global da endemidade da leishmaniose cutânea em 2016.** A leishmaniose cutânea é endêmica na América do Sul e Central, no norte da África, no Oriente Médio e em partes da Ásia, e estima-se que 1 milhão de novos casos surjam a cada ano. Adaptado de WHO ⁸³.

As formas cutâneas no Brasil caracterizam-se pela diversidade das apresentações clínicas e das espécies causadoras da doença. Tem sido descrito no país o acometimento cutâneo por sete espécies de *Leishmania*, das quais algumas causam síndromes peculiares associadas à fenômenos imunopatogênicos específicos, como a forma difusa causada por *L. (L.) amazonensis* e a forma mucosa causada por *L. (Viannia) braziliensis*. A leishmaniose visceral, caracterizada por quadros de pancitopenia, anemia, febre e hepatoesplenomegalia é causada essencialmente por uma única espécie, a *L. (L.) infantum*. No entanto, alguns autores descreveram o envolvimento de *L. (L.) amazonensis* na leishmaniose visceral ⁸⁴⁻⁸⁷.

Estes protozoários apresentam ciclo biológico heteroxeno que alterna entre um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado, vetores flebotomíneos (Família Psychodidae; Ordem Diptera). Durante seu ciclo, o protozoário apresenta duas formas – amastigotas, que possuem flagelo reduzido e forma arredondada, vivem dentro de vacúolos fagolisossômicos presentes em células fagocíticas mononucleares, principalmente macrófagos dos hospedeiros vertebrados, que serão ingeridos pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo ⁸⁸⁻⁹⁰; e promastigotas, com corpo celular fusiforme e flagelo proeminente e podem

ser encontrados livres ou aderidos ao epitélio do intestino do inseto, que serão regurgitados pela fêmea do flebotomíneo ao realizar um novo repasto sanguíneo, perpetuando o ciclo (Figura 5).

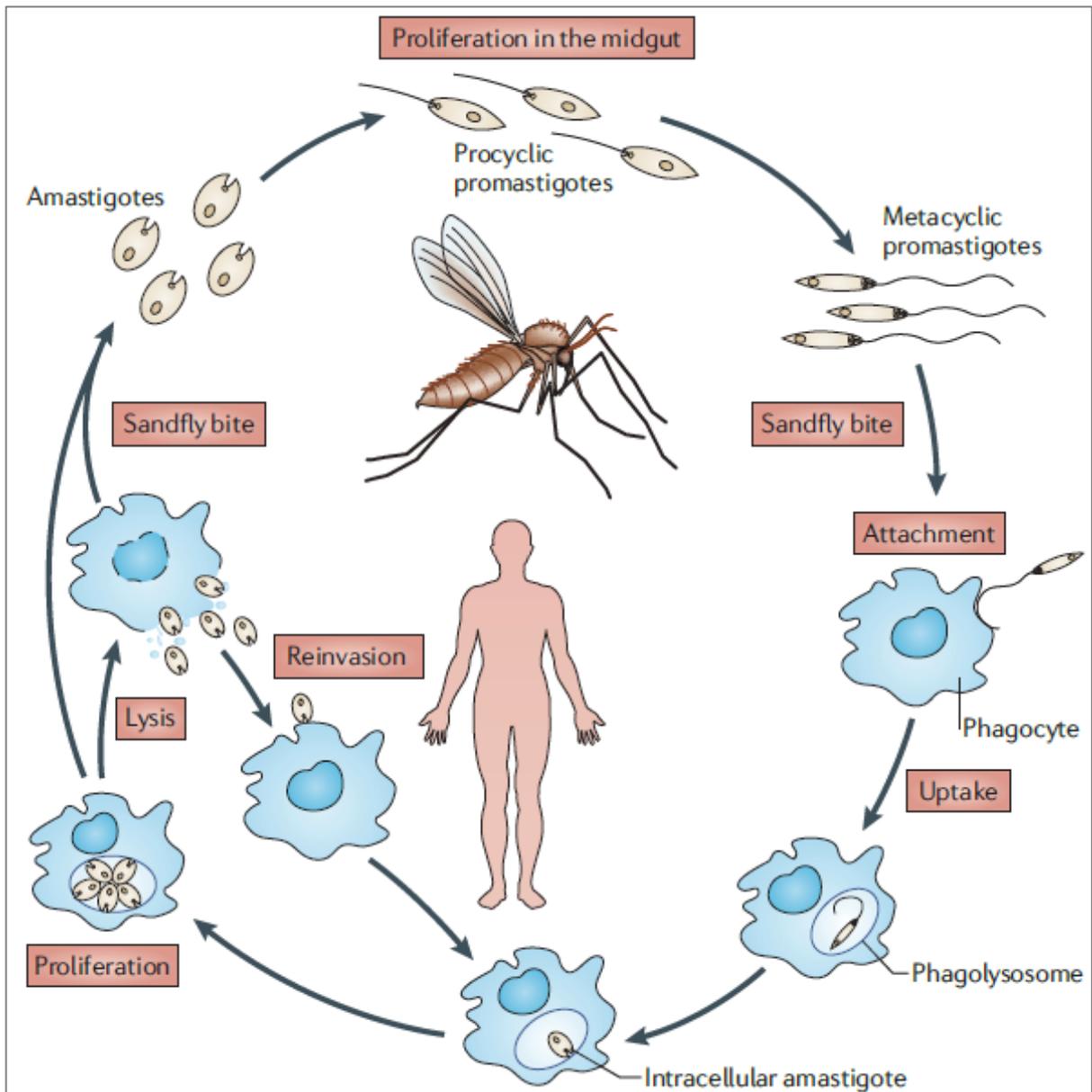


Figura 5| **Ciclo biológico de *Leishmania* spp.** Promastigotas metacíclicos são regurgitados pela fêmea do flebotomíneo ao realizar um repasto sanguíneo e são então fagocitados por um dos vários tipos de células encontradas no local onde se transformam em amastigotas que se replicam nas células hospedeiras. O ciclo de transmissão se completa quando fagócitos infectados são ingeridos por fêmeas de flebotomíneos durante novo repasto sanguíneo. Adaptado de Kaye & Scott ⁹¹.

Os sintomas da leishmaniose podem se manifestar no homem e em outros mamíferos, como os canídeos. Classicamente, pacientes humanos infectados apresentam a forma cutânea que afeta a pele, linfonodos e mucosas, ou a forma visceral da doença com comprometimento do baço, medula óssea e fígado ⁹². As principais manifestações da doença se

dão a partir do acometimento da pele (forma cutânea ou tegumentar), que pode evoluir para manifestações mais complexas denominadas mucocutânea, disseminada e difusa; e a forma visceral, sendo esta potencialmente fatal. A leishmaniose cutânea é a manifestação clínica mais comum, caracterizada por uma ou várias lesões na pele com ausência ou pequeno número de parasitos, até lesões com elevadas cargas parasitárias ^{93,94}.

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão bem caracterizada como a resposta em camundongos, em virtude de sua complexidade. Esta resposta envolve o papel das citocinas, das moléculas co-estimulatórias e da saliva do flebotomíneo ⁹⁵. Os dois principais mecanismos responsáveis pelo controle de *Leishmania* são a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas durante a fagocitose, e o óxido nítrico (NO), gerado após a ativação de macrófagos por IFN- γ . Entretanto, tem sido demonstrado que a modulação da resposta imune pode ser influenciada pela espécie de *Leishmania* infectante, sendo que o desenvolvimento diferencial das respostas do tipo Th₁ e Th₂ está diretamente ligado à resistência e à suscetibilidade da infecção por *Leishmania*, respectivamente ^{96,97}.

A leishmaniose cutânea difusa e mucocutânea são manifestações graves da doença que se situam em extremidades opostas do espectro imunológico, que varia desde os altos níveis da imunidade celular a altos níveis de anticorpos (Figura 6). Indivíduos infectados com parasitos que causam a forma cutânea localizada desenvolvem uma resposta do tipo Th₁, caracterizada pela produção de citocinas IL-2, IFN- γ TNF- α e IL-12 ao nível das lesões. As lesões mucocutâneas, que constituem uma forma crônica associada à destruição de mucosas, também se caracterizam por uma resposta do tipo Th₁ exacerbada e um aumento do número de células T CD8⁺ citotóxicas ⁹⁸.

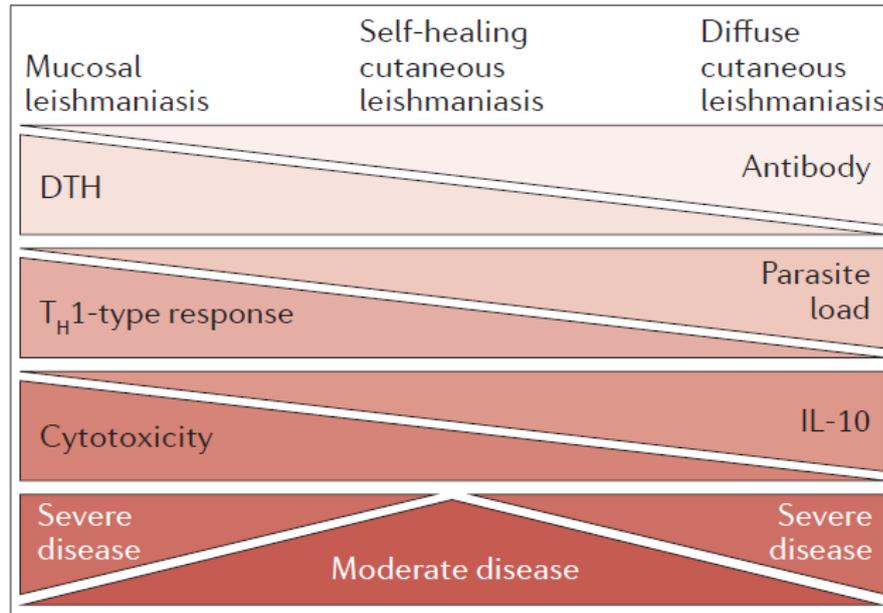


Figura 6| **Espectro imunológico da leishmaniose cutânea.** A leishmaniose cutânea difusa e mucocutânea são manifestações graves da doença que se situam em extremidades opostas do espectro imunológico. Adaptado de Scott & Novais ⁹⁹.

Por contraste, pacientes com a forma cutânea difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo Th₂, caracterizada pela produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β ¹⁰⁰⁻¹⁰², com elevado número de parasitos no sítio da lesão, consequência dos baixos níveis de citocinas Th₁. Essa forma da doença também está associada a altos níveis de anticorpos e IL-10 e, recentemente, foi demonstrado que a ausência da citocina IL-1 β pode levar à exacerbação da doença ¹⁰³. Durante o tratamento e com consequente destruição dos parasitos e melhora das lesões, existe um aumento temporário de IFN- γ e uma redução de IL-10 enfatizando o papel dessas citocinas na resposta imune da leishmaniose ^{104,105}.

De modo geral, a terapêutica da leishmaniose é considerada problemática e de sucesso incerto devido a fatores como: o alto custo associado à terapia, a restrição de vias de administração (resumindo-se no Brasil, à via parenteral no tratamento de escolha) e a elevada toxicidade de todos os fármacos atualmente utilizados. O tratamento de escolha para a leishmaniose cutânea e visceral no Brasil consiste no uso de antimoniais pentavalentes, cuja administração se dá por via parenteral por ao menos 20 dias e, além de ser bastante inconveniente, pode provocar efeitos adversos graves sobre o aparelho cardiovascular, além de nefro- e hepatotoxicidade ^{106,107}.

4. A coinfeção por *Schistosoma mansoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Existe uma sobreposição na distribuição epidemiológica do helminto *Schistosoma mansoni* e de algumas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* em vários países da África, América Central e América do Sul, incluindo o Brasil. Em virtude dessa extensa sobreposição geográfica, *S. mansoni* e espécies de *Leishmania* podem, ocasionalmente, coinfetar os mesmos indivíduos ^{48,49,108,109}. Além disso, a probabilidade da ocorrência da coinfeção *S. mansoni/Leishmania* é intensificada por conta do padrão crônico de cada uma das doenças, pelo deslocamento de pessoas cada vez mais intenso entre as áreas endêmicas e por compartilharem uma grande diversidade de espécies de hospedeiros reservatórios ^{110,111}. No caso do Brasil, é relevante compreender e estabelecer os parâmetros da coinfeção *in vivo* por *S. mansoni*, espécie responsável pela esquistossomose mansônica e de *L. (L.) amazonensis*, uma das espécies causadora da leishmaniose cutânea e responsável pela forma difusa da doença e com potencial de visceralização, uma vez que ambas são endêmicas no território brasileiro (Figura 7) e estudos de coinfeção experimental entre essas duas espécies, que seja do nosso conhecimento, nunca foram reportados na literatura até o momento. Ademais, as evidências disponíveis sobre a modulação imune causada pelos helmintos nos encorajam a supor que a interação entre esses dois agentes (*S. mansoni/L. (L.) amazonensis*) pode vir a contribuir para a ocorrência de manifestações incomuns dos quadros clínicos de duas das mais antigas, severas e ainda negligenciadas parasitoses em humanos: esquistossomose e leishmaniose cutânea.

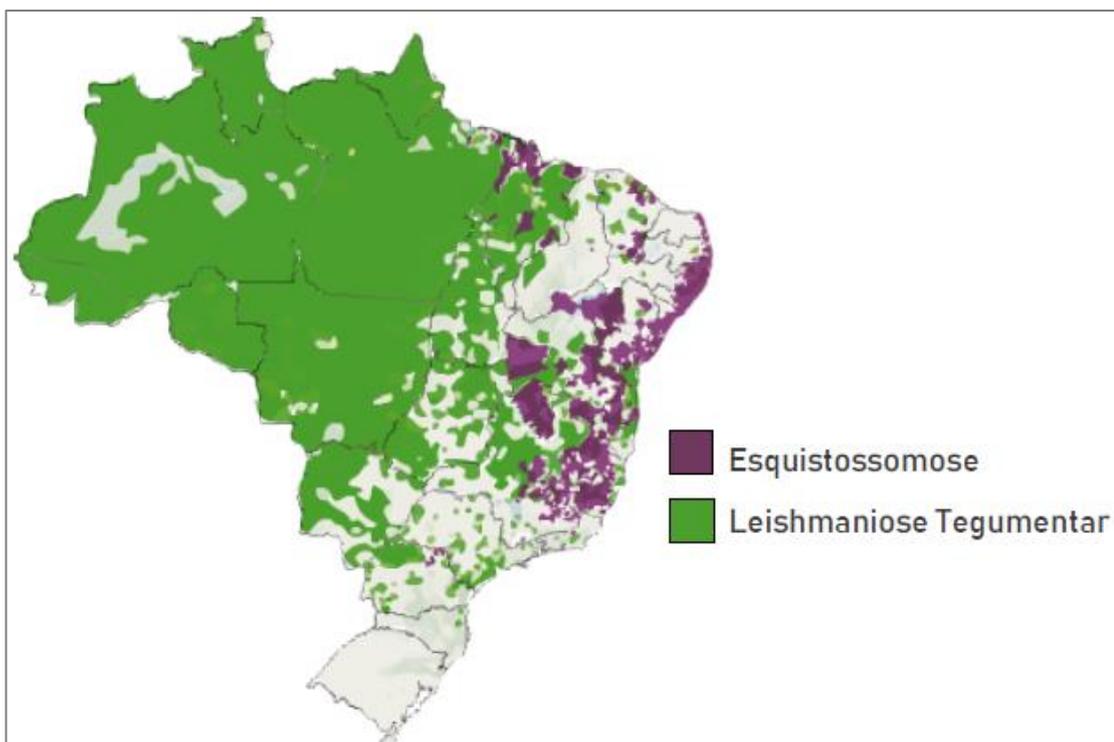


Figura 7| **Distribuição da esquistossomose e da leishmaniose tegumentar no Brasil.** Adaptado de Ministério da Saúde e Organização Pan-Americana de Saúde ^{112,113}.

JUSTIFICATIVA

Justificativa

Compreender as consequências do parasitismo simultâneo por *Schistosoma mansoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em um hospedeiro pode ser crucial para o entendimento aprofundado das patogenias, epidemiologias e até mesmo para o desenvolvimento de estratégias de controle e tratamento da esquistossomose e da leishmaniose cutânea.

OBJETIVOS

Objetivos

1. Objetivo Geral

O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da presença simultânea do helminto *Schistosoma mansoni* e do protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos BALB/c, de modo a estabelecermos se a presença de um dos parasitos altera o perfil de infecção do outro (modelo de coinfeção) ou se as espécies não causam interferências nos cursos da infecção uma da outra (modelo de coabitação).

2. Objetivos Específicos

Determinar os perfis de infecção levando em conta a ordem da infecção por cada um dos parasitos, intervalo de tempo entre as infecções e parâmetros de caracterização da progressão das doenças específicos das infecções por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* sendo estes:

- i. Determinação das cargas parasitárias de formas adultas de *S. mansoni* no fígado e em veias mesentéricas, como de *L. (L.) amazonensis* no sítio da infecção, fígado, baço e linfonodos poplíteos em situação de infecção simples e simultânea.
- ii. Avaliação da progressão de lesões cutâneas de camundongos BALB/c inoculados com *L. (L.) amazonensis* antes e após exposição caudal à cercárias de *S. mansoni*.
- iii. Determinação dos padrões de citocinas anti- e pro-inflamatórias dos animais simultaneamente infectados e animais controle para cada uma das infecções.

CAPÍTULO I

Avaliação das alterações patológicas e imunológicas provocadas por *Schistosoma mansoni* em camundongos previamente infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Capítulo I – Avaliação das alterações patológicas e imunológicas provocadas por *Schistosoma mansoni* em camundongos previamente infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

1. Introdução

Grande parte das populações hospedeiras naturais estão constantemente expostas a diversas espécies de parasitos, consequência de uma sobreposição geográfica de suas distribuições, tornando cada vez mais prevalente a ocorrência de infecções parasitárias concomitantes em um mesmo hospedeiro ⁵. O termo *infecções concomitantes* refere-se então a uma situação onde dois ou mais agentes infecciosos, geneticamente diferentes, coexistem em um mesmo hospedeiro, podendo ou não gerar importantes consequências nos cursos de suas infecções ⁶. Na natureza, as infecções concomitantes não são exceção e há registros pré-históricos de sua ocorrência ^{7,8}. O que é menos conhecido e abordado pelos principais textos de parasitologia é que existem inúmeras interações, intensas ou sutis, entre esses organismos presentes em um mesmo hospedeiro, sendo portanto necessário considerar a natureza das possíveis consequências dessas interações, que incluem organismos como: vírus, bactérias, helmintos e protozoários, interagindo entre si ou entre as diferentes espécies de um mesmo grupo ⁶.

Existe uma sobreposição na distribuição epidemiológica do helminto *Schistosoma mansoni* e de algumas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* em vários países da África, América Central e América do Sul, incluindo o Brasil. Em virtude dessa extensa sobreposição geográfica, *S. mansoni* e espécies de *Leishmania* podem, ocasionalmente, coinfectar os mesmos indivíduos ^{48,49,108,109}. Além disso, a probabilidade da ocorrência da coinfeção *S. mansoni/Leishmania* é intensificada por conta do padrão crônico de cada uma das doenças e pelo deslocamento de pessoas cada vez mais intenso entre as áreas endêmicas ^{110,111}. No caso do Brasil, é relevante compreender e estabelecer os parâmetros da coinfeção *in vivo* por *S. mansoni*, espécie responsável pela esquistossomose mansônica e de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, uma das espécies causadora da leishmaniose cutânea e responsável pela forma difusa da doença e com potencial de visceralização; uma vez que ambas são endêmicas no território brasileiro e estudos de coinfeção experimental entre essas duas espécies, que seja do nosso conhecimento, nunca foram reportados na literatura até o momento. Ademais, as evidências disponíveis sobre a modulação imune causada pelos helmintos nos encorajam a supor que a interação entre esses dois agentes (*S. mansoni/L. (L.) amazonensis*)

pode vir a contribuir para a ocorrência de manifestações incomuns dos quadros clínicos de duas das mais antigas, severas e ainda negligenciadas parasitoses em humanos: esquistossomose e leishmaniose cutânea.

2. Material e Métodos

2.1 Configuração Experimental

O Capítulo I deste trabalho visou avaliar as alterações patológicas e imunológicas quando a infecção por *L. (L.) amazonensis* precedeu a infecção por *S. mansoni*, com intervalos de 15 e 45 dias entre as infecções, períodos definidos como Infecção Inicial e Infecção Tardia, no quais as lesões da leishmaniose ainda não são aparentes (15 dias) ou já estão estabelecidas (45 dias), respectivamente.

Foram estabelecidos dois grupos experimentais: Grupo 1 – Infecção Inicial (infecção por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias a infecção por *S. mansoni*) e Grupo 2 – Infecção Tardia (infecção por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias a infecção por *S. mansoni*) com quinze animais em cada grupo. Os animais foram então subdivididos em cinco grupos de infecção conforme esquema abaixo:

Grupo 1 – Infecção Inicial

NI: animais não infectados (grupo controle); n = 3.

Leish: animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (infecção controle); n = 3.

Schisto: animais infectados apenas por *S. mansoni* (infecção controle); n = 3.

Leish(15)/Schisto: animais infectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias, infectados por *S. mansoni* (infecção inicial); n = 6.

Grupo 2 – Infecção Tardia

NI: animais não infectados (grupo controle); n = 3.

Leish: animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (infecção controle); n = 3.

Schisto: animais infectados apenas por *S. mansoni* (infecção controle); n = 3.

Leish(45)/Schisto: animais infectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias, infectados por *S. mansoni* (infecção tardia); n = 6.

As infecções dos grupos de animais coinfectados foram realizadas em simultâneo e nas mesmas condições das infecções controle para cada um dos parasitos.

2.2 Animais

Para a realização dos ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c marcados individualmente, com 30 dias de idade, pesando \approx 20 g. Os animais receberam água filtrada, ração autoclavada *ad libitum* e foram mantidos em mini-isoladores com maravalha autoclavada em Rack ventilado (Alesco®) substituída duas vezes na semana. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas.

É importante destacar que os modelos de animais de laboratório infectados por *Schistosoma mansoni* e *Leishmania* spp. estão bem estabelecidos na literatura e são rotineiramente mantidos nos laboratórios onde este projeto foi desenvolvido.

O peso corpóreo dos animais foi monitorado semanalmente, inclusive no período anterior à infecção/infecções, começando aos 30 dias de vida. Ao final das infecções, os fígados, baços e patas infectadas e controle foram pesadas.

2.3 Parasitos e Infecções

2.3.1 *Schistosoma mansoni*

Neste estudo foi utilizada a linhagem BH (Belo Horizonte) de *Schistosoma mansoni*. Essa linhagem é mantida no Departamento de Biologia Animal (UNICAMP) em moluscos planorbídeos *Biomphalaria glabrata* e em camundongos fêmeas *Mus musculus*, linhagens Swiss e BALB/c, com protocolo aprovado pelo CEUA/UNICAMP (protocolo número 4798-1/2018).

Para a infecção, os camundongos foram contidos em dispositivos específicos e infectados utilizando-se a técnica de imersão caudal em tubos de ensaio contendo uma suspensão de cercárias durante 2 horas com exposição à luz e temperatura de aproximadamente 28° C ¹¹⁴. Os camundongos foram infectados individualmente com aproximadamente 70 cercárias cada.

