

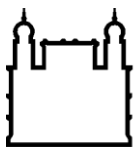
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

INFLUÊNCIA DAS COINFECÇÕES POR *Plasmodium yoelii* 17XNL
E *Leishmania braziliensis* OU *Leishmania amazonensis* NO CURSO
DAS INFECÇÕES E NA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS
BALB/c

RAQUEL ALVES PINNA

Rio de Janeiro
Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RAQUEL ALVES PINNA

Influência das coinfeções por *Plasmodium yoelii* 17XNL e *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania amazonensis* no curso das infecções e na resposta imune de camundongos BALB/c

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Dalma Maria Banic

RIO DE JANEIRO

Junho de 2016

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

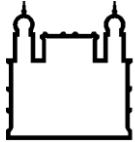
P656 Pinna, Raquel Alves

Influência das coinfeções por *Plasmodium yoelii* 17XNL e *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania amazonensis* no curso das infecções e na resposta imune de camundongos BALB/c / Raquel Alves Pinna. – Rio de Janeiro, 2016.

xxii, 169 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 138-169



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: RAQUEL ALVES PINNA

**INFLUÊNCIA DAS COINFEÇÕES POR *Plasmodium yoelii* 17XNL E
Leishmania braziliensis OU *Leishmania amazonensis* NO CURSO DAS
INFEÇÕES E NA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Dalma Maria Banic

Aprovada em: 23 / 06 / 2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

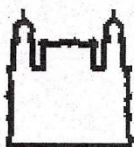
Profa. Dra. Katia da Silva Calabrese (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Prof. Dr. Alexandre Morrot Lima (Instituto de Microbiologia - UFRJ)

Profa. Dra. Déa Maria Serra Villa Verde (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Profa. Dra. Carla Eponina de Carvalho Pinto (Instituto de Biologia - UFF)

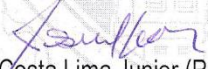
Rio de Janeiro, 23 de junho de 2016

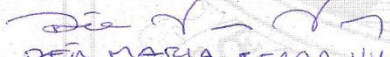


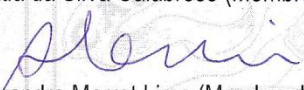
Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Raquel Alves Pinna**, sob orientação da Dr^a. Dalma Maria Banic. Ao vigésimo terceiro dia do mês de junho de dois mil e dezesseis, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ o exame da tese de doutorado intitulada: **"Influência das coinfeções por *Plasmodium yoelii* 17XNL e *Leishmania braziliensis* ou *L. amazonensis* no curso das infecções e na resposta imune de camundongos BALB/c"** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Josué da Costa Lima Junior - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Katia da Silva Calabrese - IOC/FIOCRUZ, Dr. Alexandre Morrot Lima - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr^a. Déa Maria Serra Villa Verde - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Carla Eponina Carvalho Pinto - UFF/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APPROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora.

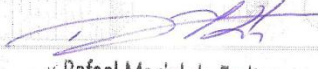

Dr. Josué da Costa Lima Junior (Presidente da Banca):


Dr^a. Katia da Silva Calabrese (Membro da Banca):


Dr. Alexandre Morrot Lima (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

*com tempo: Faltou se lá des Katia da Silva Calabrese, lá se des dia
facio Serra Villa Verde.*


Dr. Rafael Maciel de Freitas
Coordenador de Pós-Graduação
em Biologia Parasitária
IOC/FIOCRUZ - SIAPE 1603050

Aos meus pais, Rogério e Alice,
pelo amor incondicional.

Ao meu marido, Helio, pelo amor e
carinho a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

A realização de um trabalho científico nunca é uma jornada solitária. Ao longo do percurso nós contamos com a ajuda de muitas pessoas que doam seu tempo, seu trabalho, sua experiência ou, simplesmente, seus ouvidos, para nos ajudar a seguir o nosso caminho, por mais sinuoso e difícil que ele possa parecer. Por esse motivo, não posso deixar de agradecer àqueles que caminharam comigo de forma mais próxima e que foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese. A todos vocês, **MUITO OBRIGADA!**

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora, Dra. Dalma Maria Banic, por toda a dedicação ao longo desses anos. Obrigada pela disponibilidade a qualquer hora do dia ou da noite, em finais de semana e feriados. Uma pessoa de competência técnico-científica inegáveis, mas acima de tudo, humana, ética e de caráter inabável, exemplo de profissional e ser humano. Deixando um pouco de lado as formalidades, gostaria de agradecer pelas risadas, as conversas, os conselhos e pela amizade que construímos ao longo desses anos. Com você, eu aprendi muitas coisas e não poderia deixar de prestar aqui minha homenagem.

Agradeço também a minha segunda orientadora (porque ela foi muito mais do que uma colaboradora!), a Dra. Paula Mello de Luca. Obrigada por toda a ajuda na parte experimental e teórica deste trabalho. Aprendi muito com você! Bem-humorada, sempre disposta a ajudar, me fez acreditar que tudo daria certo, mesmo quando os experimentos davam errado.

Ao Dr. Josué da Costa Lima Junior por aceitar o convite de fazer a revisão desta tese.

À Dra. Marilza Maia Herzog, chefe do Laboratório de Simulídeos e Oncocercose e Infecções Simpátricas: Mansonelose e Malária, pelo apoio e por garantir a infra-estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, ainda, a todos os funcionários do IOC que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho. As funcionárias da Plataforma de Citometria de Fluxo do IOC, Dra. Cynthia Machado Cascabulho e Dra. Daniela

Gois Beghini, pela disponibilidade e atenção e aos funcionários do Biotério de Experimentação do Pavilhão Leônidas Deane, em especial, a médica veterinária Tatiana Pádua Tavares de Freitas, responsável técnica pelo biotério, pelo cuidado com os animais.

A Fundação Oswaldo Cruz, a pós-graduação em Biologia Parasitária e a CAPES por terem financiado os meus estudos e o projeto de pesquisa.

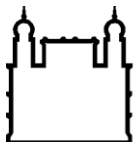
Em especial, agradeço a todos os meus amigos e familiares que participaram dos momentos de alegria e de angústia ao longo desses quatro anos. Obrigada, pai e mãe, por sempre me incentivarem e por entenderem os sacrifícios que precisamos fazer na busca dos nossos sonhos. Obrigada, maninha, pela parceria. Helio, agradeço por todo o apoio e pela cumplicidade no desenvolvimento desta tese. Sem você, as figuras não seriam tão bonitas e os dias dedicados a redação deste trabalho seriam mais solitários. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Também aproveito para agradecer a minha amiga e companheira de laboratório, Dra. Daiana de Souza Perce da Silva, por todas os dias agradáveis que passamos juntas no laboratório, as conversas e o apoio mútuo.