2.3.2 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A cepa de *L. (L.) amazonensis* utilizada nesse estudo foi a MHOM/BR/1973/M2269. Essa cepa é mantida nas formas promastigota em culturas líquidas a 26° C e amastigota em camundongos BALB/c infectados periodicamente no Departamento de Biologia Animal (UNICAMP), com protocolo aprovado pelo CEUA/UNICAMP (protocolo número 3484-1).

Foi utilizado o modelo de infecção para leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c fêmeas, avaliando-se para isso, camundongos BALB/c que foram infectados no coxim plantar traseiro esquerdo com 2×10^6 promastigotas de populações enriquecidas de metacíclicos purificados a partir de incubação com anticorpo m3A.1. em suspensões líquidas (PBS 1X) de até 50 µL/inóculo ¹¹⁵.

Semanalmente, a espessura das patas traseiras dos animais foi medida com paquímetro digital (Mitutoyo, Japan) e a diferença entre a pata infectada e pata não infectada indicava o tamanho da lesão (mm) e o tamanho da úlcera expresso como a área da úlcera (mm²). A aparência macroscópica da lesão foi registrada com câmera fotográfica digital ao final das infecções.

2.4 Determinação das Cargas Parasitárias

2.4.1 *Schistosoma mansoni*

2.4.1.1 Número de Parasitos Adultos

Após o período determinado para o término da infecção do hospedeiro definitivo, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os vermes adultos foram recuperados por meio da perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas de acordo com Pellegrino & Siqueira ¹¹⁶.

2.4.1.2 Contagem de Ovos nas Fezes

As fezes de cada animal foram coletadas a cada 15 dias após 45 dias de infecção, para realizar a contagem do número de ovos eliminados, utilizando-se o método quantitativo Kato-Katz ¹¹⁷. Foi utilizado o Kit comercial Helm Test (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ) para determinar o número de ovos/grama. Os animais foram separados em gaiolas individuais e fezes frescas foram utilizadas para realizar a técnica. As fezes foram submetidas à triagem em nylon

e a quantidade exata de fezes foi determinada pelo preenchimento de um orifício de diâmetro conhecido (fornecido pelo kit) e depois colocado em uma lâmina de vidro. As fezes já dispostas na lâmina foram cobertas com papel celofane impregnado com solução de verde malaquita (solução aquosa a 3 %) a fim de preservar e branquear o material. Em cada tempo de experimento, duas lâminas foram feitas por animais e lidas no microscópio de luz. O número de ovos foi determinado pela fórmula padrão do Kit Helm Test, Bio-Manguinhos: número de ovos contado x 4 = ovos/grama de fezes.

2.4.2 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Os ensaios de quantificação de carga parasitária foram realizados segundo protocolo de diluição limitante estabelecido por Lima e colaboradores¹¹⁸, com modificações. Os animais eutanasiados tiveram a área da lesão isolada e porções previamente pesadas de órgãos como fígado, baço e linfonodos poplíteos homogeneizados em tubos de vidro com homogeneizador estéril a 4° C em PBS 1X estéril. O material coletado foi centrifugado a 4° C a 60 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4° C a 600 x g por 5 minutos e, neste caso, o sedimento foi ressuscitado em 1 mL de PBS 1X estéril, dos quais 10 µL foram transferidos para uma placa de 24 poços contendo 2 mL de meio de cultura de crescimento de promastigotas M199 (Sigma-Aldrich) e 10 µL de estreptomicina e 2 µL gentamicina, e outros 10 µL transferidos para a câmara de Neubauer para a quantificação aproximada de amastigotas por mg de tecido, apresentada como a quantificação no dia 0.

As culturas foram incubadas a 26° C por sete dias e a carga parasitária foi estimada baseando-se na contagem de promastigotas realizadas em câmara de Neubauer encontradas no 7° dia, observadas em microscópio óptico invertido acoplado com câmera invertida (Leica DFC 295). A carga parasitária no fígado e baço, quando detectada, foi normalizada levando em conta o peso da porção inicial em relação ao peso total do órgão isolado para cultura.

2.5 Ensaio para Determinar a Produção de Citocinas

As porções de fígado e baço previamente pesadas foram processadas na presença do inibidor de protease e as citocinas foram dosadas no homogenato. As proteínas totais foram dosadas pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) com limite de detecção mínimo de 31,25 mg/mL.

Foram obtidos os perfis de produção de citocinas IL-1β, IFN-γ, TNF, IL-4, IL-6 e IL-10 no fígado e no baço pelo método de ELISA sanduíche. Os limites de detecção mínimos

são 31,25 pg/mL para IL-1 β ; 3,125 pg/mL para IFN- γ ; 15,625 pg/mL para TNF; 9,375 pg/mL para IL-4; 15,625 pg/mL para IL-6 e 31,25 pg/mL para IL-10 (BD Biosciences). Os procedimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante.

2.6 Imprint

2.6.1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Foram preparadas lâminas com aposição de material de fígado e baço de animais coinfectados e controles da infecção por *L. (L.) amazonensis*, pressionando-os levemente contra a lâmina para posterior secagem à temperatura ambiente e fixação com metanol puro e coloração com o kit panóptico rápido (Newprov, Pinhais – PR) para a observação de parasitos que eventualmente tenham se disseminado do sítio da lesão cutânea.

2.7 Comissão de Ética

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA/UNICAMP) e aprovado sob protocolo de número 4577-1/2017.

2.8 Análises Estatísticas

As diferenças estatísticas entre os grupos foram testadas usando a Análise de Variância (one-way ANOVA) e o Student's t-test não pareado, utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, *GraphPad Software*, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Todos os resultados analisados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

3. Resultados

3.1 Pesagens

O peso corporal de todos os animais foi monitorado semanalmente. Foi avaliado o percentual de crescimento semanal em relação ao peso inicial de cada animal a fim de

estabelecermos curvas de padrões de aumento ou redução do peso de cada um dos grupos ao longo das infecções.

Ao final das infecções, foram pesados os fígados, baços e patas esquerdas infectadas e controle. O peso dos órgãos é apresentado em porcentagem do órgão em relação ao peso corpóreo total de cada respectivo animal, de modo a estabelecermos um padrão para análise do aumento ou redução do peso dos órgãos de cada grupo em relação aos grupos controles.

3.1.1 Peso Corporal

O peso corporal de todos os animais foi monitorado semanalmente e o percentual de crescimento semanal em relação ao peso inicial é apresentado na Figura 1. Não há diferença estatisticamente significativa entre o peso inicial de todos os grupos de animais dos Grupo 1 – Infecção Inicial e Grupo 2 – Infecção Tardia. Nota-se uma tendência da queda do peso dos animais a partir da 5ª semana após a infecção por *S. mansoni*. Apesar dessa tendência, não houve diferença entre o peso dos grupos de animais infectados por *S. mansoni* e o peso do grupo de animais não infectados.

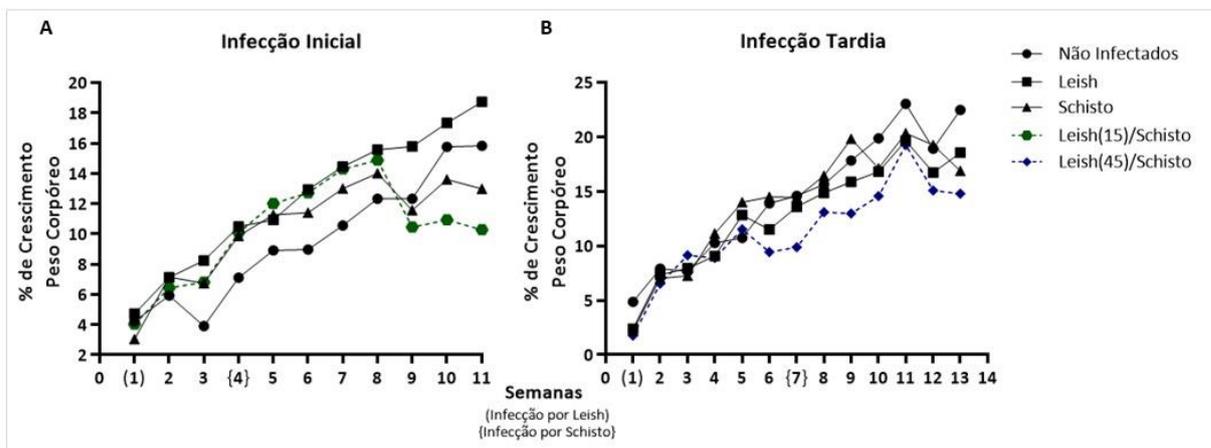


Figura 1 | **Porcentagem de crescimento de camundongos BALB/c.** A e B | Média da porcentagem de crescimento de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfetados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfetados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto) ao longo das semanas. Não há diferenças estatisticamente significativas entre o peso inicial de todos os grupos. (One-way ANOVA).

Considerando que o aumento dos pesos dos órgãos dos camundongos influencia o peso total do camundongo, dificultando a visualização de perda de peso e potencial caquexia

(importantes aspectos clínicos da esquistossomose), o peso dos diferentes grupos foi comparado após subtração dos pesos do fígado, baço e pata esquerda.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferença estatisticamente significativa entre os pesos corpóreos após subtração dos pesos do fígado, baço e pata esquerda dos grupos de animais não infectados, infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni*.

No Grupo 2 – Infecção Tardia, os pesos corpóreos após subtração dos pesos do fígado, baço e pata esquerda do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* não apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo de animais não infectados. Porém, é inferior no grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* ($p = 0,0174$) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* ($p = 0,0037$) quando comparado ao grupo de animais não infectados.

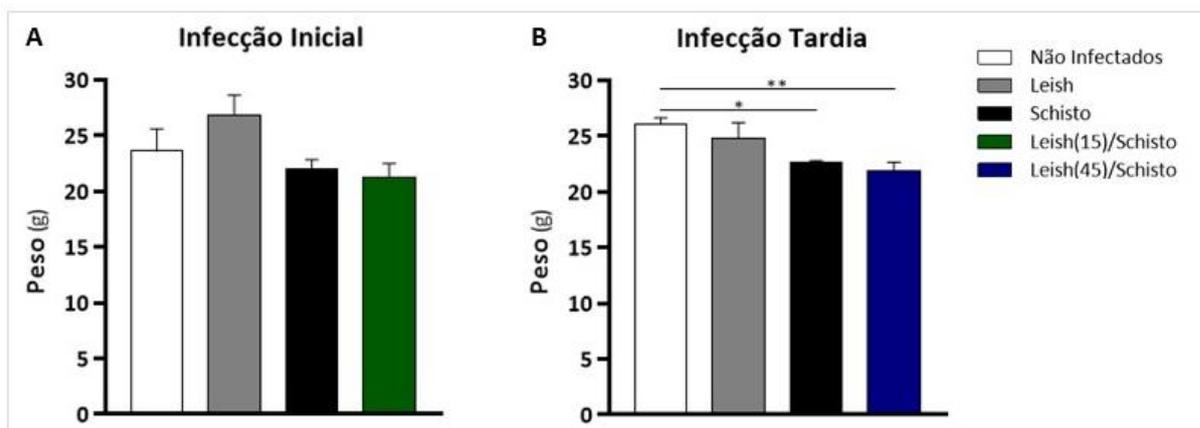


Figura 2 | **Peso total dos camundongos BALB/c após remoção do peso de órgãos acometidos (fígado, baço e pata esquerda).** A e B | Média \pm SEM do peso corpóreo após remoção do peso do fígado, baço e pata esquerda de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

3.1.2 Peso do Fígado

O peso do fígado dos animais é expresso como a média da porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de cada respectivo animal e é apresentado na Figura 3.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* é inferior quando comparado ao grupo de animais não infectados ($p = 0,0293$). Porém, é superior nos grupos infectados por *S. mansoni* ($p = 0,0035$) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* ($p = 0,0071$). Ao

comparar o grupo de animais coinfectados com cada uma das infecções controle, nota-se que não há diferenças entre os animais infectados apenas por *S. mansoni*, mas a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* é inferior ($p = 0,0024$) (Figura 3A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* não apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo de animais não infectados. Porém, é superior nos grupos infectados por *S. mansoni* ($p = 0,0005$) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* ($p = 0,001$). Ao comparar o grupo de animais coinfectados com cada uma das infecções controle, nota-se que não há diferenças entre os animais infectados apenas por *S. mansoni*, mas a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* é inferior ($p = 0,006$) (Figura 3B).

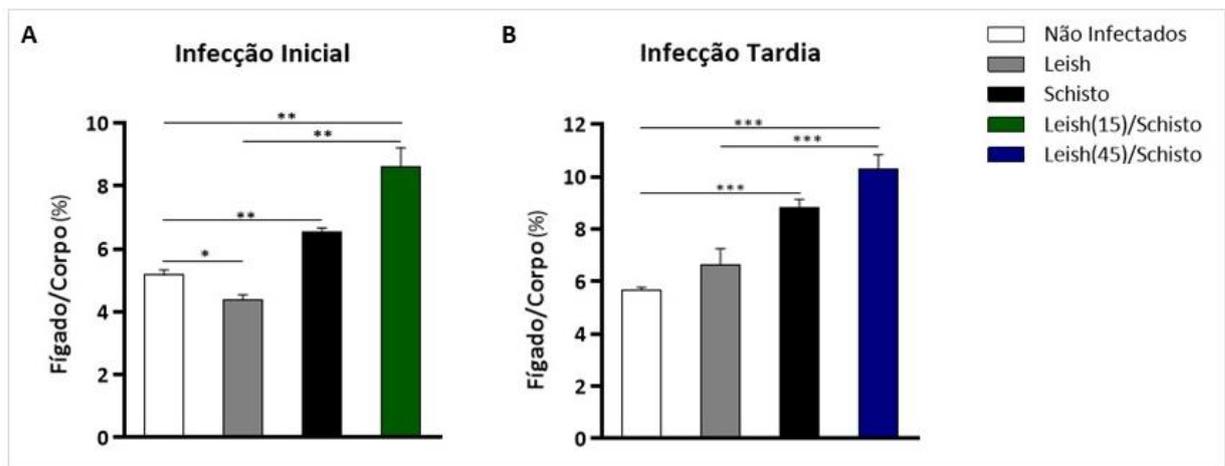


Figura 3| **Diferenças do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM da porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Student's t-test)

3.1.3 Peso do Baço

O peso do baço dos animais é expresso como a média da porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de cada respectivo animal e é apresentado na Figura 4.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, a porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* não apresenta diferenças quando comparado ao grupo de animais não infectados. Porém, é superior nos grupos infectados por *S.*

mansoni ($p = 0,0256$) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* ($p = 0,0016$). Ao comparar o grupo de animais coinfectados com cada uma das infecções controle, nota-se que não há diferenças entre os animais infectados apenas por *S. mansoni*, mas a porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* é inferior ($p = 0,0012$) (Figura 4A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, a porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo é superior nos grupos de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0425$), *S. mansoni* ($p < 0,0001$) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* ($p < 0,0001$). Ao comparar o grupo de animais coinfectados com cada uma das infecções controle, nota-se que não há diferenças entre os animais infectados apenas por *S. mansoni*, mas a porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* é inferior ($p = 0,0002$) (Figura 4B).

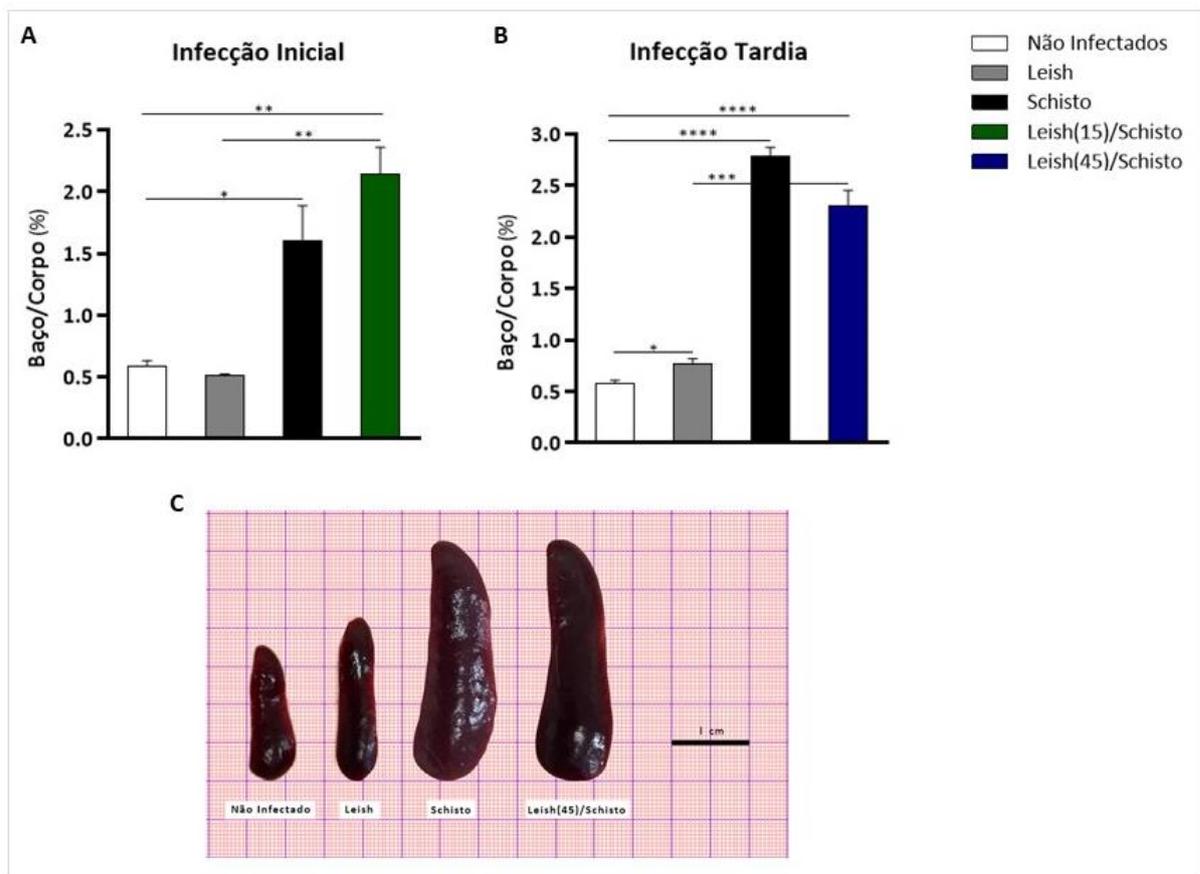


Figura 4| **Diferenças do peso do baço em relação ao peso corpóreo de camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM da porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (Student's t-test) C| Aspecto macroscópico do baço de camundongos não infectados; infectados

por *L. (L.) amazonensis* (Leish); infectados por *S. mansoni* (Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (Leish(15)/Schisto).

3.1.4 Peso da Pata Esquerda

O peso da pata esquerda dos animais é expresso como a média da porcentagem do peso da pata esquerda em relação ao peso corpóreo de cada respectivo animal e é apresentado na Figura 5.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, a porcentagem do peso da pata em relação ao peso corpóreo é superior nos grupos de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0024$) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo de animais não infectados. Ao comparar o grupo de animais coinfectados com a infecção controle por *L. (L.) amazonensis*, nota-se que não há diferenças entre a porcentagem do peso da pata infectada em relação ao peso corpóreo (Figura 5A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, a porcentagem do peso da pata em relação ao peso corpóreo é superior nos grupos de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0012$) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo de animais não infectados. Ao comparar o grupo de animais coinfectados com a infecção controle por *L. (L.) amazonensis*, nota-se que não há diferenças entre a porcentagem do peso da pata infectada em relação ao peso corpóreo (Figura 5B).

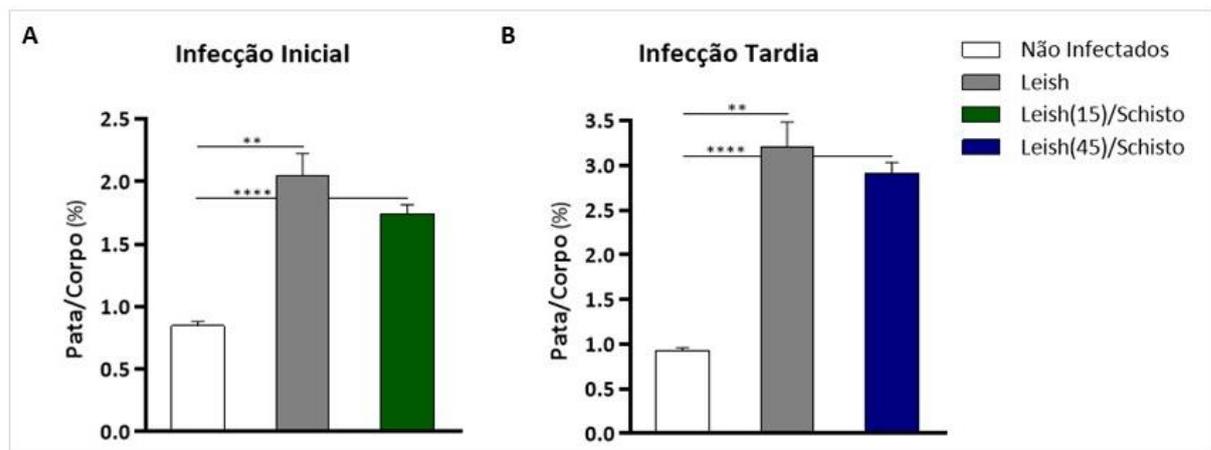


Figura 5| **Diferenças do peso da pata esquerda em relação ao peso corpóreo de camundongos BALB/c. A e B** Média \pm SEM da porcentagem do peso da pata em relação ao peso corpóreo de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. (Student's t-test)

3.2 Avaliação da Progressão das Doenças

3.2.1 Esquistossomose

3.2.1.1 Número de Vermes e Contagem de Ovos nas Fezes

O número de ovos nas fezes foi quantificado a cada 15 após 45 dias de infecção por *S. mansoni* no Grupo 1 – Infecção Inicial e após 35 dias de infecção por *S. mansoni* no Grupo 2 – Infecção Tardia. A antecipação da quantificação de ovos nas fezes do Grupo 2 ocorreu devido ao desenvolvimento precoce e acentuado da leishmaniose nos animais coinfectedos. Ao término das infecções, os vermes adultos foram recuperados após perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas. O número de ovos nas fezes e o número total de vermes, número de fêmeas e de machos são apresentados na Figura 6.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças estatísticas significativas entre o número total de vermes, número de fêmeas e número de machos entre o grupo de animais coinfectedos por *L. amazonensis* e *S. mansoni* e a infecção controle por *S. mansoni*. A quantidade de ovos eliminados por grama de fezes após 45, 55 e 65 dias de infecção não apresentou diferenças estatísticas significativas entre o grupo de animais coinfectedos por *L. amazonensis* e *S. mansoni* quando comparado à infecção controle por *S. mansoni* para os mesmos tempos de infecção (Figura 6 A e C).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças entre o número total de vermes, número de fêmeas e de machos entre os animais coinfectedos por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparado à infecção controle por *S. mansoni*. A quantidade de ovos eliminados por grama de fezes após 35 e 55 dias de infecção não apresentou diferenças estatísticas significativas entre o grupo de animais coinfectedos por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparado à infecção controle por *S. mansoni* para os mesmos tempos de infecção (Figura 6 B e C).

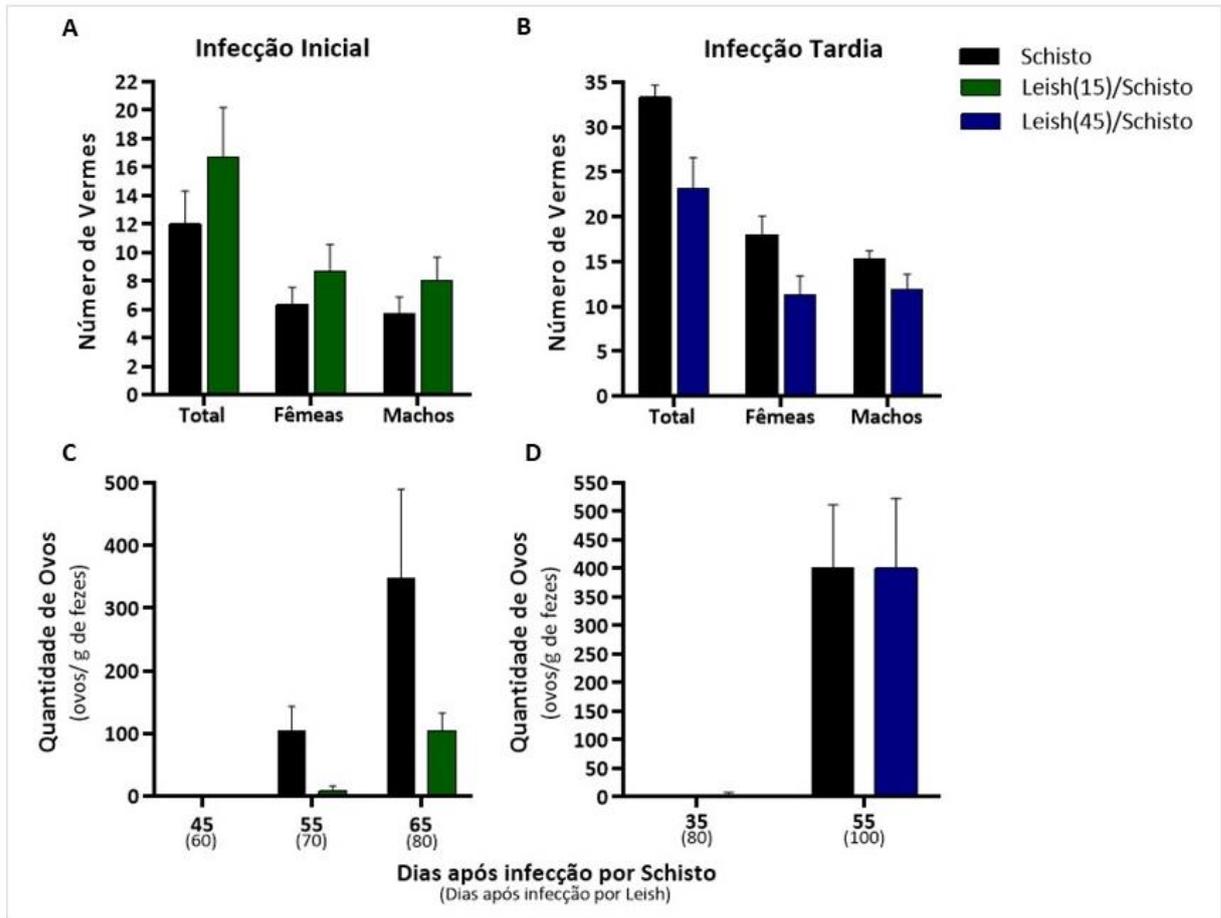


Figura 6| **Infecção por *S. mansoni* em camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM do número total de vermes, número de fêmeas e número de machos recuperados após perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas de camundongos infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto). C e D| Média \pm SEM da quantidade de ovos por grama de fezes em de camundongos infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto).

3.2.2 Leishmaniose

3.2.2.1 Desenvolvimento das Lesões Dérmicas

A Figura 7 apresenta a progressão do tamanho da lesão em camundongos coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, foi observado que os animais coinfectados apresentaram menor inchaço quando comparados ao grupo controle de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*. A diferença estatisticamente significativa foi evidente na 7ª semana de infecção (p = 0,0215) e se repetiu na 9ª (p = 0,0027), 10ª (p = 0,008) e 11ª (p = 0,284) semana de infecção, até a eutanásia dos animais (Figura 7A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não houve diferenças entre o tamanho da lesão entre os grupos de animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 7B).

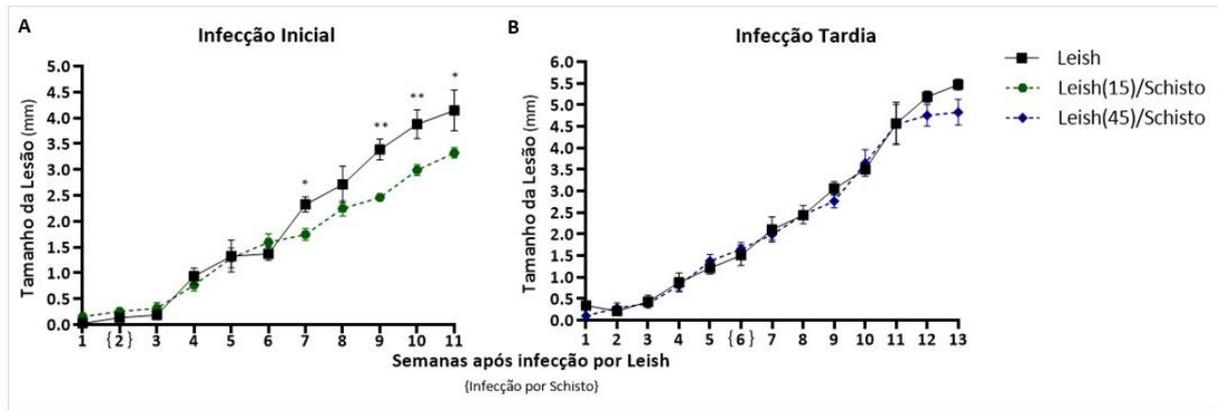


Figura 7| **Infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM do tamanho das lesões (mm) ao longo da infecção em camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish), coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

Como a infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongo BALB/c normalmente evolui do inchaço no local da infecção para uma lesão ulcerada, caracterizada como uma lesão cutânea onde há a ruptura do epitélio, de modo a haver exposição de tecidos mais profundos e com consequente perda de tecido, a medida da espessura da lesão pode ser enganosa nos períodos finais da infecção. Assim, outro critério utilizado para avaliar o desenvolvimento das lesões dérmicas foi o surgimento e o aumento das úlceras.

Tanto no Grupo 1 – Infecção Inicial quanto no Grupo 2 – Infecção Tardia, não foram observadas diferenças na área total das úlceras entre o grupo de animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 8). Apesar disso, as lesões ulceradas em animais coinfectedados se desenvolveram mais cedo e foram aparentemente mais pronunciadas que as lesões do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*. Os aspectos macroscópicos das lesões são apresentados na Figura 9, A e B.

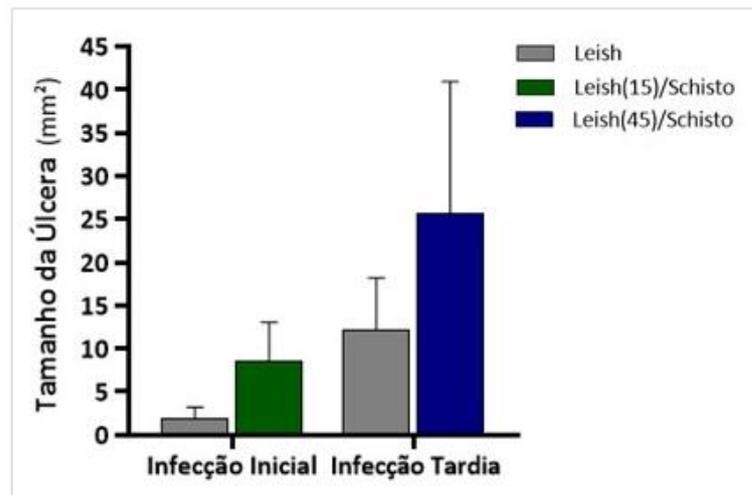


Figura 8| **Desenvolvimento de úlceras em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis*.** Média \pm SEM do tamanho das úlceras (mm^2) ao fim da infecção em camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish), coinfetados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfetados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto).

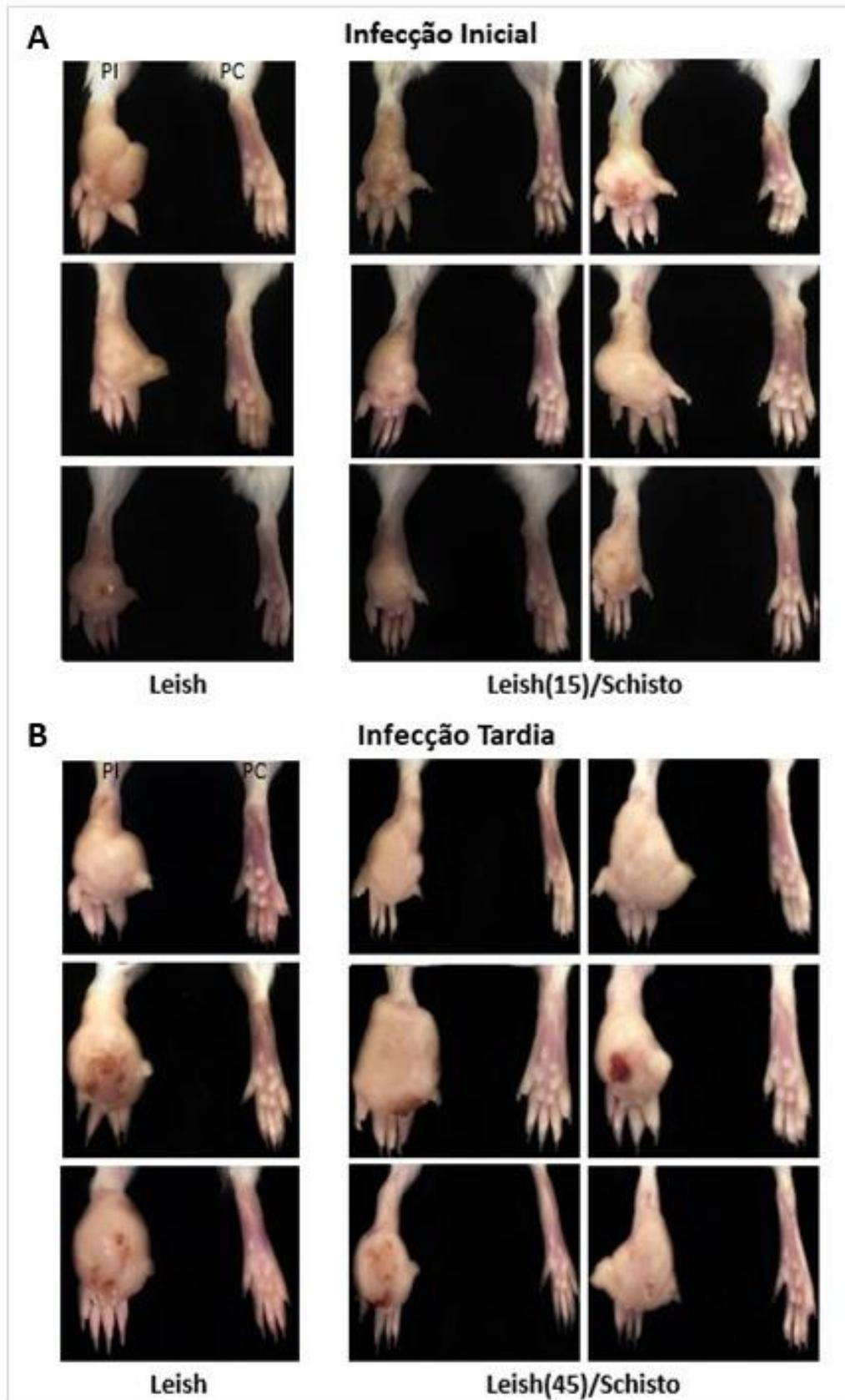


Figura 9| **Aspecto macroscópico da lesão em camundongos BALB/c.** A e B| Avaliação das lesões em camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish), coinfetados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfetados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto). PI: pata infectada; PC: pata controle.

3.2.2.2 Carga Parasitária

A carga parasitária foi estimada baseando-se na contagem de amastigotas no dia 0, ou seja, no momento da extração da lesão e na contagem ou positividade de promastigotas viáveis após 7 dias da cultura inicial da lesão e de amostras de fígado, baço e linfonodos poplíteos e é apresentada na Figura 10 e Tabelas 1 A e B.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não foram encontradas diferenças nas cargas parasitárias isoladas das amostras de lesão no dia 0 e no dia 7 entre o grupo de animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 10 A e B). Apesar de não quantificados, foram encontrados promastigotas nas culturas de amostras de fígado de dois dos três animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e em quatro dos seis animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni*. Não foram encontrados promastigotas nas culturas de amostras de baço de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, porém quatro dos seis animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* apresentaram parasitos na cultura de baço. Foram encontrados promastigotas nas culturas de amostras de linfonodo de dois dos três animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e em cinco dos seis animais coinfectedados por *L. amazonensis* e *S. mansoni* (Tabela 1A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não foram encontradas diferenças nas cargas parasitárias isoladas das amostras de lesão no dia 0 e no dia 7 entre o grupo de animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 10 A e B). Não foram encontrados promastigotas nas culturas de amostras de fígado de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, porém quatro dos seis animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* apresentaram parasitos na cultura de baço. Os três animais infectados por *L. (L.) amazonensis* apresentaram promastigotas nas culturas de amostras de baço e apenas um animal coinfectedado por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* não apresentou parasitos na cultura de amostras de baço. Além disso, a diferença estatisticamente significativa foi evidente nas cargas parasitárias das culturas de amostras de linfonodo, onde a carga parasitária de animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* foi superior à carga parasitária de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0048$) (Tabela 1B).

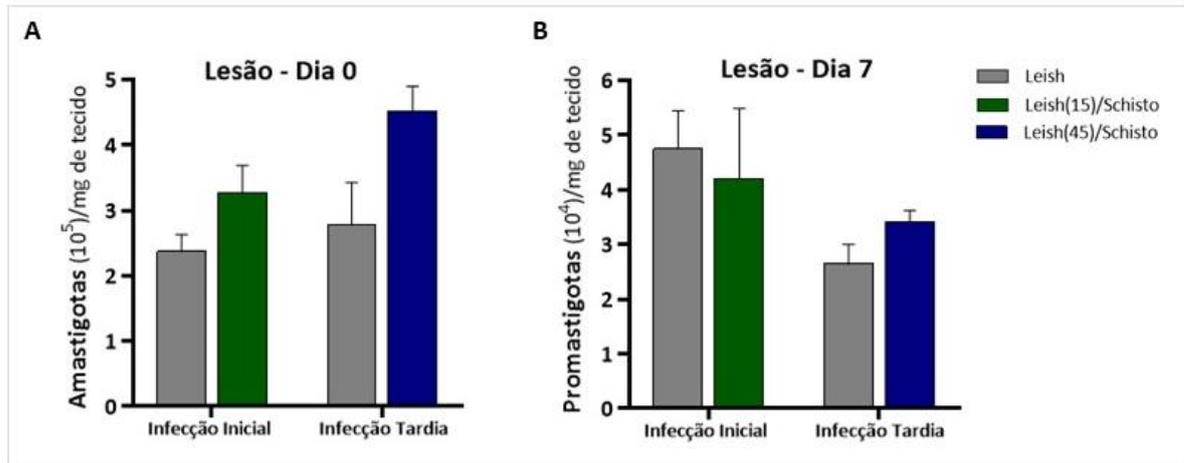


Figura 10| **Quantificação de *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c. A e B|** Média \pm SEM da carga parasitária por mg de tecido das amostras de lesão no momento da extração da lesão (dia 0) e após 7 dias de cultura (dia 7) das amostras de lesão de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish), coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto).

Tabela 1| **Infecção por *L. (L.) amazonensis* em órgãos viscerais de camundongos BALB/c. A e B|** Detecção de parasitos no fígado, baço e linfonodos de cada camundongo infectado por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish), coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto) após 7 dias de cultura. **p<0,01. (Student's t-test). -: negativo; +: positivo.

A

Grupo	Animal	Fígado	Baço	Linfonodo
Leish	1	-	-	+
	2	+	-	+
	3	+	-	-
Leish(15)/Schisto	1	+	+	+
	2	+	-	+
	3	+	+	+
	4	+	-	+
	5	-	+	-
	6	-	+	+

B

Grupo	Animal	Fígado	Baço	Linfonodo**
Leish	1	-	+	$0,725 \times 10^7$
	2	-	+	$0,575 \times 10^7$
	3	-	+	$0,175 \times 10^7$
Leish(45)/Schisto	1	+	-	$3,175 \times 10^7$
	2	-	+	$2,55 \times 10^7$
	3	+	+	$1,2 \times 10^7$
	4	-	+	$1,975 \times 10^7$
	5	+	+	$2,3 \times 10^7$
	6	+	+	$1,85 \times 10^7$

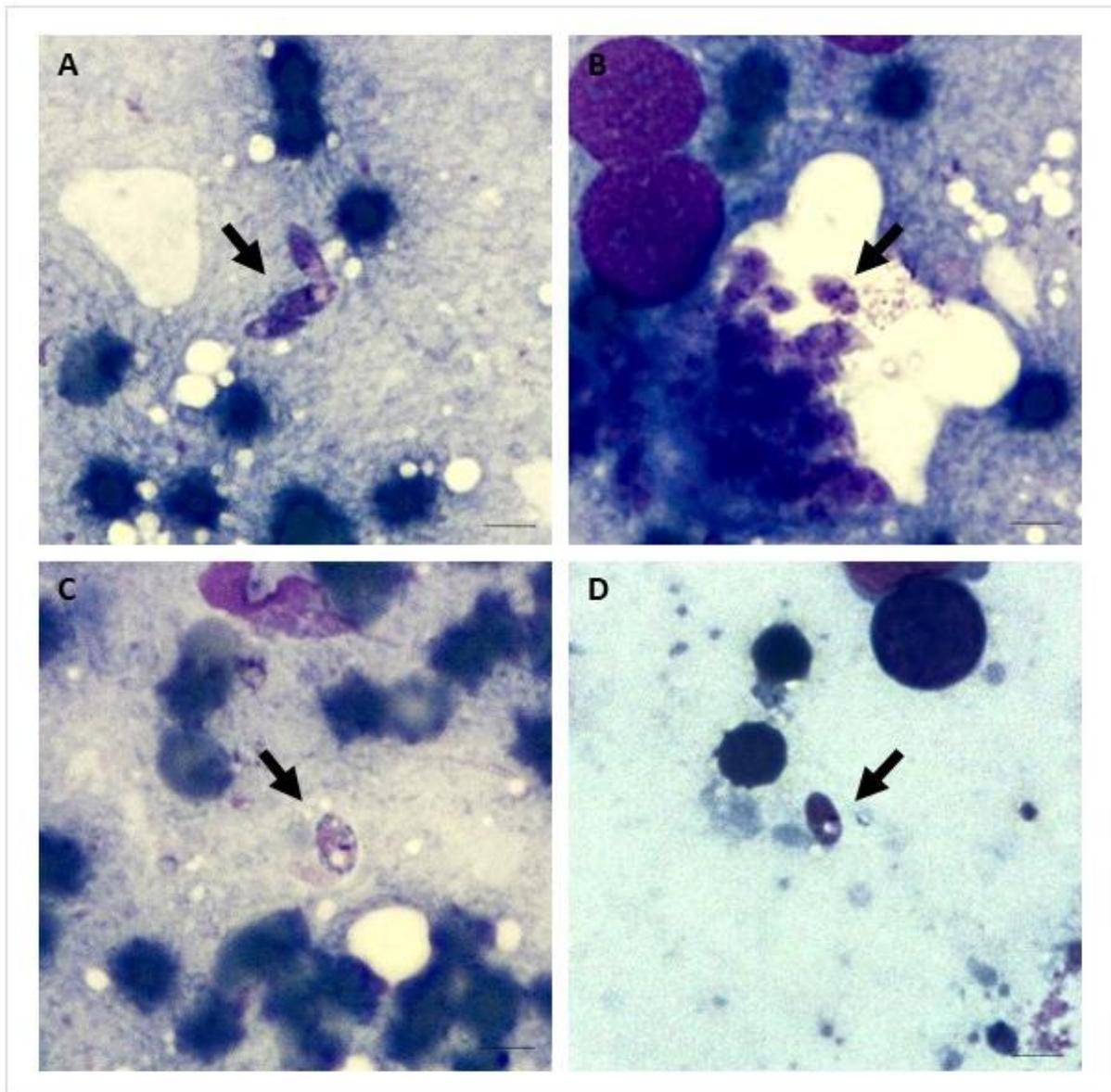


Figura 11| **Imprint de fígado e baço de camundongos BALB/c.** **A, B e C|** Visceralização de amastigotas no fígado de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* e coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni*. **D|** Visceralização de amastigotas no baço de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* e coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni*. Lâminas de *imprint* coradas com kit panóptico rápido e visualizada/fotografada em microscópio óptico, sob aumento de 100x. Barra = 4 μ m.

3.3 Avaliação do Perfil de Produção de Citocinas

Os níveis IL-1 β , IFN- γ , TNF, IL-4, IL-6 e IL-10 foram dosados em porções do fígado e do baço de camundongos não infectados, infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* e são apresentados como dosagem da citocina em ng/mg de proteínas totais. Cada ponto representa a dosagem de um respectivo animal.

3.3.1 Citocinas Pró-Inflamatórias

3.3.1.1 IFN- γ

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IFN- γ no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IFN- γ no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IFN- γ no fígado e no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 12 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IFN- γ no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e infectados apenas por *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IFN- γ do grupo de animais não infectados porém, os níveis de IFN- γ no fígado ($p = 0,0013$) e no baço ($p = 0,0312$) de animais coinfectados foram superiores quando comparados aos níveis de IFN- γ do grupo de animais não infectados. Não há diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IFN- γ no fígado e no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 12 A e B).