Por fim, gostaria de agradecer a compreensão da Profa. Cássia Mônica de Oliveira Costa pelos momentos em que precisei me ausentar do laboratório para o desenvolvimento desta tese.

A TODOS, meus sinceros, agradecimentos!

“Não há lugar para a sabedoria onde
não há paciência.”

Santo Agostinho



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

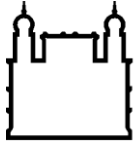
INFLUÊNCIA DAS COINFEÇÕES POR *Plasmodium yoelii* 17XNL E *Leishmania braziliensis* OU *Leishmania amazonensis* NO CURSO DAS INFECÇÕES E NA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Raquel Alves Pinna

Malária e leishmaniose cutânea são doenças endêmicas em países tropicais e subtropicais do mundo, colocando as populações sob o constante risco de coinfeções. Neste trabalho, foram avaliados o curso clínico, o nível de citocinas Th1 e Th2 e o perfil de células T CD4 e CD8 no modelo de coinfeção experimental em camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium yoelii* (Py) e *Leishmania braziliensis* (Lb) ou *Leishmania amazonensis* (La). A parasitemia foi monitorada através de distensões sanguíneas coradas com Giemsa, as lesões foram avaliadas semanalmente com um paquímetro digital e a carga parasitária das lesões foi avaliada através da técnica de diluição limitante. Os níveis séricos de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 foram determinados através de um ensaio com beads magnéticas e a expressão de CD3, CD4 e CD8 em linfócitos do timo, baço e linfonodos foi determinada por citometria de fluxo. A parasitemia do grupo coinfectado Lb+Py foi menor do que a parasitemia do grupo infectado apenas com Py, sugerindo um efeito protetor da coinfeção no curso da malária. A coinfeção La+Py, ao contrário, apresentou parasitemias mais elevadas e induziram a morte dos animais na infecção com plasmódio murino não letal. Em relação à leishmaniose, o grupo Lb+Py apresentou lesões menores e com menos ulceração do que o grupo infectado apenas com Lb. Já no grupo La+Py foi observado apenas um atraso transitório no desenvolvimento das lesões em comparação ao grupo infectado apenas com La. Níveis séricos mais baixos de IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 também foram verificados no soro dos animais coinfectados, demonstrando um efeito modulador da coinfeção com *Leishmania* na resposta imune à malária. No timo foi observada uma intensa atrofia no grupo infectado apenas com Py e nos grupos coinfectados. Contudo, a recuperação tímica do grupo coinfectado ocorreu mais cedo do que nos animais infectados apenas com Py. O perfil das células T CD4 e CD8 no timo, baço e linfonodos não apresentou diferenças, exceto pela diminuição das células CD4⁺CD8⁺ que aumentou mais rapidamente no grupo coinfectado. Em resumo, nossos resultados sugerem que a coinfeção por *P. yoelii* e *Leishmania* alteram o desfecho das doenças. O curso da malária é modificado dependendo da espécie de *Leishmania* coinfectante e a severidade da leishmaniose diminui, pelo menos transitoriamente, na coinfeção com plasmódio. Essas alterações parecem estar relacionadas com modificações na resposta imune dos grupos coinfectados em relação aos grupos coinfectados.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFLUENCE OF *Plasmodium yoelii* 17XNL AND *Leishmania braziliensis* OR *Leishmania amazonensis* BALB/c MICE COINFECTION ON INFECTION COURSE AND IMMUNE RESPONSE

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Raquel Alves Pinna

Malaria and Cutaneous Leishmaniasis are co-endemic throughout large regions in tropical countries and co-infection may impact the evolution of host-parasite interactions. In the present study, we evaluate Malaria/Leishmaniasis disease outcome, Th1/Th2 cytokine levels and the CD4 and CD8 T-cell profiles in a co-infection murine model (BALB/c) of *Plasmodium yoelii* 17XNL (Py) and *Leishmania braziliensis* (Lb) or *Leishmania amazonensis* (La). Malaria parasitaemia was assessed through blood smears stained with Giemsa. *Leishmania* lesions were monitored with a digital caliper and parasite loads determined by limiting-dilution assay. Serum levels of IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17 were determined using multiplexed bead assay and expression of CD3, CD4 and CD8 T-cells markers were determined by Flow Cytometry in the thymus, spleens and lymph nodes. Parasitaemia in Lb+Py co-infected group was lower than in Py single-infected group, suggesting a protective effect of Lb co-infection in Malaria progression. In contrast, La+Py co-infection increased parasitaemia, patent infection and induced mortality in non-lethal Malaria infection. Regarding Leishmaniasis, Lb+Py co-infected group presented smaller lesions and less ulceration than Lb single-infected animals. In contrast, La+Py co-infected group presented only a transitory delay on the development of lesions when compared to La single-infected mice. Decreased levels of IFN- γ , TNF, IL-6 and IL-10 were observed in the serum of co-infected groups, demonstrating a modulation of Malaria immune response by *Leishmania* co-infections. We observed an intense thymic atrophy in Py single-infected and co-infected groups, which recovered earlier in co-infected animals. The CD4 and CD8 T cell profiles in thymus, spleens and lymph nodes did not differ between Py single and co-infected groups, except for a decrease in CD4+CD8+ T cells which also increased faster in co-infected mice. Our results suggest that Py and *Leishmania* co-infection may change disease outcome. Interestingly Malaria outcome can be altered according to the *Leishmania* specie involved. Alternatively Malaria infection reduced the severity or delayed the onset of leishmanial lesions. These alterations in Malaria and Cutaneous Leishmaniasis development seem to be closely related with changes in the immune response as demonstrated by alteration in serum cytokine levels and thymus/spleens T cell phenotypes dynamics during infection.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Malária: aspectos gerais.....	23
1.2 Malária no mundo.....	24
1.3 Malária no Brasil.....	25
1.4 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> sp.	27
1.5 Resposta imune na malária	34
1.6 Uso de modelos experimentais na malária	42
1.7 Leishmanioses: aspectos gerais	46
1.8 Classificação das leishmanioses.....	46
1.9 Leishmaniose no mundo	50
1.10 Leishmaniose cutânea no Brasil.....	52
1.11 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp.....	54
1.12 Resposta imune na leishmaniose tegumentar.....	61
1.13 Uso de modelos experimentais na leishmaniose tegumentar.....	71
1.14 Coinfecção	75
1.15 Justificativa.....	79
2 OBJETIVOS	81
2.1 Objetivo geral.....	81
2.2 Objetivos específicos.....	81
3 MATERIAL E MÉTODOS	83
3.1 Animais	83
3.2 Parasitos	83
3.2.1 <i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL.....	83
3.2.2 <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>L. amazonensis</i>	83
3.3 Infecção experimental.....	84
3.3.1 <i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL.....	84
3.3.2 <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>L. amazonensis</i>	84