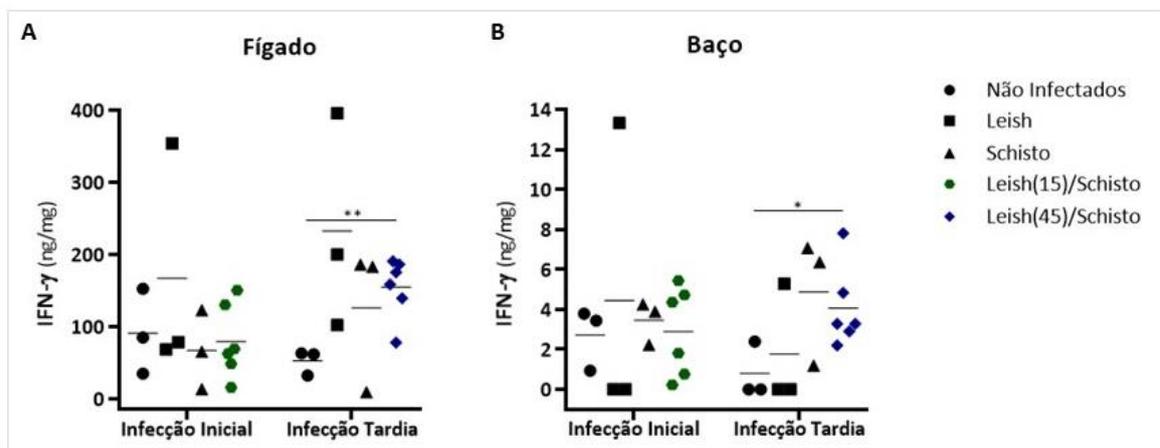


Figura 12| **Perfil da produção de IFN- γ em tecidos.** A) Níveis de IFN- γ no fígado de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). B) Níveis de IFN- γ no baço de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

3.3.1.2 TNF

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de TNF no fígado dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de TNF no fígado do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de TNF no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 13A).

Não há diferenças nos níveis de TNF no baço dos grupos de animais infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de TNF no baço do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de TNF no baço do grupo de animais coinfectados foram inferiores ($p = 0,0124$) quando comparado aos níveis de TNF no baço dos animais infectados apenas por *S. mansoni*. Não houve detecção de TNF no baço de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 13B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de TNF no fígado do grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* quando comparados aos níveis de TNF no fígado do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de TNF no fígado de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0267$) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* ($p = 0,0009$) foram superiores quando comparados aos níveis de TNF no fígado do grupo de animais não infectados (Figura 13A).

Não há diferenças nos níveis de TNF no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de TNF no baço do grupo de animais não infectados. Porém, os níveis de TNF no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* são superiores ($p = 0,0422$) quando comparado ao nível de TNF no baço do grupo de animais coinfectados (Figura 13B).

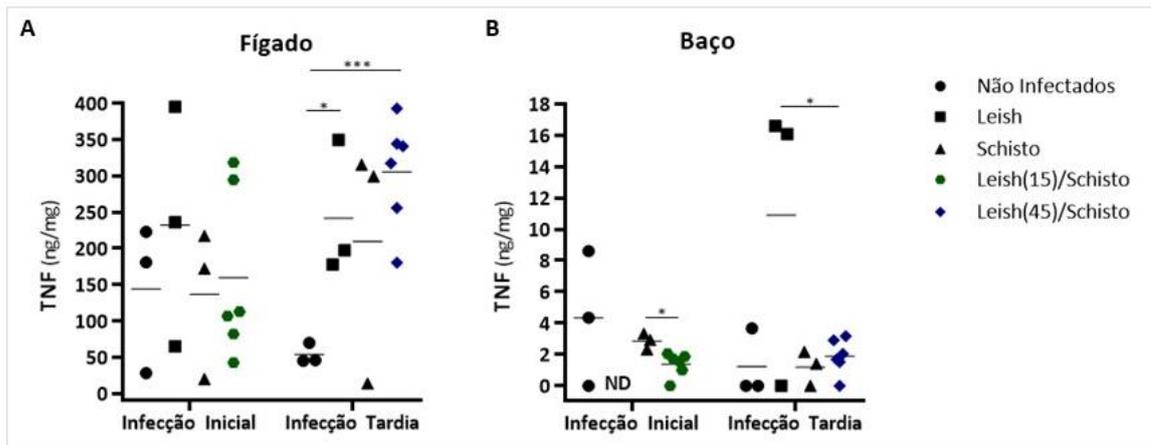


Figura 13 | **Perfil da produção de TNF em tecidos.** A| Níveis de TNF no fígado de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto). B| Níveis de TNF no baço de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* (n = 6) (Leish(45)/Schisto). *p<0,05; ***p<0,001. (Student's t-test) ND: não detectado.

3.3.1.3 IL-1 β

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IL-1 β no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-1 β no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-1 β no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções. Os níveis de IL-1 β no baço de animais infectados apenas por *S. mansoni* foram superiores (p = 0,0021) quando comparado aos níveis de IL-1 β no baço do grupo de animais coinfectados (Figura 14 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IL-1 β no fígado do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e apenas infectados por *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-1 β no fígado do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-1 β no fígado de animais coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* foram superiores (p = 0,0025) quando comparados aos níveis de IL-1 β no fígado do grupo de animais não infectados. Não há diferenças nos níveis de IL-1 β no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 14A).

Não há diferenças nos níveis de IL-1 β no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-1 β no baço do grupo de animais

não infectados. Porém, os níveis de IL-1 β no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* são superiores ($p = 0,0015$) quando comparado ao nível de IL-1 β no baço do grupo de animais coinfectados (Figura 14B).

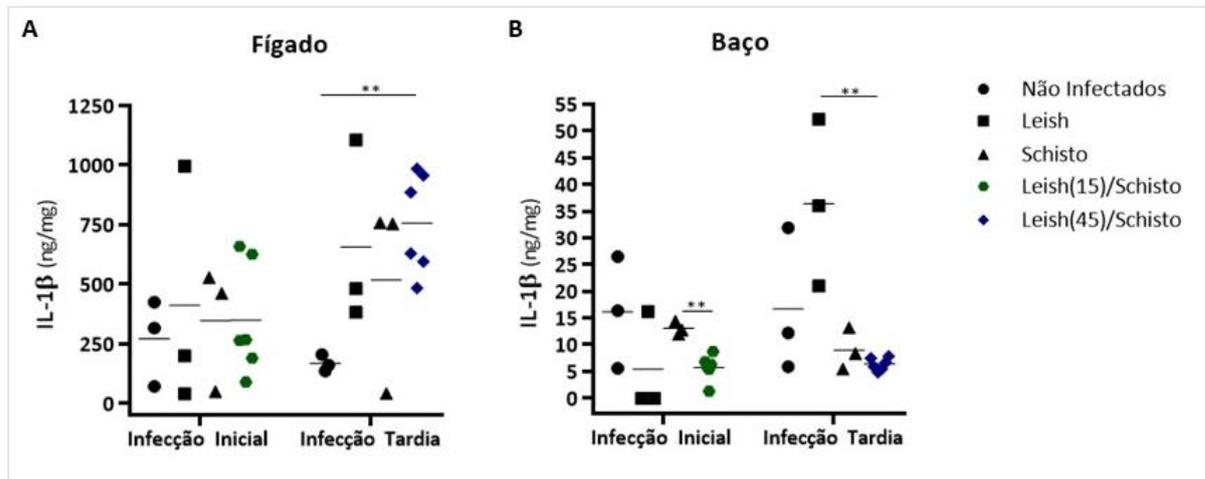


Figura 14| **Perfil da produção de IL-1 β em tecidos.** A| Níveis de IL-1 β no fígado de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). B| Níveis de IL-1 β no baço de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

3.3.2 Citocinas Anti-Inflamatórias

3.3.2.1 IL-4

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IL-4 no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-4 no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-4 no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções. Os níveis de IL-4 no baço de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* foram superiores ($p = 0,0213$) quando comparado aos níveis IL-4 no baço do grupo de animais coinfectados (Figura 15 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IL-4 no fígado do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e apenas infectados por *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-4 no fígado do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-4 no fígado de animais coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* foram superiores ($p = 0,0013$) quando comparados aos níveis de IL-4 no fígado do grupo de animais

não infectados. Não há diferenças nos níveis de IL-4 no fígado do grupo de animais coinfected quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 15A).

Não há diferenças nos níveis de IL-4 no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfected por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-4 no baço do grupo de animais não infectados. Porém, os níveis de IL-4 no baço de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* foram superiores ($p = 0,0019$) quando comparado aos níveis de IL-4 no baço do grupo de animais coinfected (Figura 15B).

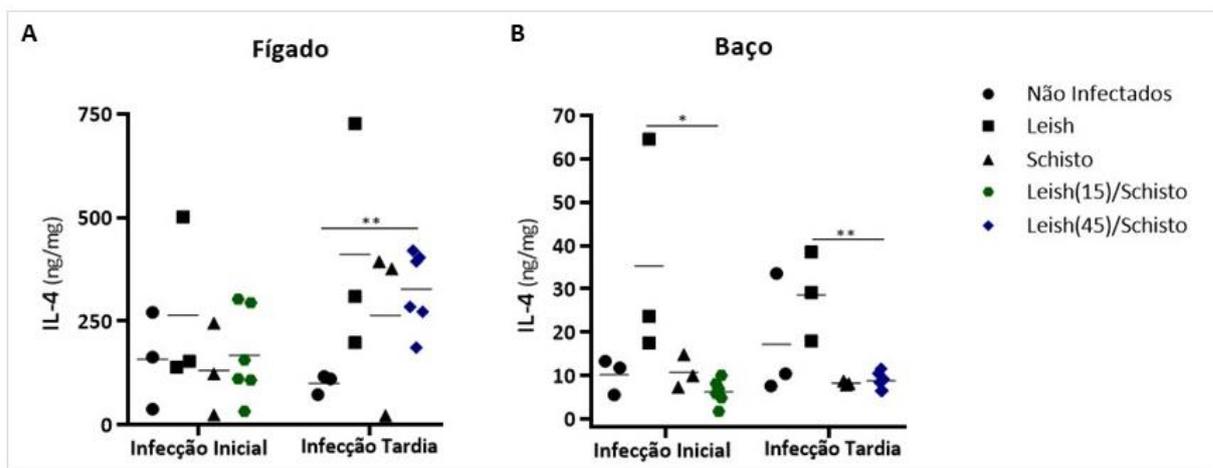


Figura 15/ Perfil da produção de IL-4 em tecidos. A) Níveis de IL-4 no fígado de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfected por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfected por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). B) Níveis de IL-4 no baço de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfected por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfected por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

3.3.1.4 IL-6

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IL-6 no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfected por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-6 no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-6 no fígado e no baço do grupo de animais coinfected quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 16 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e apenas infectados por *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais não infectados, porém,

os níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* foram superiores ($p = 0,0068$) quando comparados aos níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais não infectados. Não há diferenças nos níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais coinfectedados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 16A).

Não há diferenças nos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e apenas infectados por *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-6 no baço do grupo de animais coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* foram superiores ($p = 0,0452$) quando comparados aos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais não infectados. Os níveis de IL-6 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* são superiores ($p = 0,0003$) quando comparado aos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais coinfectedados.

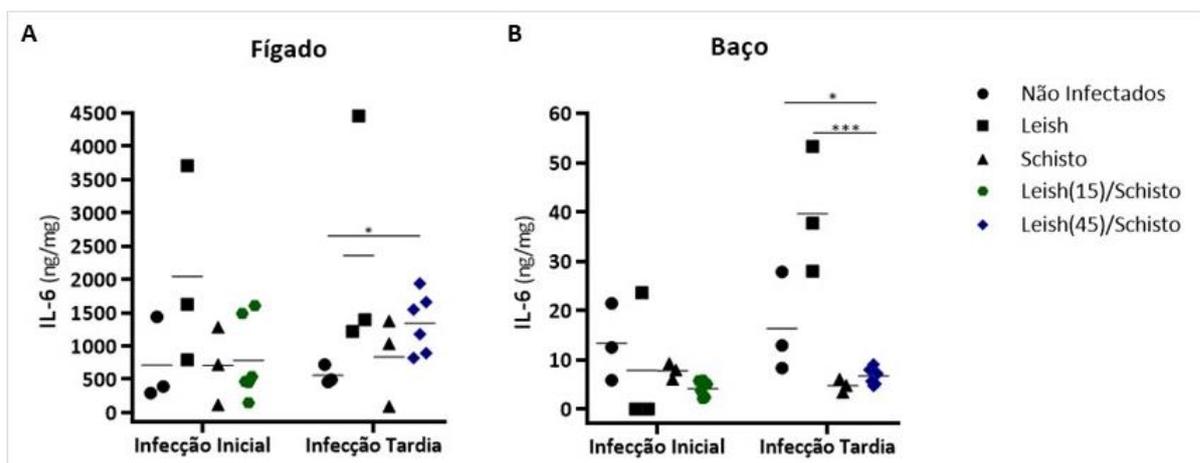


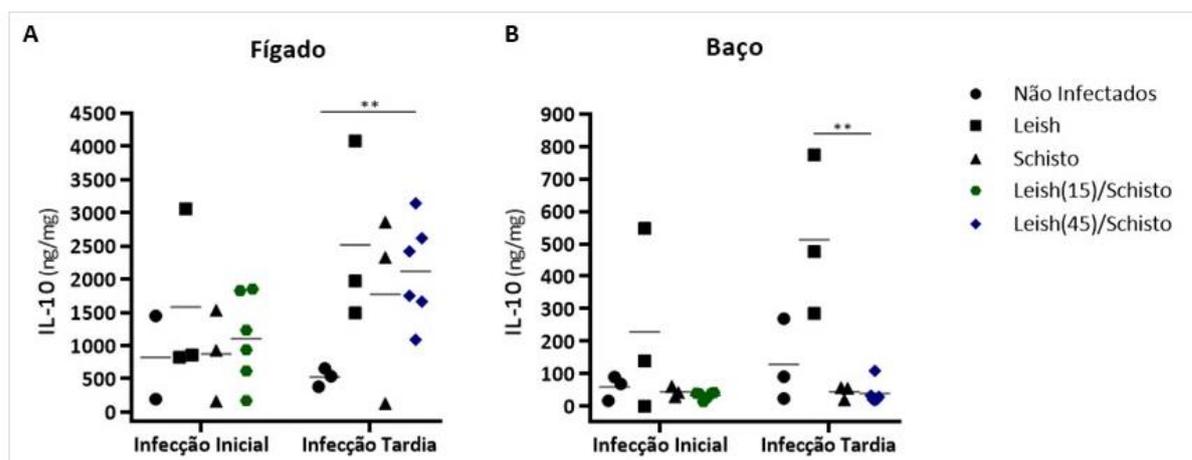
Figura 16| **Perfil da produção de IL-6 em tecidos.** A| Níveis de IL-6 no fígado de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). B| Níveis de IL-6 no baço de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e após 15 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(15)/Schisto) e coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e após 45 dias por *S. mansoni* ($n = 6$) (Leish(45)/Schisto). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (Student's t-test)

3.3.1.5 IL-10

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IL-10 no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectedados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-10 no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-10 no fígado e no baço do grupo de animais coinfectedados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 17 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e infectados apenas por *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* foram superiores ($p = 0,0028$) quando comparados aos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais não infectados. Não há diferenças nos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 17A).

Não há diferenças nos níveis de IL-10 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* quando comparados aos níveis de IL-10 no baço do grupo de animais não infectados. Os níveis de IL-10 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* foram superiores ($p = 0,0016$) quando comparados aos níveis de IL-10 no baço do grupo de animais coinfectados.



4. Discussão

Ao investigar o efeito da coinfecção por *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni*, focou-se na avaliação e comparação de diferentes parâmetros de caracterização de progressão específicos para cada uma das infecções em condições de infecção singular e concomitante e

também buscou-se determinar os perfis de produção de citocinas a nível tecidual, uma vez que o fígado, caracterizado por possuir um ambiente imunologicamente único¹¹⁹⁻¹²¹, e o baço são órgãos primários de lesão patogênica da esquistossomose e, possivelmente, da leishmaniose causada por *L. (L.) amazonensis* como já descrito por Barral *et al*^{84,85}.

A infecção prévia por *L. (L.) amazonensis* aos 15 e 45 dias antes da infecção por *S. mansoni* nos introduz dois cenários distintos, um no qual no momento da infecção por *S. mansoni* a infecção por *L. (L.) amazonensis* ainda não está consolidada, com a presença de parasitos mas sem o desenvolvimento de lesões (15 dias) e outro onde a infecção por *L. (L.) amazonensis* já está bem estabelecida, com a presença de parasitos e lesões aparentes (45 dias).

A partir de 7 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis* e 5 semanas de infecção por *S. mansoni* no Grupo 1 (Infecção Inicial), período no qual ambas as infecções já estão estabelecidas, os camundongos coinfectados apresentaram lesões na pata menores comparadas às lesões dos camundongos infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, diferença que se manteve pelas semanas seguintes até o fim da infecção. Essa atenuação no desenvolvimento da lesão não foi, no entanto, devido a uma redução na carga parasitária, já que o número de parasitos encontrados na lesão de animais coinfectados e animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ao final da infecção foi equivalente. Esses resultados podem indicar que a partir do estabelecimento de uma forte resposta imunológica Th₂, característica da infecção por *S. mansoni* (a partir da 5ª semana de infecção), há uma atenuação no desenvolvimento da lesão cujo mecanismo parece ser independente da carga parasitária. Tal relação de independência entre o desenvolvimento da lesão e a carga parasitária é coerente com resultados apresentados por La Flamme⁴⁴ em estudo de coinfecção por *S. mansoni* e *L. (L.) major* e por Afonso e Scott¹²² durante estudo de suscetibilidade de camundongos C57BL/10 por *L. (L.) amazonensis*.

Não há diferenças, entretanto, nos tamanhos da lesão ao longo da infecção entre os camundongos coinfectados e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* no Grupo 2 (Infecção Tardia), apesar do número de parasitos encontrados na lesão de animais coinfectados ter uma tendência a ser superior ao número de parasitos encontrados na lesão de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ao final da infecção. Novamente, após 5 semanas de infecção por *S. mansoni*, nota-se uma tendência de atenuação no desenvolvimento de lesões em camundongos coinfectados, o que reforça a hipótese de que o tamanho da lesão parece ser independente da carga parasitária.

Para avaliar se a infecção por *L. (L.) amazonensis* alterou o curso da infecção subsequente por *S. mansoni*, o número de vermes e a quantidade de ovos eliminados nas fezes foi examinado. Nenhuma diferença foi encontrada nas cargas parasitárias ou no número total

de ovos eliminados nas fezes entre camundongos coinfectados e camundongos infectados apenas por *S. mansoni*, concluindo que, com base nesses parâmetros, a infecção por *L. (L.) amazonensis* não alterou significativamente o curso da infecção por *S. mansoni* tanto no intervalo de 15 dias quanto no intervalo de 45 dias entre as infecções.

No entanto, ao observar que o desenvolvimento de lesões ulceradas nos animais coinfectados do Grupo 2 (Infecção Tardia) foi precoce e acentuado quando comparado ao desenvolvimento de lesões ulceradas nos animais controles da infecção por *L. (L.) amazonensis*, passou-se a avaliar a possibilidade de uma antecipação da oviposição, que conhecidamente para a linhagem de *S. mansoni* utilizada se dá a partir dos 45 dias de infecção. Dois dos seis animais coinfectados apresentaram ovos nas fezes após 35 dias de infecção. Este resultado nos encoraja a supor que a presença de *L. (L.) amazonensis* no fígado pode estar relacionada a essa antecipação inesperada da oviposição, já que esses mesmos dois animais apresentaram parasitos nas culturas de amostras de fígado. Esse resultado é relevante porque se há uma mudança nas características biológicas dos esquistossomos associada à presença de outro parasito, tal fator poderia ocasionar mudanças nos padrões de transmissão e da patologia da doença.

Apesar dessa alteração na oviposição observada em dois animais coinfectados, não houveram outras alterações significativas no curso da esquistossomose, resultados suportados também pela ausência de diferenças na produção de IL-4, IL-6 e IL-10, umas das principais citocinas envolvidas na resposta imune à esquistossomose^{13,14}, no fígado e no baço dos camundongos coinfectados e infectados apenas por *S. mansoni*, indicando que a coinfecção por *L. (L.) amazonensis* também não alterou a resposta imune específica e característica da esquistossomose nos Grupo 1 (Infecção Inicial) e Grupo 2 (Infecção Tardia).

Sabe-se que a esquistossomose é uma doença que potencialmente causa morbidades sistêmicas incluindo a anemia, perda de peso e o desenvolvimento de extensa fibrose com conseqüente hepatoesplenomegalia¹²³. Dessa forma, monitorar e avaliar os pesos dos animais ao longo da infecção e os pesos dos órgãos acometidos pela esquistossomose e leishmaniose, tornaram-se parâmetros de caracterização importantes para avaliar a progressão das doenças.

Há uma tendência de crescimento natural e homogêneo dos animais ao longo das semanas, porém, em ambos os intervalos de tempo entre as coinfecções, nota-se um padrão de queda da porcentagem de crescimento do peso corpóreo nos grupos de animais infectados por *S. mansoni* (coinfecção e monoinfecção) após 5 semanas de infecção por *S. mansoni*.

Considerando que o aumento dos órgãos influencia o peso total dos camundongos, e que o aumento dos pesos do fígado e do baço são extremamente relevantes na patogenia da esquistossomose, da mesma forma que o aumento da pata infectada se mostrou

significativamente superior em todos os grupos de animais com leishmaniose, avaliamos o peso total dos camundongos subtraindo o peso desses dois órgãos e da pata esquerda, a fim de visualizar a real perda de peso e caquexia, evidentes como sinal clínico apresentado pelos animais ao longo da infecção. As maiores diferenças significativas em relação ao peso do grupo de animais não infectados foram encontradas nos grupos em que havia a presença de *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis*, evidenciando que a presença dos dois parasitos tem um impacto negativo significativo no aspecto físico dos animais.

Apesar dos animais coinfectados terem apresentado a maior porcentagem de perda de peso corpóreo, os pesos dos fígados e baços parecem ser modulados apenas pela presença do *S. mansoni*, uma vez que não foram encontradas diferenças entre os pesos do fígado e baço do grupo de animais coinfectados comparados ao grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni*, mas essa diferença é evidente quando comparados aos pesos dos fígados e baços dos grupos infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e não infectados. Há também um aumento do peso do baço no grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* comparado ao grupo de animais não infectados, o que pode estar relacionado à alta carga parasitária encontrada nos baços dos animais desse grupo. O peso das patas infectadas dos animais coinfectados e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* é superior quando comparada ao peso das patas controle dos animais não infectados, resultado esperado já que o inchaço no sítio da lesão é a principal manifestação clínica na leishmaniose tegumentar murina.

O perfil de produção de citocinas no fígado e no baço foi avaliado ao final das infecções e, no Grupo 1 (Infecção Inicial), parece não haver modulação da resposta imune no fígado por parte de um dos parasitos uma vez que não há diferenças nas dosagens de IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IFN- γ , IL-6 e IL-10 no baço. Porém, há diferenças nos níveis de IL-4 no baço, que parecem ser modulados pela infecção por *S. mansoni*, resultado esperado frente à forte e polarizada resposta imune do tipo Th₂ induzida por *S. mansoni*⁷². Os níveis de TNF e IL-1 β no baço são inferiores nos grupos de animais coinfectados e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* em relação aos níveis de IL-1 β no grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni*, resultado também esperado se considerarmos que a ausência ou baixa produção de TNF e IL-1 β , importantes citocinas para a resposta imune de resistência à infecção por *Leishmania*⁹⁶, levam à exacerbação da doença¹⁰³, como observada nos animais com leishmaniose.