3.4	Desenho experimental	85
3.5	Acompanhamento das infecções.....	86
3.5.1	Infecção por <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	86
3.5.2	Infecção por <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. amazonensis</i>	87
3.6	Quantificação da concentração de citocinas no soro.....	90
3.7	Avaliação do timo.....	92
3.7.1	Massa relativa do timo	92
3.7.2	Celularidade e imunofenotipagem de timócitos	92
3.8	Avaliação dos linfonodos	93
3.8.1	Obtenção e imunofenotipagem das células dos linfonodos	93
3.9	Avaliação do baço	94
3.9.1	Obtenção e imunofenotipagem de esplenócitos	94
3.10	Análise estatística	95
4	RESULTADOS	96
4.1	Alterações parasitológicas.....	96
4.1.1	Infecção por <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	96
4.1.2	Infecção por <i>L. braziliensis</i>	98
4.1.3	Infecção por <i>L. amazonensis</i>	101
4.2	Taxa de sobrevivência	104
4.3	Citocinas séricas.....	106
4.4	Avaliação do timo.....	109
4.4.1	Massa relativa.....	109
4.4.2	Celularidade.....	111
4.5	Avaliação dos linfonodos	119
4.6	Avaliação do baço	124
4.6.1	Células T.....	124
5	DISCUSSÃO	127
6	CONCLUSÕES	136
6.1	Conclusões gerais.....	136
6.2	Conclusões pontuais	136

7	REFERÊNCIAS	138
8	ANEXOS	170
8.1	Anexo 1- Licença do comitê de ética no uso de animais (CEUA).....	170
8.2	Artigo.....	171

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Classificação dos países por estágio de eliminação da malária	25
Figura 2- Áreas com risco de transmissão de malária no Brasil em 2014.....	27
Figura 3- Ciclo hepático	30
Figura 4- Invasão do eritrócito pelo merozoíto	31
Figura 5- Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> sp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado.	33
Figura 6 - Resposta imune na fase eritrocítica da malária	41
Figura 7- Distribuição mundial da leishmaniose cutânea em 2013	52
Figura 8- Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil.....	53
Figura 9- Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp. nos hospedeiros vertebrados e invertebrados.....	56
Figura 10- Possibilidades de infecção de macrófagos com <i>Leishmania</i> através da interação com neutrófilos.	58
Figura 11- Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) no flebotomíneo vetor.	61
Figura 12- Formas de ativação dos macrófagos.	64
Figura 13 - Papel protetor das células T CD8 ⁺ na infecção por <i>Leishmania</i> sp.	69
Figura 14 - Efeito patogênico das células T CD8 ⁺ citotóxicas na infecção por <i>Leishmania</i> sp.	70

Figura 15 - Exemplos de interações anagonistas, neutras e sinérgicas entre os parasitos.....	76
Figura 16- Desenho experimental	86
Figura 17- Medição de lesão causada por <i>Leishmania</i> spp. com paquímetro digital.....	87
Figura 18- Linfonodos submandibulares e submandibulares acessórios	89
Figura 19- Exemplo de curva-padrão de TNF obtida no programa <i>FCAP Array</i> versão 3.0.....	91
Figura 20- Localização dos linfonodos cervicais, axilares, braquiais, inguinais e mesentéricos em camundongo	94
Figura 21- Comparação entre as parasitemias dos animais dos grupos mono infectados e co infectados	97
Figura 22- Comparação entre o desenvolvimento de lesões e o aparecimento de úlceras em animais dos grupos <i>L. braziliensis</i> (Lb) e <i>L. braziliensis</i> + <i>P. yoelii</i> 17XNL (Lb+Py).....	99
Figura 23- Carga parasitária nas orelhas e nos linfonodos de drenagem dos grupos <i>L. braziliensis</i> (Lb) e <i>L. braziliensis</i> + <i>P. yoelii</i> (Lb+Py)	100
Figura 24- Comparação entre o desenvolvimento de lesões e o aparecimento de úlceras em animais dos grupos <i>L. amazonensis</i> (La) e <i>L. amazonensis</i> + <i>P. yoelii</i> (Lb+Py).	102
Figura 25- Carga parasitária nas orelhas e nos linfonodos de drenagem dos grupos <i>L. amazonensis</i> (La) e <i>L. amazonensis</i> + <i>P. yoelii</i> (La+Py).....	103
Figura 26- Taxa de sobrevivência nos grupos mono infectados e co infectados.	105
Figura 27- Cinética de citocinas no soro de animais mono infectados e co infectados	107

Figura 28- Comparação entre a massa relativa do timo nos grupos controle, mono infectados e co infectados	110
Figura 29- Número absoluto de timócitos nos grupos controle, mono infectados e co infectados	114
Figura 30- Percentual de subpopulações tímicas nos grupos controle, mono infectados e co infectados	117
Figura 31- Percentual de células CD3 ⁺ nos linfonodos de drenagem da orelha, subcutâneos e mesentéricos de animais dos grupos controle, mono infectados e co infectados	120
Figura 32- Percentual de subpopulações de linfócitos T nos linfonodos de drenagem das orelhas nos grupos controle, mono infectados e co infectados..	121
Figura 33- Percentual de subpopulações de linfócitos T nos linfonodos subcutâneos dos grupos controle, mono infectados e co infectados	122
Figura 34- Percentual de subpopulações de linfócitos T nos linfonodos mesentéricos dos grupos controle, mono infectados e co infectados	123
Figura 35- Percentual de células CD3 ⁺ no baço dos animais dos grupos controle, mono infectados e co infectados	125
Figura 36- Percentual de subpopulações de esplenócitos no baço dos grupos controle, mono infectados e co infectados	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Infecção por <i>Plasmodium</i> spp. em diferentes linhagens de camundongos.....	45
Tabela 2- Principais espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de doença humana.	50
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens das células T reguladoras (Tregs) na infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	68
Tabela 4 - Diferentes modelos de infecção experimental com espécies dermatrópicas de <i>Leishmania</i> sp.....	73
Tabela 5- Via e inóculo da infecção experimental de camundongos BALB/c com <i>Plasmodium yoelii</i> e <i>Leishmania</i> spp.	85
Tabela 6- Limite de detecção do kit <i>Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit</i> (BD Biosciences)	91
Tabela 7- Valores de <i>P</i> encontrados na comparação dos níveis de citocinas séricas de camundongos dos grupos controle, mono infectados e co infectados.	108
Tabela 8-Valores de <i>P</i> encontrados na comparação da massa relativa dos timos de camundongos dos grupos controle, mono infectados e co infectados.	111
Tabela 9- Número absoluto de subpopulações celulares no timo	113
Tabela 10- Valores de <i>P</i> encontrados na comparação do número absoluto de timócitos de camundongos dos grupos controle, mono infectados e co infectados.	115