Já no Grupo 2 (Infecção Tardia), os níveis de IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10 no fígado não apresentaram diferenças entre o grupo de animais coinfectados e os grupos de infecções controles, mas foram superiores comparados aos níveis do grupo de animais não

infectados. No baço, os níveis de TNF, IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10 são modulados pela infecção por *S. mansoni*. Tais resultados indicam que mesmo após uma infecção por *L. (L.) amazonensis* bem estabelecida, os mecanismos imunomoduladores induzidos por *S. mansoni* polarizam a resposta imune.

A parasitologia contempla não apenas as interações entre espécies, mas também destas com o ambiente (que pode ser o próprio hospedeiro), logo, seu viés ecológico é indissociável ³. Porém, o fenômeno parasitismo ainda recebe um enfoque tradicional, antropocêntrico e militarista no qual um ou mais organismos necessariamente causam danos ao hospedeiro. Lenzi e Vannier-Santos ⁴, no entanto, nos trazem uma visão alternativa a essas ideias convencionais, oferecendo uma abordagem ecológica da coabitação parasito-hospedeiro a qual sugere que o termo *coabitante* é mais preciso que o termo *parasito* porque é cada vez mais claro que todo ser vivo compõe um sistema adaptativo que flui em uma dinâmica contínua de trocas onde é difícil mensurar os ganhos e perdas dos respectivos parceiros.

Tal abordagem pode ser estendida, dentro do contexto deste trabalho, para descrever a relação entre parasitos coexistindo e vivendo juntos. Relações estas que podem ir desde o aumento até a supressão de um ou de ambos os agentes infecciosos e do consequente aumento ou melhoria da patologia, proposto neste trabalho como *coinfecção*; ou também não sofrerem alteração alguma, proposto neste trabalho como *coabitação*.

Isso significa que a natureza de qualquer infecção parasitária específica em um hospedeiro infectado concomitantemente a outro agente infeccioso pode ser muito diferente de uma infecção causada pelo mesmo parasito em um hospedeiro não infectado por outro patógeno, e que isso pode gerar diversas implicações em aspectos epidemiológicos, clínicos das doenças humanas e veterinárias, no desenvolvimento de vacinas ¹²⁴ e no uso da quimioterapia.

O objetivo deste estudo foi então fornecer algumas indicações sobre a variedade de interações que ocorrem quando um hospedeiro é infectado por mais de um agente infeccioso, no caso, dois agentes causadores de doenças endêmicas no território brasileiro que já tem sido reportadas ocorrendo simultaneamente ^{48,49} e fortalecer a ideia proposta por Cox ⁶ de que as infecções concomitantes, apesar de ainda receberem pouca atenção, talvez sejam a regra e não a exceção e por isso a importância de compreender essas interações e as consequências que elas geram em seus hospedeiros.

CAPÍTULO II

Avaliação das alterações patológicas e imunológicas provocadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos previamente infectados por *Schistosoma mansoni*

Capítulo II - Avaliação das alterações patológicas e imunológicas provocadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos previamente infectados por *Schistosoma mansoni*

1. Introdução

Grande parte das populações hospedeiras naturais estão constantemente expostas a diversas espécies de parasitos, consequência de uma sobreposição geográfica de suas distribuições, tornando cada vez mais prevalente a ocorrência de infecções parasitárias concomitantes em um mesmo hospedeiro ⁵. O termo *infecções concomitantes* refere-se então a uma situação onde dois ou mais agentes infecciosos, geneticamente diferentes, coexistem em um mesmo hospedeiro, podendo ou não gerar importantes consequências nos cursos de suas infecções ⁶. Na natureza, as infecções concomitantes não são exceção e há registros pré-históricos de sua ocorrência ^{7,8}. O que é menos conhecido e abordado pelos principais textos de parasitologia é que existem inúmeras interações, intensas ou sutis, entre esses organismos presentes em um mesmo hospedeiro, sendo portanto necessário considerar a natureza das possíveis consequências dessas interações, que incluem organismos como: vírus, bactérias, helmintos e protozoários, interagindo entre si ou entre as diferentes espécies de um mesmo grupo ⁶.

Existe uma sobreposição na distribuição epidemiológica do helminto *Schistosoma mansoni* e de algumas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* em vários países da África, América Central e América do Sul, incluindo o Brasil. Em virtude dessa extensa sobreposição geográfica, *S. mansoni* e espécies de *Leishmania* podem, ocasionalmente, coinfectar os mesmos indivíduos ^{48,49,108,109}. Além disso, a probabilidade da ocorrência da coinfeção *S. mansoni/Leishmania* é intensificada por conta do padrão crônico de cada uma das doenças e pelo deslocamento de pessoas cada vez mais intenso entre as áreas endêmicas ^{110,111}. No caso do Brasil, é relevante compreender e estabelecer os parâmetros da coinfeção *in vivo* por *S. mansoni*, espécie responsável pela esquistossomose mansônica e de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, uma das espécies causadora da leishmaniose cutânea e responsável pela forma difusa da doença e com potencial de visceralização; uma vez que ambas são endêmicas no território brasileiro e estudos de coinfeção experimental entre essas duas espécies, que seja do nosso conhecimento, nunca foram reportados na literatura até o momento. Ademais, as evidências disponíveis sobre a modulação imune causada pelos helmintos nos encorajam a supor que a interação entre esses dois agentes (*S. mansoni/L. (L.) amazonensis*)

pode vir a contribuir para a ocorrência de manifestações incomuns dos quadros clínicos de duas das mais antigas, severas e ainda negligenciadas parasitoses em humanos: esquistossomose e leishmaniose cutânea.

2. Material e Métodos

2.1 Configuração Experimental

O Capítulo II deste trabalho visou avaliar as alterações patológicas e imunológicas quando a infecção por *S. mansoni* precedeu a infecção por *L. (L.) amazonensis*, com intervalos de 15 e 45 dias entre as infecções, períodos definidos como Infecção Inicial e Infecção Tardia, e que estão relacionados às fases aguda (15 dias) e crônica (45 dias) da esquistossomose, respectivamente.

Foram estabelecidos dois grupos experimentais: Grupo 1 – Infecção Inicial (infecção por *S. mansoni* e após 15 dias a infecção por *L. (L.) amazonensis*) e Grupo 2 – Infecção Tardia (infecção por *S. mansoni* e após 45 dias a infecção por *L. (L.) amazonensis*) com quinze animais em cada grupo. Os animais foram então subdivididos em cinco grupos de infecção conforme esquema abaixo:

Grupo 1 – Infecção Inicial

NI: animais não infectados (grupo controle); n = 3.

Leish: animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (infecção controle); n = 3.

Schisto: animais infectados apenas por *S. mansoni* (infecção controle); n = 3.

Schisto(15)/Leish: animais infectados por *S. mansoni* e após 15 dias, infectados por *L. (L.) amazonensis* (infecção inicial); n = 6.

Grupo 2 – Infecção Tardia

NI: animais não infectados (grupo controle); n = 3.

Leish: animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (infecção controle); n = 3.

Schisto: animais infectados apenas por *S. mansoni* (infecção controle); n = 3.

Schisto(45)/Leish: animais infectados por *S. mansoni* e após 45 dias, infectados por *L. (L.) amazonensis* (infecção tardia); n = 6.

As infecções dos grupos de animais coinfectados foram realizadas em simultâneo e nas mesmas condições das infecções controle para cada um dos parasitos.

2.2 Animais

Para a realização dos ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c marcados individualmente, com 30 dias de idade, pesando \approx 20 g. Os animais receberam água filtrada, ração autoclavada *ad libitum* e foram mantidos em mini-isoladores com maravalha autoclavada em Rack ventilado (Alesco®) substituída duas vezes na semana. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas.

É importante destacar que os modelos de animais de laboratório infectados por *Schistosoma mansoni* e *Leishmania* spp. estão bem estabelecidos na literatura e são rotineiramente mantidos nos laboratórios onde este projeto foi desenvolvido.

O peso corpóreo dos animais foi monitorado semanalmente, inclusive no período anterior à infecção/infecções, começando aos 30 dias de vida. Ao final das infecções, os fígados, baços e patas infectadas e controle foram pesadas.

2.3 Parasitos e Infecções

2.3.1 *Schistosoma mansoni*

Neste estudo foi utilizada a linhagem BH (Belo Horizonte) de *Schistosoma mansoni*. Essa linhagem é mantida no Departamento de Biologia Animal (UNICAMP) em moluscos planorbídeos *Biomphalaria glabrata* e em camundongos fêmeas *Mus musculus*, linhagens Swiss e BALB/c, com protocolo aprovado pelo CEUA/UNICAMP (protocolo número 4798-1/2018).

Para a infecção, os camundongos foram contidos em dispositivos específicos e infectados utilizando-se a técnica de imersão caudal em tubos de ensaio contendo uma suspensão de cercárias durante 2 horas com exposição à luz e temperatura de aproximadamente 28° C ¹¹⁴. Os camundongos foram infectados individualmente com aproximadamente 70 cercárias cada.

2.3.2 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A cepa de *L. (L.) amazonensis* utilizada nesse estudo foi a MHOM/BR/1973/M2269. Essa cepa é mantida nas formas promastigota em culturas líquidas a 26° C e amastigota em camundongos BALB/c infectados periodicamente no Departamento de Biologia Animal (UNICAMP), com protocolo aprovado pelo CEUA/UNICAMP (protocolo número 3484-1).

Foi utilizado o modelo de infecção para leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c fêmeas, avaliando-se para isso, camundongos BALB/c que foram infectados no coxim plantar traseiro esquerdo com 2×10^6 promastigotas de populações enriquecidas de metacíclicos purificados a partir de incubação com anticorpo m3A.1. em suspensões líquidas (PBS 1X) de até 50 µL/inóculo ¹¹⁵.

Semanalmente, a espessura das patas traseiras dos animais foi medida com paquímetro digital (Mitutoyo, Japan) e a diferença entre a pata infectada e pata não infectada indicava o tamanho da lesão (mm) e o tamanho da úlcera expresso como a área da úlcera (mm²). A aparência macroscópica da lesão foi registrada com câmera fotográfica digital ao final das infecções.

2.4 Determinação das Cargas Parasitárias

2.4.1 *Schistosoma mansoni*

2.4.1.1 Número de Parasitos Adultos

Após o período determinado para o término da infecção do hospedeiro definitivo, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os vermes adultos foram recuperados por meio da perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas de acordo com Pellegrino & Siqueira ¹¹⁶.

2.4.1.2 Contagem de Ovos nas Fezes

As fezes de cada animal foram coletadas a cada 15 dias após 45 dias de infecção, para realizar a contagem do número de ovos eliminados, utilizando-se o método quantitativo Kato-Katz ¹¹⁷. Foi utilizado o Kit comercial Helm Test (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ) para determinar o número de ovos/grama. Os animais foram separados em gaiolas individuais e fezes frescas foram utilizadas para realizar a técnica. As fezes foram submetidas à triagem em nylon

e a quantidade exata de fezes foi determinada pelo preenchimento de um orifício de diâmetro conhecido (fornecido pelo kit) e depois colocado em uma lâmina de vidro. As fezes já dispostas na lâmina foram cobertas com papel celofane impregnado com solução de verde malaquita (solução aquosa a 3 %) a fim de preservar e branquear o material. Em cada tempo de experimento, duas lâminas foram feitas por animais e lidas no microscópio de luz. O número de ovos foi determinado pela fórmula padrão do Kit Helm Test, Bio-Manguinhos: número de ovos contado x 4 = ovos/grama de fezes.

2.4.2 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Os ensaios de quantificação de carga parasitária foram realizados segundo protocolo de diluição limitante estabelecido por Lima e colaboradores¹¹⁸, com modificações. Os animais eutanasiados tiveram a área da lesão isolada e porções previamente pesadas de órgãos como fígado, baço e linfonodos poplíteos homogeneizados em tubos de vidro com homogeneizador estéril a 4° C em PBS 1X estéril. O material coletado foi centrifugado a 4° C a 60 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4° C a 600 x g por 5 minutos e, neste caso, o sedimento foi ressuscitado em 1 mL de PBS 1X estéril, dos quais 10 µL foram transferidos para uma placa de 24 poços contendo 2 mL de meio de cultura de crescimento de promastigotas M199 (Sigma-Aldrich) e 10 µL de estreptomicina e 2 µL gentamicina, e outros 10 µL transferidos para a câmara de Neubauer para a quantificação aproximada de amastigotas por mg de tecido, apresentada como a quantificação no dia 0.

As culturas foram incubadas a 26° C por sete dias e a carga parasitária foi estimada baseando-se na contagem de promastigotas realizadas em câmara de Neubauer encontradas no 7° dia, observadas em microscópio óptico invertido acoplado com câmera invertida (Leica DFC 295). A carga parasitária no fígado e baço, quando detectada, foi normalizada levando em conta o peso da porção inicial em relação ao peso total do órgão isolado para cultura.

2.5 Ensaio para Determinar a Produção de Citocinas

As porções de fígado e baço previamente pesadas foram processadas na presença do inibidor de protease e as citocinas foram dosadas no homogenato. As proteínas totais foram dosadas pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) com limite de detecção mínimo de 31,25 mg/mL.

Foram obtidos os perfis de produção de citocinas IL-1β, IFN-γ, TNF, IL-4, IL-6 e IL-10 no fígado e no baço pelo método de ELISA sanduíche. Os limites de detecção mínimos

são 31,25 pg/mL para IL-1 β ; 3,125 pg/mL para IFN- γ ; 15,625 pg/mL para TNF; 9,375 pg/mL para IL-4; 15,625 pg/mL para IL-6 e 31,25 pg/mL para IL-10 (BD Biosciences). Os procedimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante.

2.6 Imprint

2.6.1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Foram preparadas lâminas com aposição de material de fígado e baço de animais coinfectados e controles da infecção por *L. (L.) amazonensis*, pressionando-os levemente contra a lâmina para posterior secagem à temperatura ambiente e fixação com metanol puro e coloração com o kit panóptico rápido (Newprov, Pinhais – PR) para a observação de parasitos que eventualmente tenham se disseminado do sítio da lesão cutânea.

2.7 Comissão de Ética

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA/UNICAMP) e aprovado sob protocolo de número 4577-1/2017.

2.8 Análises Estatísticas

As diferenças estatísticas entre os grupos foram testadas usando a Análise de Variância (one-way ANOVA) e o Student's t-test não pareado, utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, *GraphPad Software*, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Todos os resultados analisados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Os dados são apresentados como média \pm SEM.

3. Resultados

3.1 Pesagens

O peso corporal de todos os animais foi monitorado semanalmente. Foi avaliado o percentual de crescimento semanal em relação ao peso inicial de cada animal a fim de

estabelecermos curvas de padrões de aumento ou redução do peso de cada um dos grupos ao longo das infecções.

Ao final das infecções, foram pesados os fígados, baços e patas esquerdas infectadas e controle. O peso dos órgãos é apresentado em porcentagem do órgão em relação ao peso corpóreo total de cada respectivo animal, de modo a estabelecermos um padrão para análise do aumento ou redução do peso dos órgãos de cada grupo em relação aos grupos controles.

3.1.1 Peso Corporal

O peso corporal de todos os animais foi monitorado semanalmente e o percentual de crescimento semanal em relação ao peso inicial é apresentado na Figura 1. Não há diferença estatisticamente significativa entre o peso inicial de todos os grupos de animais dos Grupo 1 – Infecção Inicial e Grupo 2 – Infecção Tardia. Nota-se uma tendência da queda do peso dos animais a partir da 5ª semana após a infecção por *S. mansoni*. Apesar dessa tendência, não houve diferença entre o peso dos grupos de animais infectados por *S. mansoni* e o peso do grupo de animais não infectados.

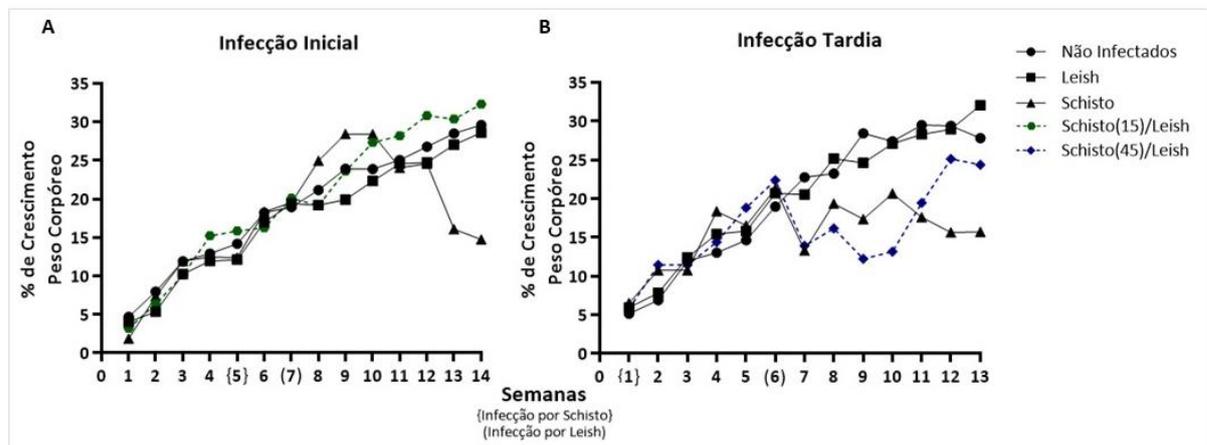


Figura 1| **Porcentagem de crescimento de camundongos BALB/c.** A e B| Média da porcentagem de crescimento de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish) ao longo das semanas. Não há diferenças estatisticamente significativas entre o peso inicial de todos os grupos. (One-way ANOVA)

Considerando que o aumento dos pesos dos órgãos dos camundongos influencia o peso total do camundongo dificultando a visualização de perda de peso e potencial caquexia (importantes aspectos clínicos da esquistossomose), o peso dos diferentes grupos foi comparado após subtração dos pesos do fígado, baço e pata esquerda.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, o peso corpóreo após subtração do peso do fígado, baço e pata esquerda do grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* é inferior quando comparado ao grupo de animais não infectados ($p = 0,0075$) e coinfetados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0123$). Não há diferenças entre o peso corpóreo após subtração do peso do fígado, baço e pata esquerda dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e coinfetados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparado ao grupo de animais não infectados.

No Grupo 2 – Infecção Tardia, os pesos corpóreos após subtração dos pesos do fígado, baço e pata esquerda do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e infectados apenas por *S. mansoni* não apresentam diferenças quando comparado ao grupo de animais não infectados. Porém, é inferior no grupo de animais coinfetados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0198$) quando comparado ao grupo de animais não infectados.

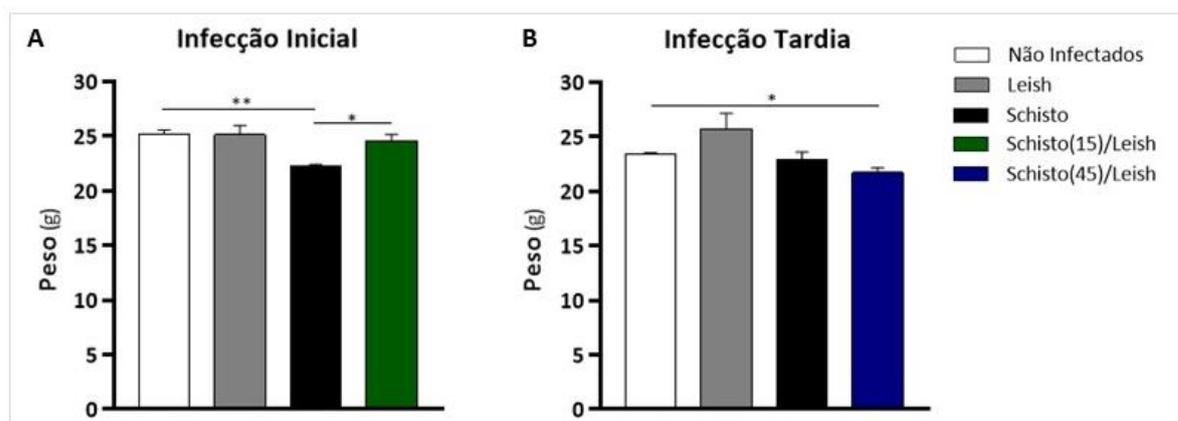


Figura 2| **Peso total dos camundongos BALB/c após remoção do peso de órgãos acometidos (fígado, baço e pata esquerda).** A e B| Média \pm SEM do peso corpóreo após remoção do peso do fígado, baço e pata esquerda de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfetados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfetados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

3.1.2 Peso do Fígado

O peso do fígado dos animais é expresso como a média da porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de cada respectivo animal e é apresentado na Figura 3.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0354$), infectados por *S. mansoni* ($p < 0,0001$) e coinfetados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,0001$) é superior quando comparado ao grupo de animais não infectados. Ao comparar o grupo de animais

coinfectedos com cada uma das infecções controle, nota-se que a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo é inferior ($p = 0,0011$) quando comparado ao grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* e superior quando comparado ao grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,0001$) (Figura 3A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* não apresenta diferenças quando comparado ao grupo de animais não infectados. Porém, é superior nos grupos infectados por *S. mansoni* ($p = 0,0089$) e coinfectedos por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,001$). Ao comparar o grupo de animais coinfectedos com cada uma das infecções controle, nota-se que não há diferenças entre os animais infectados apenas por *S. mansoni*, mas a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* é inferior ($p = 0,0014$) (Figura 3B).

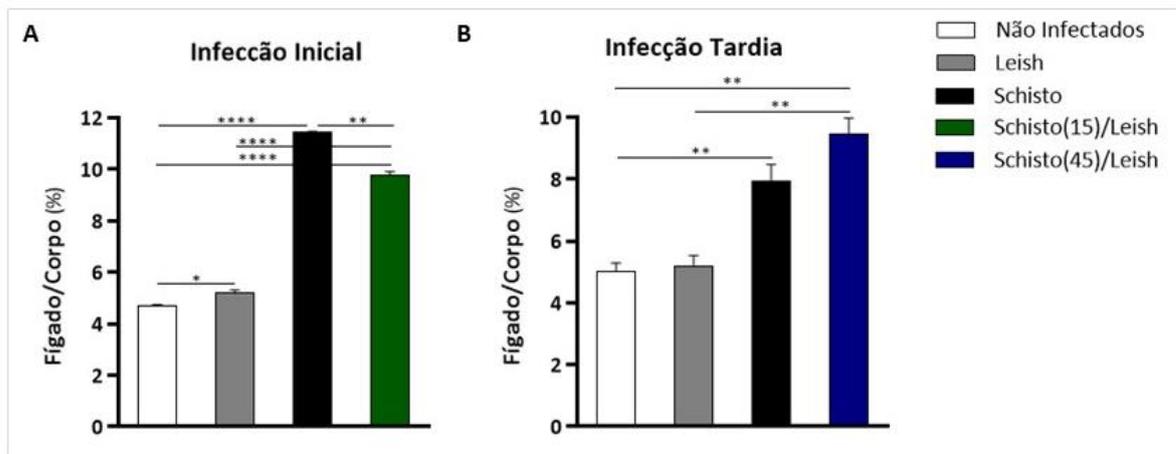


Figura 3| **Diferenças do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM da porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectedos por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfectedos por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. (Student's t-test)

3.1.3 Peso do Baço

O peso dos baços dos animais é expresso como a média da porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de cada respectivo animal e é apresentado na Figura 4.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, a porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0425$), infectados por *S. mansoni* ($p < 0,0001$) e coinfectedos por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,0001$) é superior

quando comparado ao grupo de animais não infectados. Ao comparar o grupo de animais coinfectados com cada uma das infecções controle, nota-se que a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo é inferior ($p = 0,0014$) quando comparado ao grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* e superior quando comparado ao grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,0001$) (Figura 4A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, a porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* não apresenta diferenças quando comparado ao grupo de animais não infectados. Porém, é superior nos grupos infectados por *S. mansoni* ($p = 0,0078$) e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0098$). Ao comparar o grupo de animais coinfectados com cada uma das infecções controle, nota-se que não há diferenças entre os animais infectados apenas por *S. mansoni*, mas a porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corpóreo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* é inferior ($p = 0,0096$) (Figura 4B).

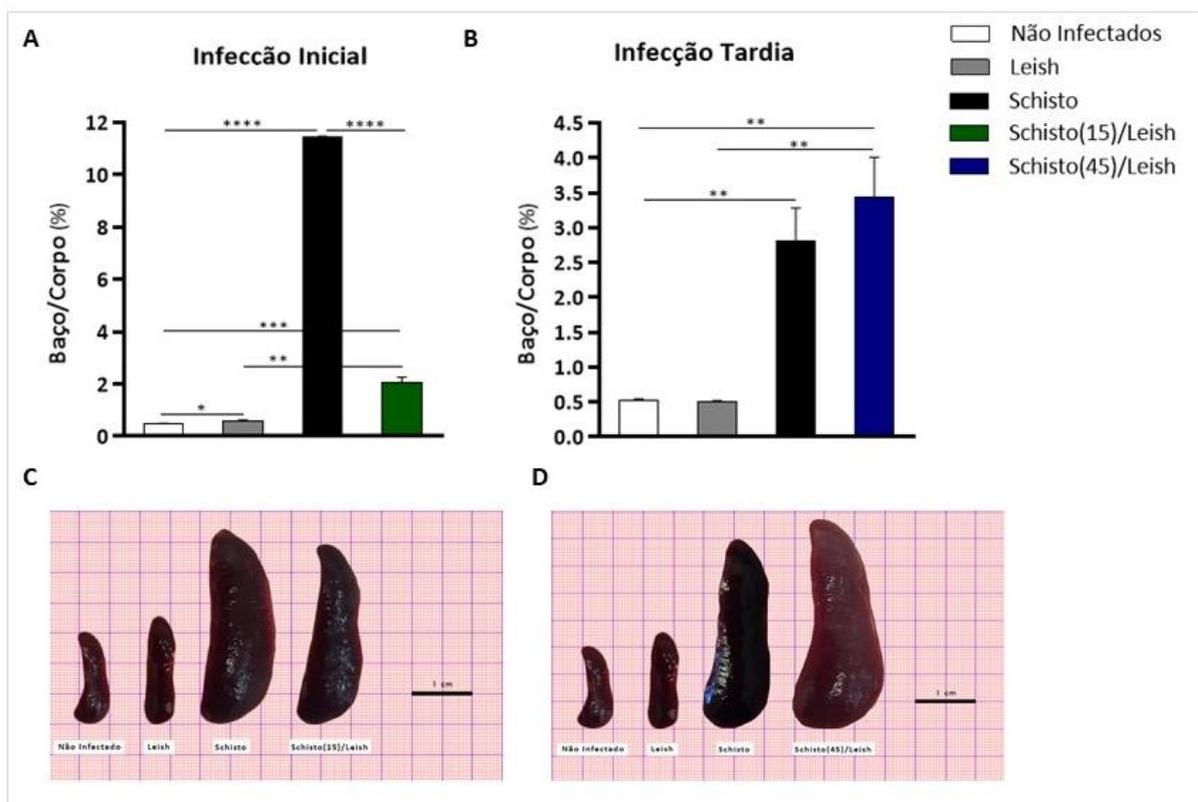


Figura 4| **Diferenças do peso do baço em relação ao peso corpóreo de camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM da porcentagem do peso do baço em relação ao peso corpóreo de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (Student's t-test) C e D| Aspecto macroscópico do baço de camundongos não infectados; infectados por *L. (L.) amazonensis* (Leish); infectados por *S. mansoni* (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.)*

amazonensis (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (Schisto(45)/Leish).

3.1.4 Peso da Pata Esquerda

O peso da pata esquerda dos animais é expresso como a média da porcentagem do peso da pata esquerda em relação ao peso corpóreo de cada respectivo animal e é apresentado na Figura 5.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças na porcentagem do peso da pata em relação ao peso corpóreo de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparado ao grupo de animais não infectados. Ao comparar o grupo de animais coinfectados com a infecção controle por *L. (L.) amazonensis*, nota-se que também não há diferenças entre a porcentagem do peso da pata infectada em relação ao peso corpóreo (Figura 5A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças na porcentagem do peso da pata em relação ao peso corpóreo de animais infectados por *L. (L.) amazonensis* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparado ao grupo de animais não infectados. Ao comparar o grupo de animais coinfectados com a infecção controle por *L. (L.) amazonensis*, nota-se que também não há diferenças entre a porcentagem do peso da pata infectada em relação ao peso corpóreo (Figura 5B).

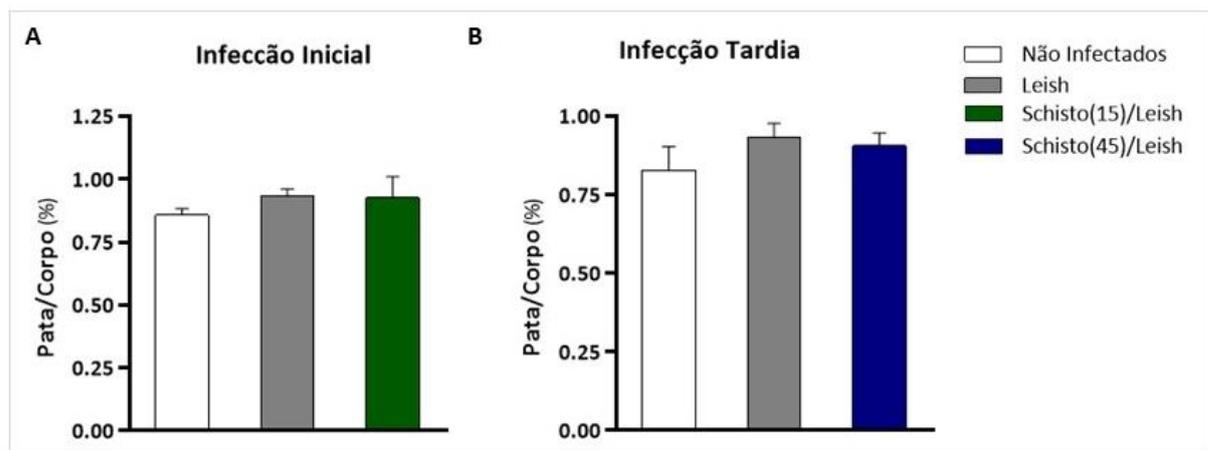


Figura 5| **Diferenças do peso da pata infectada e controle em relação ao peso corpóreo de camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM da porcentagem do peso da pata em relação ao peso corpóreo de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish).

3.2 Avaliação da Progressão das Doenças

3.2.1 Esquistossomose

3.2.1.1 Número de Vermes e Contagem de Ovos nas Fezes

O número de ovos nas fezes foi quantificado semanalmente após 45 dias de infecção por *S. mansoni* nos Grupo 1 – Infecção Inicial e Grupo 2 – Infecção Tardia. Ao término das infecções, os vermes adultos foram recuperados após perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas. O número de ovos nas fezes e o número total de vermes, número de fêmeas e de machos são apresentados na Figura 6.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças entre o número de machos entre o grupo de animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* e a infecção controle por *S. mansoni*. Porém, o número total de vermes ($p = 0,0125$) e o número de fêmeas ($p = 0,0024$) é superior no grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni*. A quantidade de ovos eliminados por grama de fezes após 45, 60 e 75 dias de infecção não apresentou diferenças entre o grupo de animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparado à infecção controle por *S. mansoni* para os mesmos tempos de infecção (Figura 6 A e C).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, o número total de vermes ($p = 0,0051$), número de fêmeas ($p = 0,0033$) e número de machos ($p = 0,0174$) dos animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* é superior quando comparado à infecção controle por *S. mansoni*. A quantidade de ovos eliminados por grama de fezes após 45 de infecção não apresentou diferenças entre o grupo de animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparado à infecção controle por *S. mansoni*. Porém, após 60 ($p = 0,0235$) e 75 ($p = 0,0162$) dias de infecção, a quantidade de ovos eliminados por grama de fezes é superior no grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni*. (Figura 6 B e C).

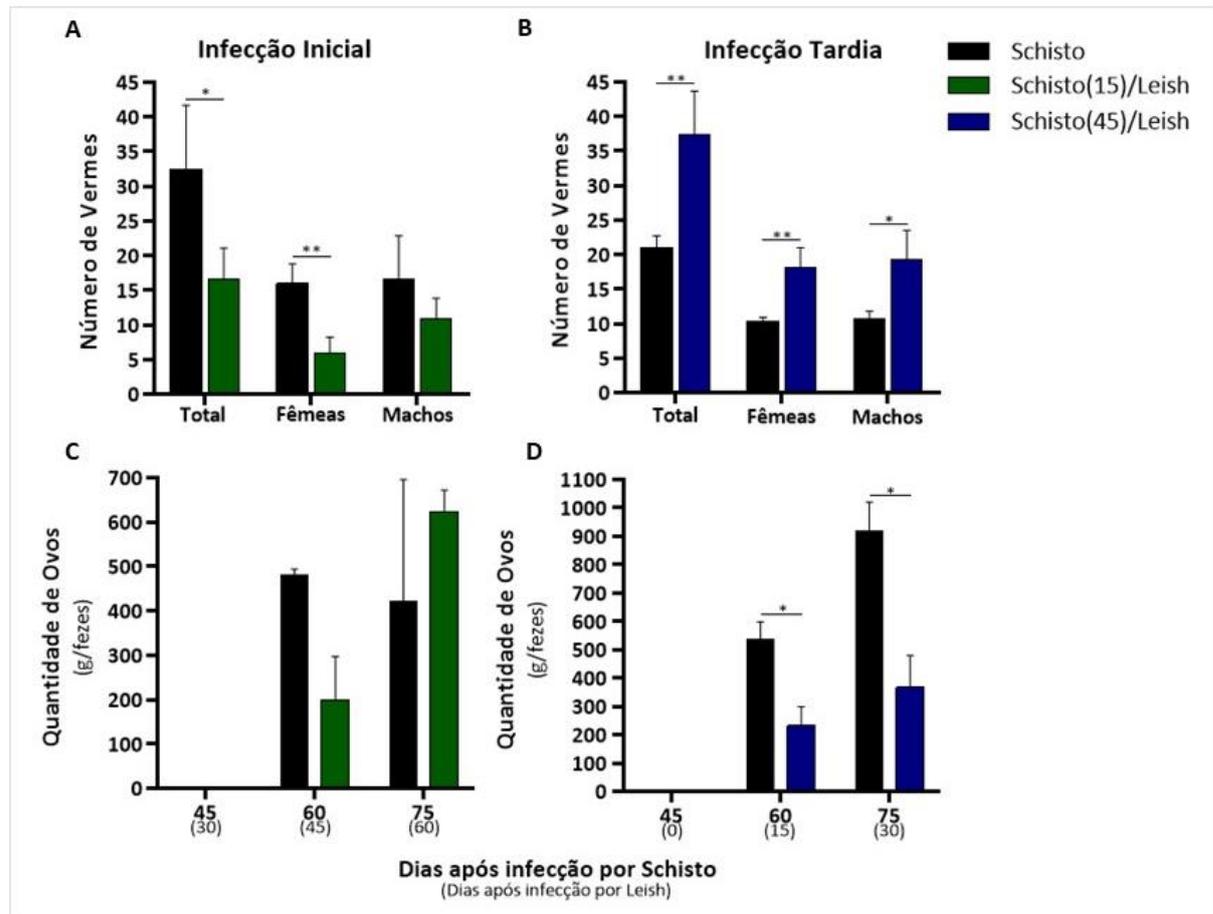


Figura 6| **Infecção por *S. mansoni* em camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM do número total de vermes, número de fêmeas e número de machos recuperados após perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas de camundongos infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfetados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfetados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish). C e D| Média \pm SEM da quantidade de ovos por grama de fezes em de camundongos infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfetados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfetados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

3.2.2 Leishmaniose

3.2.2.1 Desenvolvimento das Lesões Dérmicas

A Figura 7 apresenta a progressão do tamanho da lesão em camundongos coinfetados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, foi observado que os animais coinfetados apresentaram menor inchaço quando comparados ao grupo controle de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*. Porém, não há diferença estatisticamente significativa em nenhuma semana até a eutanásia dos animais (Figura 7A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não houve diferenças entre o tamanho da lesão entre os grupos de animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 7B).

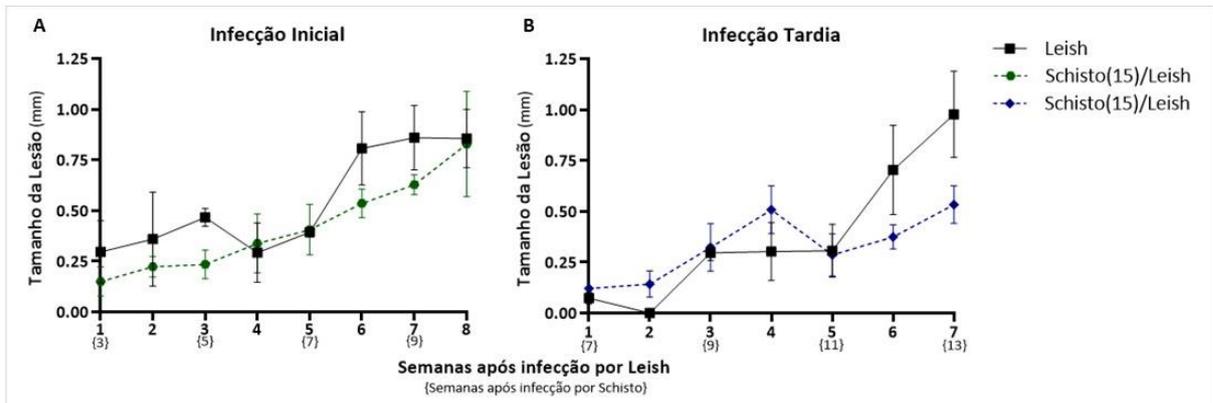


Figura 7 | **Infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c. A e B | Média ± SEM do tamanho das lesões (mm) ao longo da infecção em camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish).**

Como a infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongo BALB/c normalmente evolui do inchaço no local da infecção para uma lesão ulcerada, caracterizada como uma lesão cutânea onde há a ruptura do epitélio, de modo a haver exposição de tecidos mais profundos e com consequente perda de tecido, a medida da espessura da lesão pode ser enganosa nos períodos finais da infecção. Assim, outro critério utilizado para avaliar o desenvolvimento das lesões dérmicas foi o surgimento e o aumento das úlceras.

Tanto no Grupo 1 – Infecção Inicial quanto no Grupo 2 – Infecção Tardia não foi observado o desenvolvimento de lesões ulceradas durante o período de infecção. Os aspectos macroscópicos das lesões são apresentados na Figura 8.

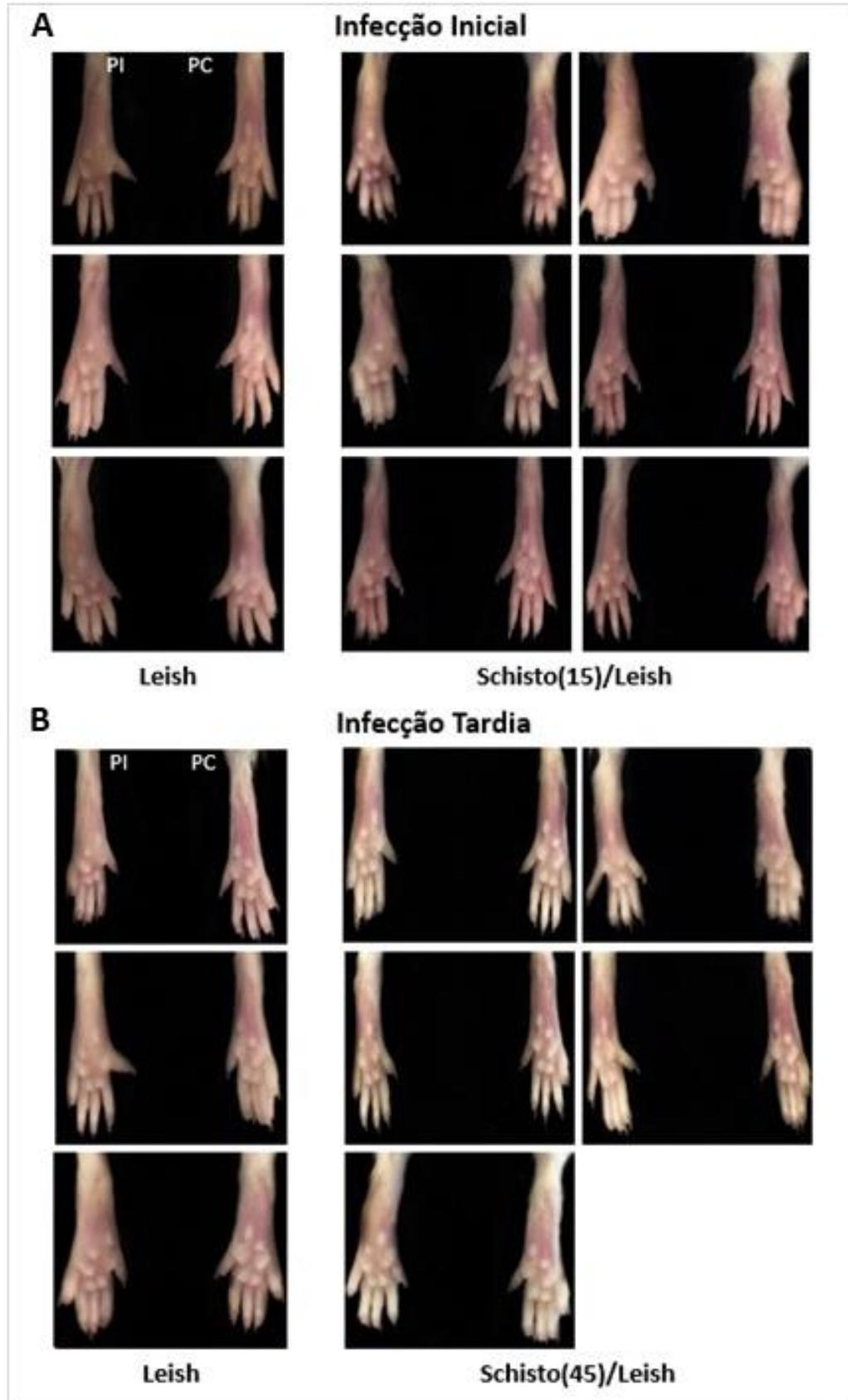


Figura 8| Aspecto macroscópico da lesão em camundongos BALB/c. A e B| Avaliação das lesões em camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); coinfectedados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectedados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish). PI: pata infectada; PC: pata controle.

3.2.2.2 Carga Parasitária

A carga parasitária foi estimada baseando-se na contagem de amastigotas no dia 0, ou seja, no momento da extração da lesão e na contagem ou positividade de promastigotas viáveis após 7 dias da cultura inicial da lesão e de amostras de fígado, baço e linfonodos poplíteos e é apresentada na Figura 9 e Tabelas 1 A e B.

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não foram encontradas diferenças nas cargas parasitárias isoladas das amostras de lesão no dia 0 entre o grupo de animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*. Porém, o número de parasitos viáveis após 7 dias de cultura foi superior ($p = 0,0049$) no grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 9 A e B). Não foram encontrados promastigotas nas culturas de amostras de fígado e de linfonodos poplíteos dos animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e dos animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis*. O mesmo resultado foi observado para as culturas de amostras de baço de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, porém, um dos seis animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* apresentou parasitos na cultura de amostras de baço (Tabela 1A).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não foram encontradas diferenças nas cargas parasitárias isoladas das amostras de lesão no dia 0 e no dia 7 entre o grupo de animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 9 A e B). Não foram encontrados promastigotas nas amostras de cultura de fígado, baço e linfonodo poplíteo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* (Tabela 1B).

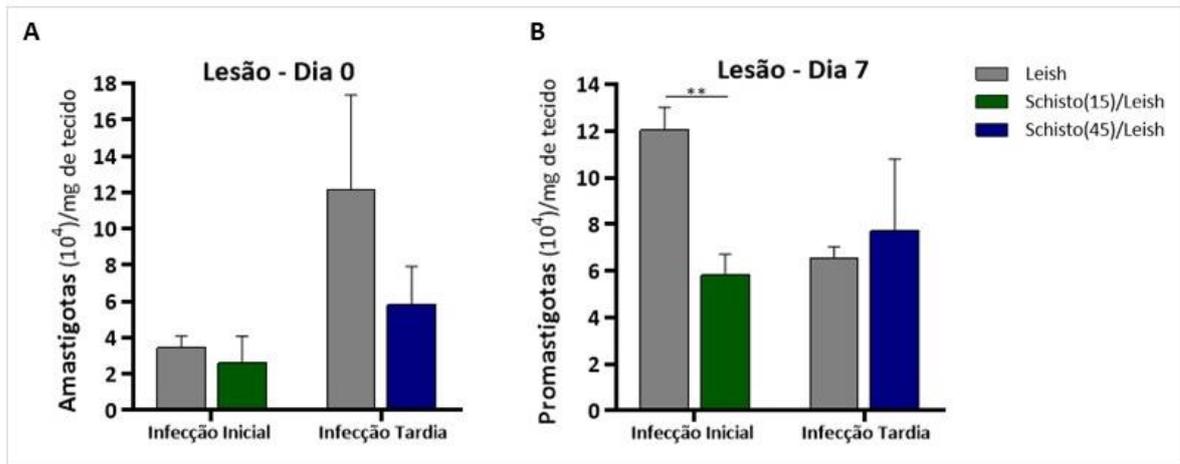


Figura 9| **Quantificação de *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c.** A e B| Média \pm SEM da carga parasitária por mg de tecido das amostras de lesão no momento da extração da lesão (dia 0) e após 7 dias de cultura (dia 7) das amostras de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish).

Tabela 2| **Infeção por *L. (L.) amazonensis* em órgãos viscerais de camundongos BALB/c.** A e B| Detecção de parasitos no fígado, baço e linfonodos de cada camundongo infectado por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish) após 7 dias de cultura. -: negativo; +: positivo.

A

Grupo	Animal	Fígado	Baço	Linfonodo
Leish	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Schisto(15)/Leish	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	-	+	-
	6	-	-	-

B

Grupo	Animal	Fígado	Baço	Linfonodo
Leish	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Schisto(45)/Leish	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	-	-	-
	6	-	-	-

3.3 Avaliação do Perfil de Produção de Citocinas

Os níveis IL-1 β , IFN- γ , TNF, IL-4, IL-6 e IL-10 foram dosados em porções do fígado e do baço de camundongos não infectados, infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* e são apresentados como dosagem da citocina em ng/mg de proteínas totais. Cada ponto representa a dosagem de um respectivo animal.