Tabela 11- Valores de *P* encontrados na comparação do percentual das subpopulações de timócitos dos grupos controle, mono infectados e co infectados. 118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
ADCI	Inibição celular dependente de anticorpos, do inglês <i>Antibody-Dependent Cellular Inhibition</i>
APC	Alofocianina
APCCy7	Alofocianina cianina 7
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
Breg	B reguladora
C	Controle
CD	Grupo de diferenciação, do inglês <i>Cluster of Differentiation</i>
cDC	Célula dendrítica convencional
CR	Receptor de complemento
CSP	Proteína circunsporozoíta
CTL	Linfócito T citotóxico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Células T duplo negativas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína

<i>g</i>	Força da gravidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HP	Hemácias parasitadas
ID	Intradérmico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IP	Intraperitoneal
La	<i>Leishmania amazonensis</i>
La+Py	<i>Leishmania amazonensis</i> + <i>Plasmodium yoelii</i>
Lb	<i>Leishmania braziliensis</i>
Lb+Py	<i>Leishmania braziliensis</i> + <i>Plasmodium yoelii</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
LRV	<i>Leishmania</i> RNA Vírus
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MoDC	Célula dendrítica derivada de monócito
NaCl	Cloreto de sódio

NK	Células assassinas naturais, do inglês <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Padrão analítico
PBS	Salina tamponada com fosfatos, do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
pDC	Célula dendrítica plasmocitóide
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficoeritrina cianina 5
PECy7	Ficoeritrina cianina 7
PETR	Ficoeritrina Texas Red
PFA	Paraformaldeído
pg	Picogramas
Py	<i>Plasmodium yoelii</i>
RNS	Espécies reativas do nitrogênio
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SPF	Livre de patógenos específicos, do inglês <i>Specific Pathogen Free</i>
TCR	Receptores de célula T
Th	T auxiliadora, do inglês <i>T helper</i>
Tr1	T reguladora do tipo 1

Treg	T reguladora
UI	Unidades internacionais
μL	Microlitro

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: aspectos gerais

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que são transmitidos ao homem pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. A malária humana é causada por cinco espécies de plasmódios: *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (1). Destas, apenas o *P. knowlesi* é considerado uma espécie zoonótica já que o seu ciclo natural é mantido em macacos do sudeste asiático (*Macaca fascicularis* e *M. nemestrina*), apesar de ser transmitido também ao homem (2, 3).

Acredita-se que a origem da malária é anterior ao surgimento da espécie humana devido à grande diversidade de plasmódios existente e a capacidade de infectar diferentes vertebrados terrestres (4). Contudo, ainda existe muita especulação em relação às origens das espécies que infectam o homem e os outros animais. A hipótese mais disseminada é que os plasmódios humanos divergiram das espécies de plasmódios de primatas ancestrais antes da divisão entre chimpanzés e humanos (4-6). Mais recentemente, foram descobertas novas espécies de plasmódios infectando macacos, muitas dessas, ocorrendo simultaneamente com *P. falciparum* (7, 8). Esses achados levantaram a possibilidade da malária humana ter surgido a partir da transmissão direta dessas espécies dos símios para o homem mais recentemente e não durante a separação evolutiva de humanos e chimpanzés (9-11). O estabelecimento do ciclo da doença na população humana teria ocorrido, provavelmente, por volta de 10 mil anos antes de Cristo (a.C.), com o advento da agricultura. Nesse momento histórico em que o homem deixou de ser nômade e passou a viver em assentamentos, a transmissão da doença foi favorecida pelo aumento da densidade populacional tanto de humanos quanto de vetores (12).

A referência mais antiga à malária que se têm registro está contida em textos chineses de 2.700 anos a.C., mas também há relatos em textos de muitas outras civilizações antigas: hindus, mesopotâmios, egípcios, gregos,

romanos entre outros (13, 14). A suposição da natureza miasmática da doença foi amplamente difundida até a descrição do parasito por Charles Louis Alphonse Laveran em 1880 e a incriminação dos mosquitos como vetores, inicialmente para a malária aviária, por Ronald Ross em 1987 (13, 14).

1.2 Malária no mundo

A malária ainda é um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, apesar dos crescentes esforços da Organização Mundial da Saúde (OMS) junto aos países endêmicos para o controle e a eliminação da doença. Muitos avanços já foram obtidos como a redução da incidência mundial da malária em torno de 37% e da mortalidade em 60% no período que compreende o ano de 2000 até 2015 (1). Um número crescente de países têm obtido progressos no controle e na eliminação da malária e, atualmente, 20 países se encontram em fase de pré-eliminação e de eliminação e 8 em fase prevenção de reintrodução da doença (Figura 1). Apesar disso, a malária continua sendo endêmica em 96 países colocando quase metade da população mundial sob o risco de infecção. As estratégias de controle da malária são baseadas na prevenção, diagnóstico e tratamento precoce da doença, mas fatores que alteram a dinâmica das condições de transmissão da doença como migrações (15, 16), mudanças climáticas (17) e desastres naturais (18) também precisam ser considerados.

A OMS estima que, em 2015, 214 milhões de casos de malária tenham ocorrido e que 438 mil pessoas tenham morrido em função da doença (1). A maioria dos casos está concentrada no continente africano (88%), seguido do sudeste asiático (7%) e da parte oriental do mediterrâneo (2%) (1). As espécies *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo e causam maior morbidade e mortalidade nas populações afetadas. A malária causada por *P. falciparum* é mais frequente no continente africano e é responsável pela maioria dos casos fatais da doença, especialmente em crianças abaixo de 5 anos de idade (1). *P. vivax* têm uma distribuição geográfica mais ampla em função de características biológicas próprias da espécie como o

desenvolvimento de formas latentes e o tempo de incubação variável, o que facilita a sua adaptação a zonas tropicais e temperadas (19). Na Ásia e na América, a maioria dos casos de malária é causada por essa espécie.

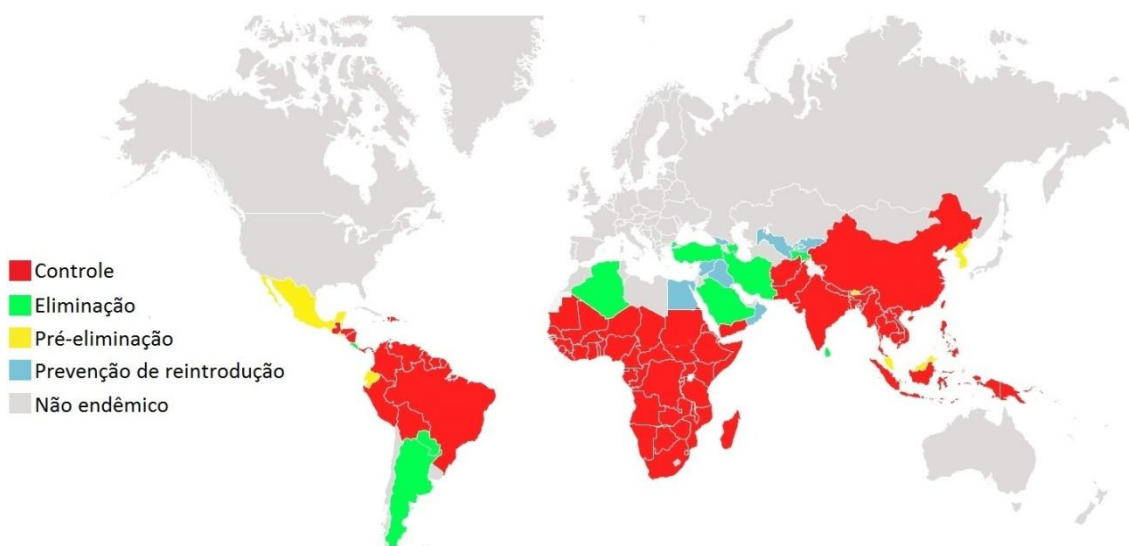


Figura 1- Classificação dos países por estágio de eliminação da malária. Fonte: Organização Mundial da Saúde (20).

1.3 Malária no Brasil

As áreas com maior risco de infecção no continente americano estão localizadas na floresta Amazônica, sendo o Brasil o país que abriga o maior número de casos (1). A região Amazônica brasileira abrange 60% do território nacional e é formada por nove estados: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e parte dos estados do Mato Grosso e do Maranhão. A maioria dos casos de malária (99%) se concentra nessa região sendo a distribuição pelos estados heterogênea (Figura 2). Segundo o Ministério da Saúde, em 2015 foram registrados aproximadamente 141 mil casos de malária na região amazônica brasileira. Desses, 123.570 eram causados por *P. vivax*, 15.523 por *P. falciparum*, 766 eram infecções mistas por *P. falciparum* e *P. vivax*, 37 eram infecções por *P. malariae* e apenas 1 por *P. ovale* (21).

A malária apresenta períodos de sazonalidade que estão intimamente relacionados a características climáticas locais, principalmente, precipitação e temperatura. De forma geral, há um aumento no número de casos da doença no período de transição entre as estações úmida e seca porque as condições ambientais favorecem a proliferação do principal vetor, *Anopheles darlingi*. Todavia, fatores sociais e econômicos são tão importantes como os fatores ambientais. Historicamente, ações humanas de desmatamento e ocupação desordenadas relacionadas a grandes empreendimentos econômicos como a construção da rodovia Madeira-Mamoré, a extração do látex (durante o ciclo da borracha), a mineração e a agricultura contribuíram para um aumento expressivo do número de casos de malária na Amazônia brasileira (22-24). O grande fluxo de indivíduos provenientes de regiões não endêmicas, portanto imunologicamente desprotegidos, somada a condições precárias de habitação, o difícil acesso às residências e as deficiências dos serviços de saúde contribuíram para o incremento significativo na incidência da doença na região.

Uma pequena parcela dos casos de malária notificados no Brasil ocorre em regiões extra-amazônicas. Muitos são casos importados de áreas endêmicas brasileiras ou de outros países da América do Sul e da África (23). Os casos autóctones se concentram na faixa litorânea do sudeste brasileiro que compreende o bioma da Mata Atlântica. A malária de Mata Atlântica é causada por *P. vivax* e, em menor proporção, por *P. malariae* que são transmitidos pelo mosquito *Anopheles cruzii* (23, 24). Outra possibilidade é que essas infecções sejam causadas, na verdade, pelos parasitos simianos *P. simium* e *P. brazilianum* porque são capazes de infectar o homem e são morfológica e geneticamente idênticos ao *P. vivax* e ao *P. malariae*, respectivamente (23, 25). Além disso, mais recentemente foi verificada a circulação de *P. falciparum* nas áreas de Mata Atlântica e em maior quantidade do que *P. vivax*, sugerindo que *P. falciparum* também possa ter um papel importante na epidemiologia da malária extra-amazônica (26, 27). A malária, por ser incomum fora da área endêmica brasileira, costuma ser confundida com outras doenças febris, principalmente com a dengue (28). A demora no diagnóstico e no tratamento faz com que a proporção de casos graves e a

mortalidade da malária extra-amazônica sejam maiores do que nas regiões com alto índice de transmissão (29).

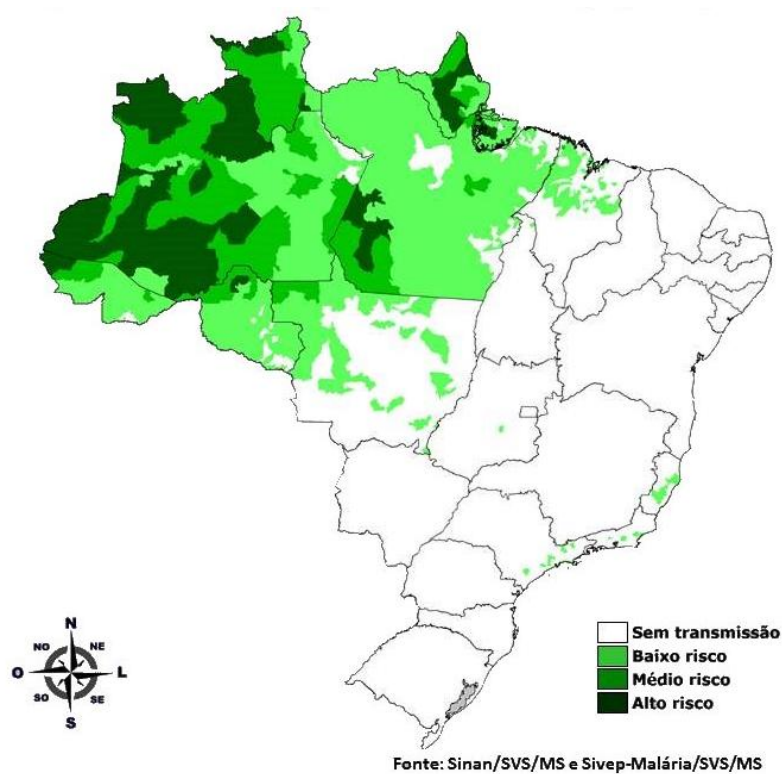


Figura 2- Áreas com risco de transmissão de malária no Brasil em 2014. Fonte: Ministério da Saúde (30)