3.3.1 Citocinas Pró-Inflamatórias

3.3.1.1 IFN- γ

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IFN- γ no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IFN- γ no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IFN- γ no fígado e no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 10 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IFN- γ no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IFN- γ no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IFN- γ no fígado e no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 10 A e B).

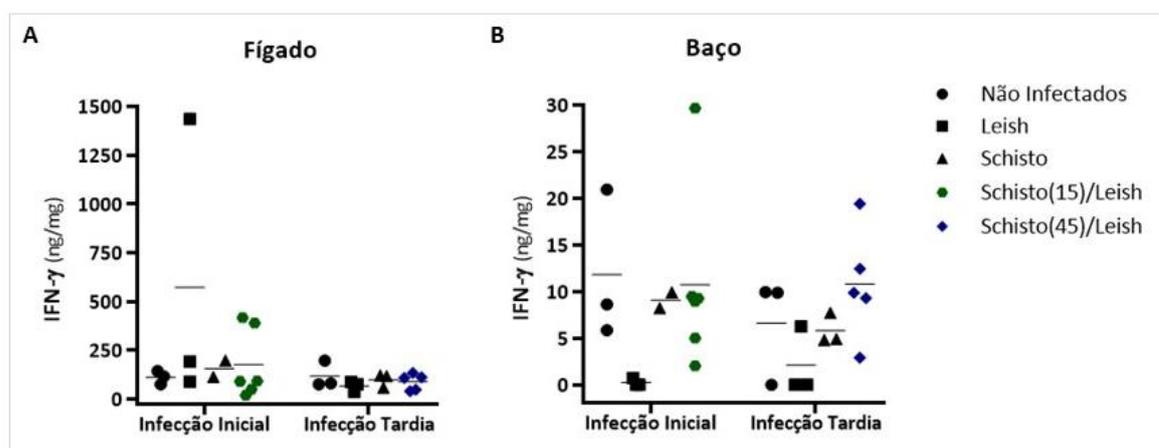


Figura 10/ Perfil da produção de IFN- γ em tecidos. A) Níveis de IFN- γ no fígado de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados

por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish). **B** Níveis de IFN- γ no baço de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish).

3.3.1.2 TNF

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de TNF no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de TNF no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de TNF no fígado e no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções. Não houve detecção de TNF no baço de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 11 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de TNF no fígado dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e infectados apenas por *S. mansoni* quando comparados aos níveis de TNF no fígado do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de TNF no fígado de animais coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* foram superiores ($p = 0,0136$) quando comparados aos níveis de TNF no fígado do grupo de animais não infectados. Os níveis de TNF no fígado do grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* são inferiores ($p = 0,0144$) quando comparados aos níveis de TNF no fígado do grupo de animais coinfectados (Figura 11A).

Não há diferenças nos níveis de TNF no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de TNF no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de TNF no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções. Não houve detecção de TNF no baço de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* (Figura 11B).

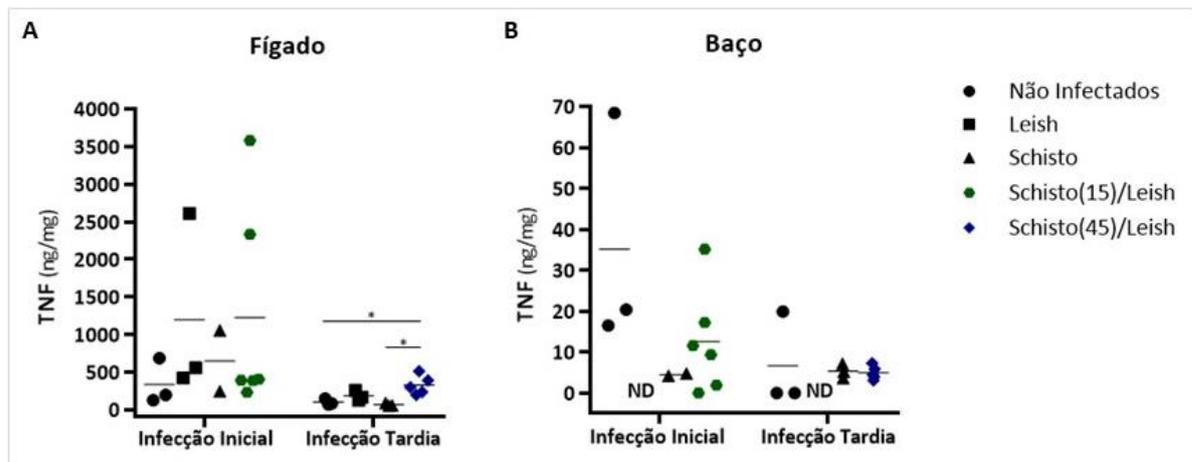


Figura 11 | Perfil da produção de TNF em tecidos. **A** | Níveis de TNF no fígado de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). **B** | Níveis de TNF no baço de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). * $p < 0,05$. (Student's t-test) ND: não detectado.

3.3.1.3 IL-1 β

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IL-1 β no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-1 β no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-1 β no fígado e no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções. (Figura 12 A e B).

No grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IL-1 β no fígado dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-1 β no fígado do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-1 β no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções.

Os níveis de IL-1 β no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0061$), infectados apenas por *S. mansoni* ($p = 0,0140$) e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,0001$) são inferiores quando comparados aos níveis de IL-1 β no baço do grupo de animais não infectados. Não há diferenças nos níveis de IL-1 β no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções.

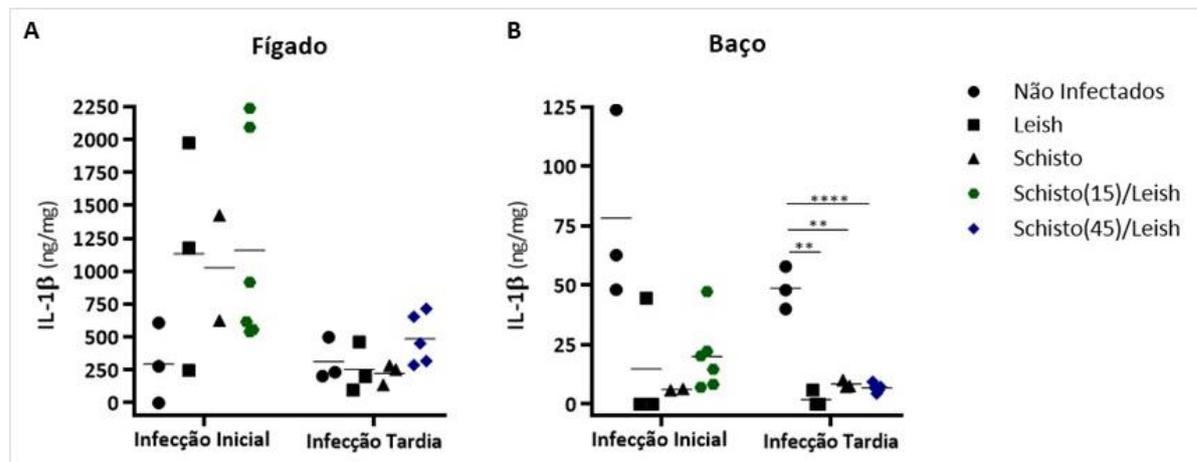


Figura 12| **Perfil da produção de IL-1 β em tecidos.** A| Níveis de IL-1 β no fígado de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish). B| Níveis de IL-1 β no baço de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish). **p<0,01; ***p<0,0001. (Student's t-test)

3.3.2 Citocinas Anti-Inflamatórias

3.3.2.1 IL-4

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IL-4 no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-4 no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-4 no fígado e no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 13 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IL-4 no fígado dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-4 no fígado do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-4 no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 13A).

Não há diferenças nos níveis de IL-4 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-4 no baço do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-4 no baço dos grupos de animais infectados apenas por *S. mansoni* (p = 0,0143) e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* (p = 0,0015) são

inferiores quando comparados aos níveis de IL-4 no baço do grupo de animais não infectados. Não há diferenças nos níveis de IL-4 no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 13B).

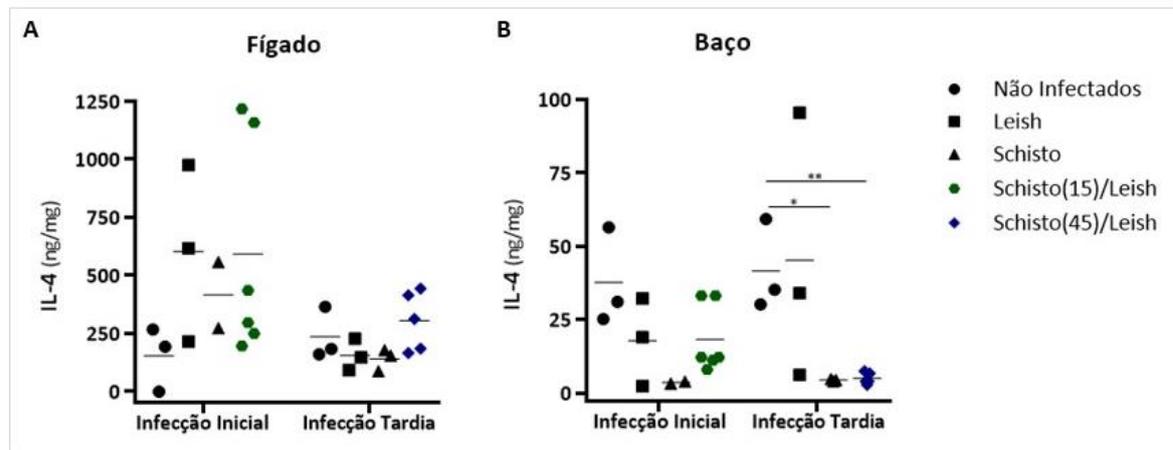


Figura 13| **Perfil da produção de IL-4 em tecidos.** **A**| Níveis de IL-4 no fígado de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish). **B**| Níveis de IL-4 no baço de camundongos não infectados (n = 3); infectados por *L. (L.) amazonensis* (n = 3) (Leish); infectados por *S. mansoni* (n = 3) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 6) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* (n = 5) (Schisto(45)/Leish). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

3.3.2.2 IL-6

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IL-6 no fígado dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 14A).

Não há diferenças nos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-6 no baço dos grupos de animais infectados apenas por *S. mansoni* ($p = 0,0373$) e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0008$) são inferiores quando comparados aos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais não infectados. Não há diferenças nos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 14B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IL-6 no fígado dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado foi observado para os níveis de IL-6 no fígado do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 14A).

Não há diferenças nos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-6 no baço dos grupos de animais infectados apenas por *S. mansoni* ($p = 0,009$) e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,0001$) são inferiores quando comparados aos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais não infectados. Não há diferenças nos níveis de IL-6 no baço do grupo de animais coinfectados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 14B).

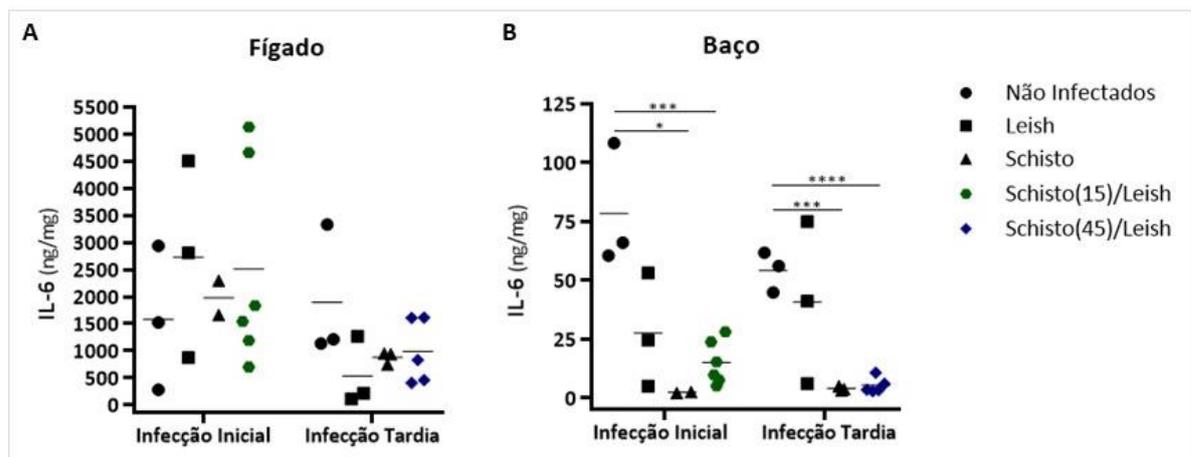


Figura 14| **Perfil da produção de IL-6 em tecidos.** A| Níveis de IL-6 no fígado de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). B| Níveis de IL-6 no baço de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfectados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (Student's t-test)

3.3.2.3 IL-10

No Grupo 1 – Infecção Inicial, não há diferenças nos níveis de IL-10 no fígado e no baço dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*, infectados apenas por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-10 no fígado e no baço do grupo de animais não infectados. O mesmo resultado

foi observado para os níveis de IL-10 no fígado e no baço do grupo de animais coinfectedados quando comparado a cada uma das monoinfecções (Figura 15 A e B).

No Grupo 2 – Infecção Tardia, não há diferenças nos níveis de IL-10 no fígado dos grupos de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* e coinfectedados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* são inferiores quando comparados aos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais não infectados ($p = 0,0414$) e aos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais coinfectedados ($p = 0,0253$) (Figura 15A).

Não há diferenças nos níveis de IL-10 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* quando comparados aos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais não infectados, porém, os níveis de IL-10 no baço dos grupos de animais infectados apenas por *S. mansoni* ($p = 0,0206$) e coinfectedados por *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* ($p = 0,0023$) são inferiores quando comparados aos níveis de IL-10 no fígado do grupo de animais não infectados. Os níveis de IL-10 no baço do grupo de animais infectados apenas por *L. (L.) amazonensis* são superiores ($p = 0,0062$) quando comparados aos níveis de IL-10 no baço do grupo de animais coinfectedados (Figura 15B).

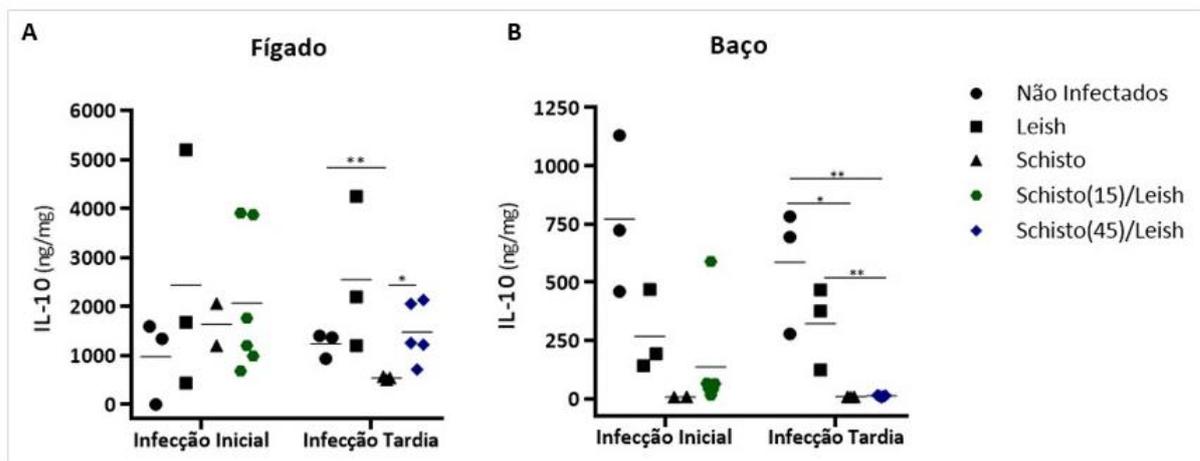


Figura 15| **Perfil da produção de IL-10 em tecidos.** A) Níveis de IL-10 no fígado de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectedados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfectedados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). B) Níveis de IL-10 no baço de camundongos não infectados ($n = 3$); infectados por *L. (L.) amazonensis* ($n = 3$) (Leish); infectados por *S. mansoni* ($n = 3$) (Schisto); coinfectedados por *S. mansoni* e após 15 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 6$) (Schisto(15)/Leish) e coinfectedados por *S. mansoni* e após 45 dias por *L. (L.) amazonensis* ($n = 5$) (Schisto(45)/Leish). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t-test)

4. Discussão

Para determinar o efeito de uma infecção pré-existente por *S. mansoni* em uma infecção subsequente por *L. (L.) amazonensis*, os camundongos foram infectados por 70 cercárias utilizando-se a técnica de imersão caudal. Essa dose de cercárias foi escolhida a fim de produzir uma infecção que não fosse letal na fase aguda, mas que resultasse em uma infecção bissexuada, com a maturação de vermes machos e fêmeas e consequente produção de ovos.

Os camundongos foram coinfectados por *L. (L.) amazonensis* após 15 dias de infecção por *S. mansoni*, período o qual é caracterizado como fase aguda da esquistossomose com uma resposta imune do tipo Th₁ e, após 45 de infecção por *S. mansoni*, período o qual é caracterizado como fase crônica da esquistossomose, ponto em que há uma forte resposta imune do tipo Th₂ estabelecida ⁶².

Ao final das infecções, os vermes adultos foram recuperados por meio da perfusão do fígado e das veias mesentéricas. O número total de vermes recuperados de animais coinfectados foi comparado ao número total de vermes recuperados de animais infectados apenas por *S. mansoni*, ambos os grupos com os mesmos tempos de infecção. No Grupo 1 (Infecção Inicial), o número total de vermes foi superior no grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* quando comparado ao número total de vermes de animais coinfectados, porém, o número de ovos eliminados nas fezes não apresentou diferenças entre os grupos. No Grupo 2 (Infecção Tardia), o resultado foi oposto. O número de vermes recuperados no grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* foi inferior ao número de vermes recuperados de animais coinfectados, no entanto, o número de ovos liberados nas fezes foi superior no grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni*. Tal resultado pode sugerir que a presença da infecção por *L. (L.) amazonensis* induz uma maior retenção de ovos nos tecidos, sendo necessária uma análise histológica do fígado e do baço para melhor avaliação da patologia, estrutura e composição dos granulomas.

Estudos prévios de coinfecção por *S. mansoni* e espécies de *Leishmania* que avaliaram os efeitos da infecção por *L. (L.) major* ⁴⁴ e *L. (L.) donovani* ⁴⁵ em uma infecção prévia por *S. mansoni*, no entanto, não observaram diferenças no curso da esquistossomose como observados nesse estudo. É sugestivo pensar que a espécie de *Leishmania* envolvida na coinfecção pode vir a contribuir para as diferenças observadas.

Não foram observadas diferenças no desenvolvimento das lesões e nas cargas parasitárias nos grupos de animais coinfectados e infectados apenas por *L. (L.) amazonensis*. As lesões tiveram um desenvolvimento homogêneo e regular ao longo da infecção, sem que

houvesse o desenvolvimento de lesões ulceradas, concluindo que, com base nesses parâmetros, a infecção por *S. mansoni* não alterou significativamente o curso da infecção por *L. (L.) amazonensis* tanto no intervalo de 15 dias quanto no intervalo de 45 dias entre as infecções.

Sabe-se que a esquistossomose é uma doença que potencialmente causa morbidades sistêmicas incluindo a anemia, perda de peso e o desenvolvimento de extensa fibrose com consequente hepatoesplenomegalia ¹²³. Dessa forma, monitorar e avaliar os pesos dos animais ao longo da infecção e os pesos dos órgãos acometidos pela esquistossomose e leishmaniose, tornaram-se parâmetros de caracterização importantes para avaliar a progressão das doenças.

Há uma tendência de crescimento natural e homogêneo dos animais ao longo das semanas, porém, em ambos os intervalos de tempo entre as coinfeições, nota-se um padrão de queda da porcentagem de crescimento do peso corpóreo nos grupos de animais infectados por *S. mansoni* após 5 semanas de infecção por *S. mansoni*. No Grupo 1 (Infecção Inicial) a porcentagem de crescimento do grupo de animais coinfectados se manteve progressiva, mesmo após a infecção por *S. mansoni* e, no Grupo 2 (Infecção Tardia), há uma queda na porcentagem de crescimento no grupo de animais coinfectados após a 5ª semana de infecção por *S. mansoni* porém o crescimento é reestabelecido nas semanas seguinte. Vale ressaltar que a esquistossomose é uma doença potencial fatal e que sintomas como ascite e hematêmese decorrentes de complicações da hipertensão portal podem levar rapidamente à morte ¹²⁵. Apesar dos esforços e intenso monitoramento dos animais, um animal infectado por *S. mansoni* e um animal coinfectado não resistiram à infecção até o tempo final proposto.

Considerando que o aumento dos órgãos influencia o peso total dos camundongos, e que o aumento dos pesos do fígado e do baço são extremamente relevantes na patogenia da esquistossomose, da mesma forma que o aumento da pata infectada pode evoluir até um inchaço significativo, avaliamos o peso total dos camundongos subtraindo o peso desses dois órgãos e da pata esquerda, a fim de visualizar a real perda de peso e caquexia, evidentes como sinal clínico apresentado pelos animais ao longo da infecção. No Grupo 1 (Infecção Inicial), a única diferença encontrada foi no peso dos animais infectados apenas por *S. mansoni*, que foi inferior ao grupo de animais não infectados e coinfectados, evidenciando que a presença da *L. (L.) amazonensis*, nesse caso, pareceu diminuir a severidade dos aspectos clínicos esperados durante a esquistossomose. No Grupo 2 (Infecção Tardia), entretanto, o grupo de animais coinfectados apresentou a maior redução do peso após subtração de órgãos acometidos evidenciando que a presença dos dois parasitos tem um impacto negativo significativo no aspecto físico dos animais. Seguindo esse mesmo padrão, os pesos do fígado e baço foram superiores no grupo de animais infectados apenas por *S. mansoni* comparados ao grupo de animais não infectados e

coinfectedados no Grupo 1 (Infecção Inicial), sugerindo que a *L. (L.) amazonensis* modulou o curso da infecção e diminuiu a severidade da infecção por *S. mansoni*. No Grupo 2 (Infecção Tardia), os pesos do fígado e baço do grupo de animais coinfectados foi superior aos pesos do fígado e baço de animais não infectados porém não apresentaram diferenças comparado aos pesos do fígado e baço de animais coinfectados, sugerindo que, para esse intervalo de tempo entre as infecções, a infecção por *L. (L.) amazonensis* não modulou a coinfeção.

O perfil de produção de citocinas no fígado e no baço foi avaliado ao final das infecções e, no Grupo 1 (Infecção Inicial), não parece haver modulação da resposta imune por parte de um dos parasitos uma vez que não há diferenças nas dosagens de IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-4 IL-6 e IL-10 no fígado e no baço entre o grupos de animais.

Já no Grupo 2 (Infecção Tardia), os níveis de IFN- γ , IL-1 β , IL-4 e IL-6 no fígado não apresentam diferenças entre os grupos, mas os níveis de TNF e IL-10 parecem ser modulados pela infecção por *L. (L.) amazonensis*. Os níveis de IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-4 IL-6 no baço não apresentam diferenças entre os grupos e o nível de IL-10 é modulado pela infecção por *S. mansoni*.