1.4 Ciclo biológico de *Plasmodium* sp.

Os plasmódios são protozoários que apresentam ciclo de vida complexo com diferentes formas evolutivas. Para que o ciclo se complete são necessários dois hospedeiros: um vertebrado onde ocorre o ciclo assexuado e outro invertebrado onde ocorre o ciclo sexuado. Os hospedeiros vertebrados podem ser mamíferos, aves ou répteis e os invertebrados são os mais variados. Na malária de mamíferos os hospedeiros invertebrados são mosquitos do gênero *Anopheles*; na malária aviária os principais vetores são mosquitos do gênero *Culex*, *Aedes* e *Culiseta*, mais também *Anopheles*, *Psorophora* e *Mansonia* (31); já na malária de répteis os hospedeiros

invertebrados conhecidos são flebotomíneos do gênero *Lutzomya* (32, 33). Apesar da variedade de espécies que atuam como hospedeiros vertebrados e invertebrados, o ciclo biológico dos plasmódios mantém aspectos em comum.

No homem, o ciclo se inicia quando fêmeas de anofelinos infectadas com plasmódios inoculam, durante o repasto sanguíneo, os esporozoítos. As formas infectantes são liberadas principalmente na pele e não diretamente na corrente sanguínea como se imaginava (34). Para se alimentar, o mosquito realiza uma série de picadas até encontrar um vaso sanguíneo. Foi observado em modelo experimental que, em cada tentativa, os esporozoítos são liberados na pele juntamente com a saliva (35). No momento que o vaso sanguíneo é encontrado, o inseto começa a se alimentar, cessa a salivação e, conseqüentemente, a inoculação dos parasitos (36). O início da alimentação do inseto faz com que parte dos esporozoítos que tinham sido liberados na circulação sanguínea sejam ingeridos pelo mosquito, reduzindo o inóculo sanguíneo inicial, (34, 37, 38) e indicando que provavelmente a infecção por plasmódio ocorra majoritariamente na pele.

Os esporozoítos apresentam um movimento ativo e são capazes de atravessar tanto células da pele quanto do endotélio (39). Isso permite que alguns cheguem até a corrente sanguínea e outros aos vasos linfáticos, sendo carreados lentamente pela linfa até os linfonodos (36, 40). Os que permanecem na pele e os que são levados até os linfonodos podem se desenvolver até formas exoeritrocíticas, gerando merozoítos que são liberados através de uma estrutura vesicular, denominada merossomo, similar a que é encontrada no ciclo hepático (40-42). Aparentemente esses parasitos não são capazes de dar origem ao ciclo eritrocítico, mas podem ser uma fonte de antígenos para o sistema imune adaptativo (41, 42). Os esporozoítos que atravessam o endotélio e chegam na circulação sanguínea são levados passivamente até o fígado onde iniciam o ciclo hepático (43).

No fígado, os esporozoítos se aderem ao endotélio dos sinusóides hepáticos. Eles iniciam uma movimentação ativa e atravessam a barreira sinusoidal via células de Kupffer (macrófagos residentes), células endoteliais ou junções de células adjacentes (44, 45). Uma vez no parênquima hepático,

os esporozoítos migram através de vários hepatócitos utilizando vacúolos transitórios. Em um certo momento, o parasito se estabelece em um hepatócito e inicia a formação do vacúolo parasitóforo (46, 47). O vacúolo parasitóforo é formado pela invaginação da membrana citoplasmática da célula hospedeira durante a invasão dos esporozoítos, por proteínas produzidas pelo parasito e algumas proteínas da célula hospedeira (48). É nessa estrutura que o esporozoíto se desdiferencia em trofozoíto hepático, iniciando o ciclo de reprodução assexuada denominado de esquizogonia pré-eritrocítica (49). Ocorre uma rápida replicação do DNA e das organelas do parasito. Como resultado, há o desenvolvimento de um sincício multinucleado denominado esquizonte hepático. Após a organização dos núcleos e das organelas, a membrana plasmática do parasito começa a invaginar dando origem aos merozoítos (50). Com isso, o vacúolo parasitóforo é danificado, liberando milhares de merozoítos no citoplasma da célula hospedeira. Os merozoítos são, finalmente, liberados na circulação sanguínea em vesículas derivadas da membrana plasmática dos hepatócitos denominadas merossomos (Figura 3) (51). Os esporozoítos de algumas espécies de plasmódio, ao infectar o hepatócito, também podem dar origem a formas latentes denominadas hipnozoítos (do grego *hypnos*, sono) (Figura 3). Acredita-se que os hipnozoítos são os responsáveis pelas recidivas de malária em pacientes infectados com *P. vivax* ou *P. ovale*. De fato, já foram encontrados hipnozoítos de *P. vivax*, *P. cynomolgi* e *P. simiovale*, um análogo do parasita humano *P. ovale* (52, 53).

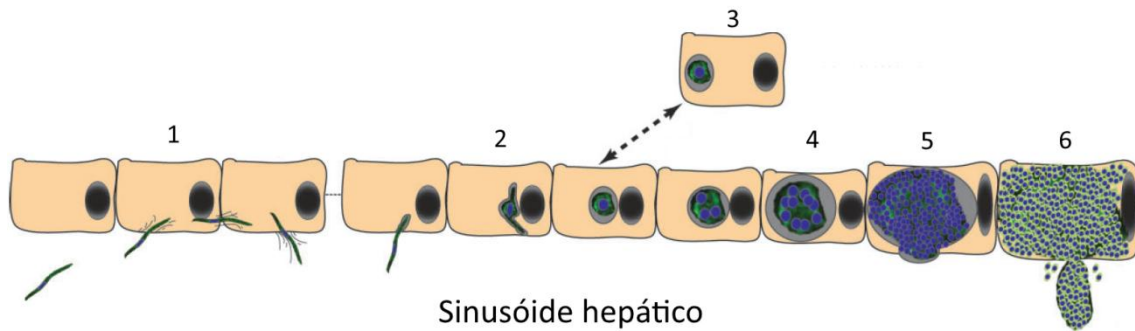


Figura 3- Ciclo hepático. 1) O esporozoítio chega ao fígado pela circulação sanguínea, atravessa a barreira sinusoidal, migra por alguns hepatócitos e, finalmente, se estabelece em um deles. 2) O parasito forma um vacúolo parasitóforo e se diferencia em trofozoítio. 3) Infecções com *P. vivax* ou *P. ovale*, podem gerar formas latentes (hipnozoítios). Os parasitos replicam o DNA e as organelas, formando milhares de merozoítios. 5) A membrana do vacúolo parasitóforo é danificada, liberando os merozoítios no citoplasma do hepatócito. 6) Os merozoítios são liberados nos sinusóides hepáticos em merossomos. Adaptado de Lindner *et al.* 2012 (49).