Os resultados avaliados indicam que o intervalo de tempo entre as coinfeções é determinante para os efeitos de uma infecção na outra. Nos estudos de coinfeção apresentados por Abruzzi e Fried¹¹, a infecção prévia por *S. mansoni* muitas vezes tem efeito sobre a infecção subsequente por protozoários, onde aumentam ou diminuem a severidade da infecção subsequente. Neste estudo, os maiores efeitos da coinfeção foram encontrados na infecção prévia e não na subsequente e com resultados antagônicos entre os dois intervalos de tempo.

No Grupo 1 (Infecção Inicial), a infecção subsequente por *L. (L.) amazonensis* pareceu diminuir a severidade da esquistossomose, com redução no número de vermes, manutenção do peso corpóreo e sem o aumento dos pesos do fígado e baço, aspectos clínicos esperados da esquistossomose¹²³. Já no Grupo 2 (Infecção Inicial), a infecção subsequente por *L. (L.) amazonensis* pareceu aumentar a severidade da esquistossomose, apresentando um maior número de vermes, queda do peso corpóreo e caquexia e aumento dos pesos do fígado e do baço.

A parasitologia contempla não apenas as interações entre espécies, mas também destas com o ambiente (que pode ser o próprio hospedeiro), logo, seu viés ecológico é indissociável³. Porém, o fenômeno parasitismo ainda recebe um enfoque tradicional, antropocêntrico e militarista no qual um ou mais organismos necessariamente causam danos ao hospedeiro. Lenzi e Vannier-Santos⁴, no entanto, nos trazem uma visão alternativa a essas ideias convencionais, oferecendo uma abordagem ecológica da coabitação parasito-hospedeiro

a qual sugere que o termo *coabitante* é mais preciso que o termo *parasito* porque é cada vez mais claro que todo ser vivo compõe um sistema adaptativo que flui em uma dinâmica contínua de trocas onde é difícil mensurar os ganhos e perdas dos respectivos parceiros.

Tal abordagem pode ser estendida, dentro do contexto deste trabalho, para descrever a relação entre parasitos coexistindo e vivendo juntos. Relações estas que podem ir desde o aumento até a supressão de um ou de ambos os agentes infecciosos e do consequente aumento ou melhoria da patologia, proposto neste trabalho como *coinfecção*; ou também não sofrerem alteração alguma, proposto neste trabalho como *coabitação*.

Isso significa que a natureza de qualquer infecção parasitária específica em um hospedeiro infectado concomitantemente a outro agente infeccioso pode ser muito diferente de uma infecção causada pelo mesmo parasito em um hospedeiro não infectado por outro patógeno, e que isso pode gerar diversas implicações em aspectos epidemiológicos, clínicos das doenças humanas e veterinárias, no desenvolvimento de vacinas¹²⁴ e no uso da quimioterapia.

O objetivo deste estudo foi então fornecer algumas indicações sobre a variedade de interações que ocorrem quando um hospedeiro é infectado por mais de um agente infeccioso, no caso, dois agentes causadores de doenças endêmicas no território brasileiro que já tem sido reportadas ocorrendo simultaneamente^{48,49} e fortalecer a ideia proposta por Cox⁶ de que as infecções concomitantes, apesar de ainda receberem pouca atenção, talvez sejam a regra e não a exceção e por isso a importância de compreender essas interações e as consequências que elas geram em seus hospedeiros.

CONCLUSÕES

Conclusões

Os achados descritos neste trabalho permitem concluir que quando a infecção prévia por *L. (L.) amazonensis* é seguida da infecção por *S. mansoni*, os parâmetros de progressão da leishmaniose sofrem alterações em comparação aos resultados mostrados para o grupo controle da infecção por *L. (L.) amazonensis*, enquanto a infecção subsequente por *S. mansoni* não apresenta diferenças em relação ao grupo controle da infecção por *S. mansoni* em ambos os intervalos de tempo entre as infecções. Dessa forma, como proposto neste trabalho, a interação entre *L. (L.) amazonensis* e *S. mansoni* é caracterizada como *coinfecção* por apresentar alterações no curso de uma das infecções.

Quando a ordem das infecções é alterada e a infecção por *S. mansoni* é seguida da infecção por *L. (L.) amazonensis* os resultados são dependentes do intervalo de tempo entre as infecções, sendo que: no intervalo de 15 dias entre as infecções há uma notável modulação induzida por *L. (L.) amazonensis* e, no intervalo de 45 dias entre as infecções, a modulação é induzida por *S. mansoni*. A interação entre *S. mansoni* e *L. (L.) amazonensis* é caracterizada como *coinfecção* por apresentar alterações no curso de uma das infecções.

REFERÊNCIAS

Referências

1. Brown B. L., Creed R. P., Skelton J., Rollins M. A. & Farrell K. J. The fine line between mutualism and parasitism: Complex effects in a cleaning symbiosis demonstrated by multiple field experiments. *Oecologia* **170**, 199–207 (2012).
2. Windsor D. A. Controversies in parasitology, Most of the species on Earth are parasites. *Int. J. Parasitol.* **28**, 1939–1941 (2002).
3. Read C. P. Parasitism and Symbiology. *Ronald Press Co* (1970).
4. Lenzi H. L., Vannier-Santos M. A. Parasite-host interface: cohabitology—a different look at the parasitism phenomenon. in *Dinamica das Doenças Infecciosas e Parasitarias* (ed. Coura, J. R.) 19–44 (Guanabara-Koogan, 2005).
5. Petney T. N. & Andrews R. H. Multiparasite communities in animals and humans: Frequency, structure and pathogenic significance. *Int. J. Parasitol.* **28**, 377–393 (1998).
6. Cox F. E. G. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* **122**, S23–S38 (2007).
7. Brothwell D. R. & Sandison A. T. *Diseases in Antiquity: A survey of the Diseases, Injuries and Surgery of Early Populations*. (1967).
8. Cockburn T., Cockburn E. & Reyman T. *No Mummies, Disease and Ancient Cultures*. (Cambridge University Press, 1998).
9. Ezenwa V. O., Etienne R. S., Luikart G., Beja-Pereira A. & Jolles A. E. Hidden Consequences of Living in a Wormy World: Nematode-Induced Immune Suppression Facilitates Tuberculosis Invasion in African Buffalo. *Am. Nat.* **176**, 613–624 (2010).
10. Telfer S. *et al.* Europe PMC Funders Group Species Interactions in a Parasite Community Drive Infection Risk in a Wildlife Population. **330**, 243–246 (2011).
11. Abruzzi A. & Fried B. Coinfection of *Schistosoma* (Trematoda) with bacteria, protozoa and helminths. *Adv. Parasitol.* **77**, 1–85 (2011).
12. Buck A. A., Anderson R. I. & MacRae A. A. Epidemiology of poly-parasitism. IV. Combined effects on the state of health. *Tropenmed. Parasitol.* **29**, 253–268 (1978).
13. Klein J. & Hořejší V. *Immunology*. (Blackwell Science, 1997).
14. Maizels R. M. & Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: Cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 733–744 (2003).
15. Hartgers F. C. & Yazdanbakhsh M. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. *Parasite Immunol.* **28**, 497–506 (2006).
16. Specht S. & Hoerauf A. Does helminth elimination promote or prevent malaria? *Lancet (London, England)* **369**, 446–447 (2007).
17. Pearce E. J. *et al.* Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Rev.* **201**, 117–126 (2004).
18. Bafica A. M. B. *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**, 856–863 (2011).
19. Yoshida A. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int. Immunol.* **12**, 1117–1125 (2000).
20. Legesse M., Erko B. & Balcha F. Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in *Schistosoma*

- mansoni* and *Plasmodium berghei* co-infected mice. *Acta Trop.* **91**, 161–166 (2004).
21. Laranjeiras R. F., Brant L. C. C., Lima A. C. L., Coelho P. M. Z. & Braga E. M. Reduced protective effect of *Plasmodium berghei* immunization by concurrent *Schistosoma mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **103**, 674–677 (2008).
 22. Faye B., Ndiaye J. L., Tine R. C., Lo A. C. & Gaye O. Interaction between malaria and intestinal helminthiasis in Senegal: influence of the carriage of intestinal parasites on the intensity of the malaria infection. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **101**, 391–394 (2008).
 23. Wilson S. *et al.* Hepatosplenomegaly associated with chronic malaria exposure: evidence for a pro-inflammatory mechanism exacerbated by schistosomiasis. *Parasite Immunol.* **31**, 64–71 (2009).
 24. Mahmoud A. A., Warren K. S. & Strickland G. T. Acquired resistance to infection with *Schistosoma mansoni* induced by *Toxoplasma gondii*. *Nature* **263**, 56–57 (1976).
 25. Mahmoud A. A., Strickland G. T. & Warren K. S. Toxoplasmosis and the host-parasite relationship in murine schistosomiasis mansoni. *J. Infect. Dis.* **135**, 408–413 (1977).
 26. Kloetzel K., Chieffi P. P., Faleiros J. J. & Filho T. J. Mortality and other parameters of concomitant infections in albino mice: the *Schistosoma-Toxoplasma* model. *Trop. Geogr. Med.* **29**, 407–410 (1977).
 27. Hammouda N. A., el-Nassery S. F., Bakr M. E., el-Gebaly W. M. & Hassan A. M. Effect of toxoplasmosis on experimental schistosomiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **24**, 395–406 (1994).
 28. Marshall A. J. *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* synergize to promote hepatocyte dysfunction associated with high levels of plasma TNF-alpha and early death in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* **163**, 2089–2097 (1999).
 29. Knight R. & Warren K. S. The interaction between *Entamoeba histolytica* and *Schistosoma mansoni* infections in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **67**, 644–651 (1973).
 30. Ali M. M., Abo-Shady A. F., el-Malky S. A., Hegazi M. M. & el-Kholy E. I. Parasitic infection among the outpatients of Dakahlia Governorate with a correlation between amoebiasis and intestinal schistosomiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **14**, 463–469 (1984).
 31. Abo-Shady A. F. & Yossef M. E. The effect of colonic bilharzial lesions on the prevalence and invasiveness of intestinal amoebiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **16**, 51–56 (1986).
 32. Dolabella S. S. *et al.* Morbidity due to *Schistosoma mansoni-Entamoeba histolytica* coinfection in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **40**, 170–174 (2007).
 33. El Raziky E. H., Ahmed L. & Maddison S. E. Prevalence of *Entamoeba histolytica* in patients with schistosomal colonic polyposis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**, 312–315 (1983).
 34. Mansour N. S., Youssef F. G., Mikhail E. M. & Mohareb E. W. Amebiasis in schistosomiasis endemic and non-endemic areas in Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **27**, 617–628 (1997).
 35. Kloetzel K., Faleiros J. J., Mendes S. R., Stanley C. T. & Sanches Arias H. Concomitant infection of albino mice by *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni*. Parasitological parameters. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **67**, 652–658 (1973).
 36. Genaro O., Brener Z. & Coelho P. M. *Schistosoma mansoni*: immunodepression of hepatic schistosome granuloma formation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **19**, 35–37 (1986).
 37. Fagbemi B. O. Interference with homologous immunity and faecal egg excretion in *Schistosoma* infections

- in mice concurrently infected with *Trypanosoma brucei* and *Schistosoma mansoni*. *Folia Parasitol. (Praha)*. **34**, 317–322 (1987).
38. Coelho P. M., Mayrink W., Dias M. & Pereira L. H. Susceptibility to *Leishmania mexicana* of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **74**, 141 (1980).
 39. Mangoud A. M. *et al.* Renal changes in golden hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum* on top of *Schistosoma mansoni* infection. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **28**, 183–189 (1998).
 40. Mangoud A. M., Morsy T. A., Ramadan M. E., Makled K. M. & Mostafa S. M. The pathology of the heart and lung in Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum* on top of pre-existing *Schistosoma mansoni* infection. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **28**, 395–402 (1998).
 41. Mangoud A. M., Ramadan M. E., Morsy T. A., Amin A. M. & Mostafa S. M. The histopathological picture of the liver of hamsters experimentally infected with *Leishmania d. infantum* on top of *Schistosoma mansoni* infection. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **28**, 101–117 (1998).
 42. Mangoud A. M., Ramadan M. E., Morsy T. A. & Mostafa S. M. Immunological pattern in Syrian golden hamsters experimentally infected with *Schistosoma mansoni* and *Leishmania d. infantum*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **27**, 497–504 (1997).
 43. Yoshida A. *et al.* Immune responses against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol. Int.* **48**, 73–79 (1999).
 44. La Flamme A. C., Scott P. & Pearce E. J. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite Immunol.* **24**, 339–345 (2002).
 45. Hassan M. F. *et al.* The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. *Am. J. Pathol.* **169**, 943–53 (2006).
 46. Muigai R. K. *et al.* Schistosomiasis caused by *Schistosoma mansoni* in Baringo District, Kenya: case report. *East Afr. Med. J.* **66**, 700–702 (1989).
 47. O’Neal S. E. *et al.* Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **195**, 142–148 (2007).
 48. Cota G. F. *et al.* Dyarrheal Syndrome in a Patient Co-Infected with *Leishmania infantum* and *Schistosoma mansoni*. *Case Rep. Med.* **2012**, 240512 (2012).
 49. Gregorio A. W. *et al.* Cutaneous schistosomiasis and leishmaniasis coinfection: a case report.
 50. Steinmann P., Keiser J., Bos, R., Tanner M. & Utzinger J. Schisto and water resources development - review of people at-risk. 411–425 (2006).
 51. World Health Organization. Schistosomiasis. (2019). Available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. (Accessed: 19th May 2019)
 52. World Health Organization. Distribution of schistosomiasis, worldwide, 2012. (2012). Available at: https://www.who.int/schistosomiasis/Schistosomiasis_2012-01.png?ua=1. (Accessed: 19th May 2019)
 53. Crompton D. W. How much human helminthiasis is there in the world? *J. Parasitol.* **85**, 397–403 (1999).
 54. Sturrock R. F. The schistosomes and their intermediate hosts. in *Schistosomiasis* (Imperial College Press, 2001).
 55. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. **Único**, 704 (2017).
 56. Scholte R. G. C., Carvalho O. S., Malone J. B., Utzinger J. & Vounatsou P. Spatial distribution of

- Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. *Geospat. Health* **6**, S95–S101 (2012).
57. Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **26**, 383–397 (2012).
 58. Gautret P. *et al.* Infectious diseases among travellers and migrants in Europe, EuroTravNet 2010. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **17**, (2012).
 59. Reimert C. M., Tukahebwa E. M., Kabatereine N. B., Dunne D. W. & Vennervald B. J. Assessment of *Schistosoma mansoni* induced intestinal inflammation by means of eosinophil cationic protein, eosinophil protein X and myeloperoxidase before and after treatment with praziquantel. *Acta Trop.* **105**, 253–259 (2008).
 60. Thetiot-Laurent S. A.-L., Boissier J., Robert A. & Meunier B. Schistosomiasis chemotherapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 7936–7956 (2013).
 61. Hagen J., Scheerlinck J.-P. Y. & Gasser R. B. Knocking down schistosomes - promise for lentiviral transduction in parasites. *Trends Parasitol.* **31**, 324–332 (2015).
 62. Dunne D. W. & Cooke A. A worm's eye view of the immune system: Consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 420–426 (2005).
 63. Pearce E. J. & MacDonald A. S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 499–511 (2002).
 64. Fairfax K., Nascimento M., Huang S. C.-C., Everts B. & Pearce E. J. Th2 responses in schistosomiasis. *Semin. Immunopathol.* **34**, 863–871 (2012).
 65. Peterson W. P. & Von Lichtenberg F. Studies on granuloma formation. IV. In vivo antigenicity of schistosome egg antigen in lung tissue. *J. Immunol.* **95**, 959–965 (1965).
 66. Grzych J. M. *et al.* Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **146**, 1322–1327 (1991).
 67. Else K. J. & Finkelman F. D. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int. J. Parasitol.* **28**, 1145–1158 (1998).
 68. Pearce E. J. & Sher A. Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **8**, 219–232 (1987).
 69. Damian R. T. Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **145**, 101–115 (1989).
 70. Carvalho-Queiroz C. *et al.* Cross-reactivity of *Schistosoma mansoni* cytosolic superoxide dismutase, a protective vaccine candidate, with host superoxide dismutase and identification of parasite-specific B epitopes. *Infect. Immun.* **72**, 2635–2647 (2004).
 71. Araujo M. I. *et al.* Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1399–1403 (1996).
 72. Malaquias L. C. *et al.* Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scand. J. Immunol.* **46**, 393–398 (1997).
 73. Butterworth A. E. Immunological aspects of human schistosomiasis. *Br. Med. Bull.* **54**, 357–368 (1998).
 74. Colley D. G., Bustinduy A. L., Secor W. E. & King C. H. Human schistosomiasis. *Lancet* **383**, 2253–2264 (2014).

75. Doenhoff M. J., Cioli D. & Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**, 659–667 (2008).
76. Greenberg R. M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. *Parasitology* **140**, 1534–1546 (2013).
77. World Health Organization. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Relev. Epidemiol. Hebd.* **77**, 365–370 (2002).
78. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 305–318 (2004).
79. Kedzierski L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J. Glob. Infect. Dis.* **2**, 177–185 (2010).
80. World Health Organization. Leishmaniasis. (2018). Available at: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. (Accessed: 19th May 2019)
81. Maia-Elkhoury A. N. S., Alves W. A., Sousa-Gomes M. L. de, Sena J. M. de & Luna E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saude Publica* **24**, 2941–2947 (2008).
82. Lima I. D. *et al.* *Leishmania infantum chagasi* in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 99–107 (2012).
83. World Health Organization. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2016. (2018). Available at: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf?ua=1. (Accessed: 19th May 2019)
84. Barral A. *et al.* Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 732–734 (1986).
85. Barral A. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**, 536–546 (1991).
86. Almeida R. P. *et al.* Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**, 178–184 (1996).
87. Olivier M., Gregory D. J. & Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 293–305 (2005).
88. Lainson R., Ryan L. & Shaw J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **82**, 421–424 (1987).
89. Chang K.-P. & McGwire B. S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **1**, 1 (2002).
90. Alexander J., Satoskar A. R. & Russell D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.* **112 Pt 18**, 2993–3002 (1999).
91. Kaye P. & Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the host–pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 604–615 (2011).
92. Murray H. W., Berman J. D., Davies C. R. & Saravia N. G. Advances in leishmaniasis. *Lancet (London, England)* **366**, 1561–1577 (2005).
93. Jones T. C. *et al.* Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J. Infect. Dis.* **156**, 73–83 (1987).
94. Bogdan C., Gessner A., Solbach W. & Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania*

- parasites. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 517–525 (1996).
95. Rogers K. A. *et al.* Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**, 1–7 (2002).
 96. Scott P., Natovitz P., Coffman R. L., Pearce E. & Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.* **168**, 1675–1684 (1988).
 97. Heinzl F. P., Sadick M. D., Holaday B. J., Coffman R. L. & Locksley R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* **169**, 59–72 (1989).
 98. Novais F. O. *et al.* Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. **135**, 94–101 (2015).
 99. Scott P. & Novais F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 581–592 (2016).
 100. Caceres-Dittmar G. *et al.* Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.* **91**, 500–505 (1993).
 101. Pirmez C. *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* **91**, 1390–1395 (1993).
 102. Reis L. D. C., Felinto De Brito M. E., Souza M. D. A. & Alves Pereira V. R. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev. Patol. Trop.* **35**, (2014).
 103. Lima-Junior D. S. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat. Med.* **19**, 909–915 (2013).
 104. Carvalho E. M., Barral A., Costa J. M., Bittencourt A. & Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* **56**, 315–325 (1994).
 105. Bomfim G. *et al.* Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* **84**, 188–194 (1996).
 106. Freitas-Junior L. H., Chatelain E., Kim H. A. & Siqueira-Neto J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist.* **2**, 11–19 (2012).
 107. Sundar S. & Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin. Pharmacother.* **14**, 53–63 (2013).
 108. Chitsulo L., Engels D., Montresor A. & Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* **77**, 41–51 (2000).
 109. Alvar J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7**, (2012).
 110. Zijlstra E. E. *et al.* Kala-azar in displaced people from southern Sudan: epidemiological, clinical and therapeutic findings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**, 365–369 (1991).
 111. Piscopo T. V & Mallia Azzopardi C. Leishmaniasis. *Postgrad. Med. J.* **83**, 649–657 (2007).
 112. Brasil, M. da S. Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010-2015. (2017). Available at: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/png/2017/setembro/14/mapa-distribuicao-esquistossomose-2010-1015.png>. (Accessed: 19th May 2019)
 113. Organização Pan-Americana Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas. *World Heal.*

- Organ.* 1–7 (2018).
114. Olivier L. & Stirewalt M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **38**, 19–23 (1952).
 115. Pinto-da-Silva L. H. *et al.* The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of *Leishmania (L.) amazonensis* metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut. *Int. J. Parasitol.* **35**, 757–764 (2005).
 116. Pellegrino J. & Siqueira A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* **8**, (1956).
 117. Katz N., Chaves A. & Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **14**, 397–400 (1972).
 118. Lima H. C., Bleyenbergh J. A. & Titus R. G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol. Today* **13**, 80–82 (1997).
 119. Tsutsui H., Matsui K., Okamura H. & Nakanishi K. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol. Rev.* **174**, 192–209 (2000).
 120. Crispe I. N. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 51–62 (2003).
 121. Thomson A. W. & Knolle, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 753–766 (2010).
 122. Afonso L. C. C. & Scoti, P. Immune Responses Associated with Susceptibility of C57BL / 10 Mice to *Leishmania amazonensis*. **61**, 2952–2959 (1993).
 123. King C. H. & Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn.* **4**, 65–79 (2008).
 124. Williamson W. A. & Greenwood, B. M. Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria. *Lancet (London, England)* **1**, 1328–1329 (1978).
 125. Richter J. *et al.* Sonographic prediction of variceal bleeding in patients with liver fibrosis due to *Schistosoma mansoni*. *Trop. Med. Int. Health* **3**, 728–735 (1998).

ANEXOS

Anexos

1. Certificado CEUA/UNICAMP



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **PARASITISMO SIMULTÂNEO POR SCHISTOSOMA MANSONI E LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS EM MODELO MURINO: COINFEÇÃO OU COABITAÇÃO?** registrada com o nº **4577-1/2017**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti e Marília Bergamini Valentini**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **08 de junho de 2017**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	08/06/2017-03/06/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	08/06/2017-03/06/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/c AnUnib
No. de animais:	70
Peso / Idade:	21 dias / 18g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 08 de junho de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

2. Declaração de direito autoral

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **PARASITISMO SIMULTÂNEO POR SCHISTOSOMA MANSONI E LEISHMANIA AMAZONENSIS EM MODELO MURINO: COINFECÇÃO OU COABITAÇÃO?**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 02 de outubro de 2019.

Assinatura : MARILIA BERGAMINI VALENTINI
Nome do(a) autor(a): **Marilia Bergamini Valentini**
RG n.º 48.392.306.-0

Assinatura : Silmaria Marques Allegretti
Nome do(a) orientador(a): **Silmaria Marques Allegretti**
RG n.º 142824446