Durante o ciclo hepático a infecção é assintomática. Quando os merossomos se rompem na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos iniciando o ciclo eritrocítico da malária. Em modelo experimental, foi verificado que a ruptura dos merossomos ocorre no pulmão, mas ainda não existem evidências de que o mesmo ocorra no ser humano (54). A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é um processo ativo e complexo que envolve uma série de etapas. Primeiro, ocorre o reconhecimento e a adesão do merozoítio ao eritrócito através de proteínas presentes na superfície do parasito e na membrana celular. Em seguida, ocorre a reorientação apical do parasito, de forma que o complexo apical entre em contato com a membrana da célula hospedeira. Há a formação de uma junção irreversível entre o complexo apical e a membrana do eritrócito e o início da invasão ativa da célula pelo parasito, formando o vacúolo parasitóforo. Por fim, tem-se a liberação das proteínas de superfície do merozoítio e o fechamento do poro de invasão do parasito (55, 56) (Figura 4). No interior do eritrócito, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens, depois em trofozoítos maduros e, finalmente, em esquizontes

sanguíneos repletos de merozoítos. O eritrócito rompe e são liberados os merozoítos que irão invadir outras células, dando continuidade ao ciclo eritrocítico. Nesta fase são observados os sintomas da doença, em especial, o paroxismo malárico, caracterizado por calafrio, febre e sudorese em intervalos regulares.

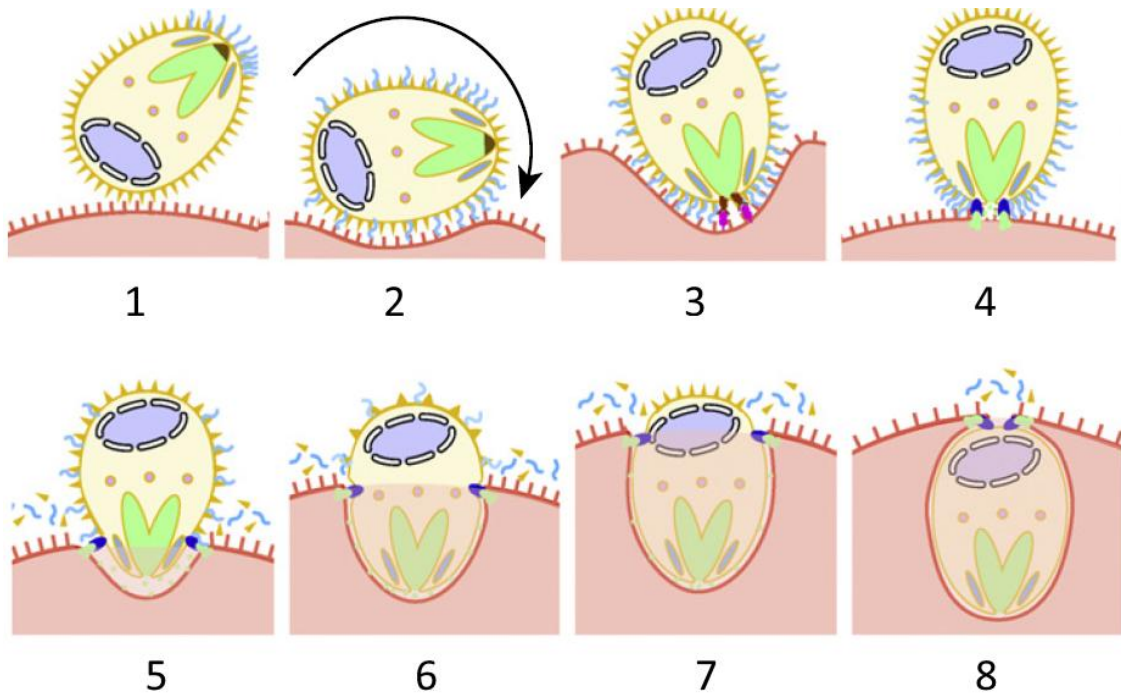


Figura 4- Invasão do eritrócito pelo merozoíto. 1) Contato inicial e adesão do merozoíto na membrana do eritrócito. 2) Reorientação apical. 3) Liberação do conteúdo das rotrias. 4) Formação da junção entre o complexo apical e a membrana da célula. 5) Início da invasão e da formação do vacúolo parasitóforo. 6) Internalização do parasito. 7) Liberação das proteínas de superfície do merozoíto. 8) Fechamento da membrana do eritrócito. Adaptado de Weiss *et al.* 2016 (56).

Após alguns ciclos de replicação nos eritrócitos, determinados parasitos se diferenciam em formas sexuadas, os gametócitos, que são fundamentais para a transmissão do parasito para o mosquito vetor. Acredita-se que os gametócitos se formem a partir de esquizontes comprometidos que

irão gerar merozoítos diferenciados (57-59). Ao infectarem uma nova célula, esses merozoítos darão origem aos gametócitos femininos e aos gametócitos masculinos em proporções variáveis, mas tendendo a favorecer os gametócitos femininos (57, 60). Os estímulos que induzem a gametocitogênese ainda não foram completamente elucidados. Já foi verificado experimentalmente que alguns fatores como a lise de hemácias, o aumento do número de reticulócitos, o soro humano, linfócitos, hormônios, cloroquina e a densidade parasitária induzem a formação dos gametócitos (57, 59). Ao serem ingeridos, as formas sexuadas darão continuidade ao ciclo no inseto vetor formando gametas. Para isso, o gametócito masculino passa por três ciclos de replicação do DNA, deixando de ser haplóide (1N) para se tornar octoplóide (8N), e produzindo 8 microgametas móveis em um processo denominado de exflagelação. Os gametócitos femininos, por outro lado, não passam por esses ciclos de replicação do DNA (60). Os gametas femininos são fecundados pelos gametas masculinos formando um zigoto que sofre meiose completa e se transforma em uma estrutura móvel com quatro núcleos denominada oocineto (60, 61). O oocineto atravessa a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio do inseto e se aloja na membrana basal, onde se diferencia em oocisto. Depois de uma série de divisões nucleares no interior do oocisto, são formados os esporozoítos que são liberados na hemocele do mosquito e podem chegar até as glândulas salivares (61, 62). Ao realizar um outro repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito vetor irá inocular os esporozoítos na pele do hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo de transmissão do parasito (Figura 5).

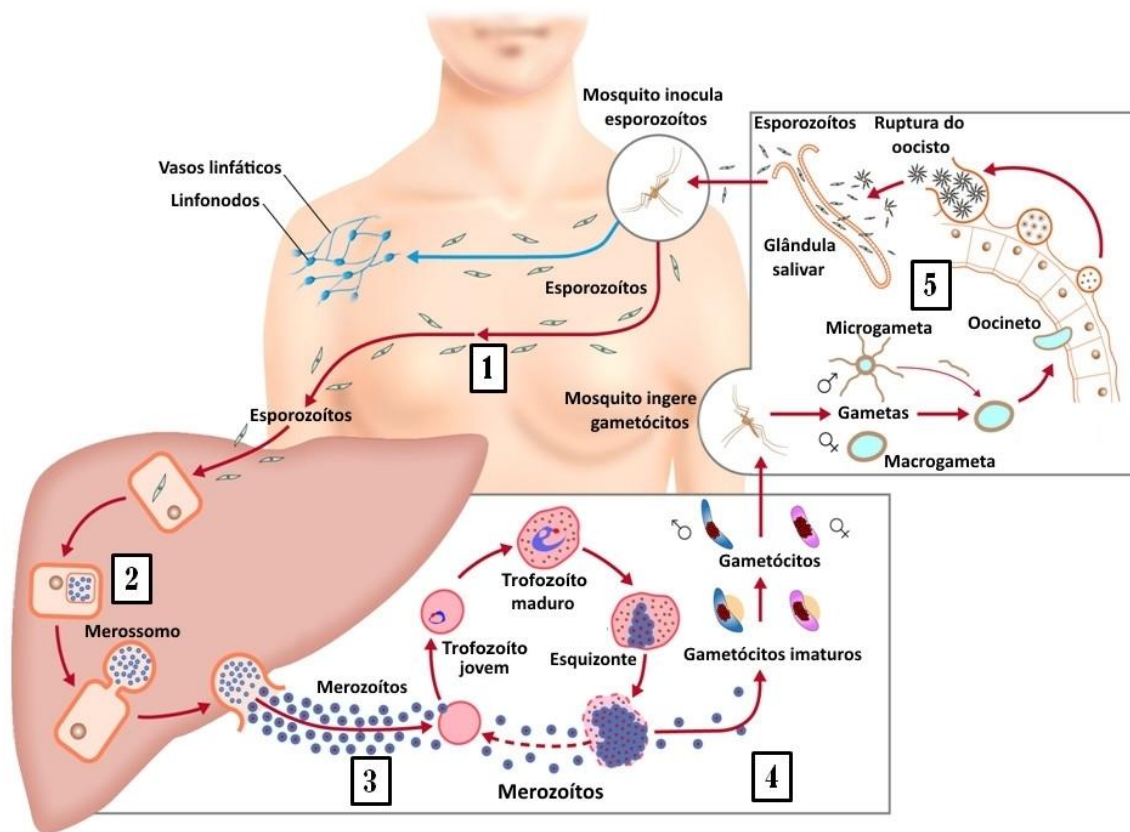


Figura 5- Ciclo biológico de *Plasmodium* sp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado. 1) Inoculação dos esporozoítos na pele do hospedeiro vertebrado e migração dos esporozoítos pela pele, vasos linfáticos e vasos sanguíneos. 2) Os esporozoítos são transportados até o fígado, atravessam a barreira sinusoidal e chegam no parênquima hepático, onde migram por algumas células até se estabelecerem e se diferenciarem em esquizontes hepáticos. Os esquizontes sofrem sucessivas divisões dando origem aos merozoítos que são liberados na circulação sanguínea em merossomos. 3) Os merozoítos infectam os eritrócitos e se diferenciam em trofozoito jovem, trofozoito maduro e esquizonte, que se rompe liberando mais merozoítos. 4) O ciclo eritrocítico se repete até que alguns parasitos se desenvolvam em gametócitos. 5) Ao se alimentar o anofelino ingere as formas sexuadas e ocorre a fertilização, formação do oocineto, do oocisto e de esporozoítos que caem na hemolinfa e chegam até as glândulas salivares do inseto que pode transmitir os parasitos para outro hospedeiro vertebrado. Adaptado de García-Basteiro *et al.* 2012 (63).

1.5 Resposta imune na malária

A maioria dos indivíduos infectados por *Plasmodium* não é capaz de desenvolver uma resposta imune esterilizante. Após sucessivas infecções, os indivíduos adquirem uma imunidade protetora, chamada premunção, que torna a parasitemia mais baixa e os sintomas da doença mais brandos (64). Tanto mecanismos da resposta imune inata quanto da resposta imune adaptativa são importantes para controlar a carga parasitária e proteger da doença. O tipo de resposta é dependente da fase do ciclo e da forma evolutiva que o parasito se apresenta, bem como de fatores individuais do hospedeiro como genética, estado nutricional e *status* imunológico.

O primeiro local de contato entre o parasito e o hospedeiro é a pele. Neste órgão são encontradas diversas células do sistema imune como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas e linfócitos (65). Logo após a picada do mosquito, é observada uma intensa migração de neutrófilos e, em seguida, de monócitos, para o local de infecção e para os linfonodos de drenagem. Aparentemente, a migração dessas células é um processo fisiológico que ocorre em situações de injúria tecidual e que não está diretamente relacionada à resposta imune a malária (65-67). As células de maior importância para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa são as células dendríticas. Elas são responsáveis pelo reconhecimento, fagocitose e apresentação de antígenos as células T nos órgãos linfoides, principalmente nos linfonodos de drenagem do local da picada e no baço (67).

Apesar de não ser um órgão linfóide, o fígado é reconhecido como um sítio alternativo para a ativação de células T CD4 e CD8. Esta habilidade está relacionada à sua arquitetura única e à presença de populações distintas de células apresentadoras de antígenos (APCs) (68-70). Além disso, hepatócitos infectados também são capazes de apresentarem antígenos as células T CD8 (65, 71). A resposta imune celular tem papel fundamental na proteção durante a fase pré-eritrocítica. Diversos estudos demonstram que as células T CD8 são capazes de atuar diretamente sobre hepatócitos infectados, liberando perforinas e granzimas, que provocam a lise celular e, conseqüentemente, a

destruição dos parasitos (72, 73). As células T CD4 ativadas auxiliam na produção de anticorpos e na diferenciação das células T CD8 citotóxicas (CTLs). Além disso, tanto as células T CD4 quanto as células T CD8 têm atuação indireta na eliminação de formas exoeritrocíticas através da produção de interferon gama (IFN- γ). Essa citocina é capaz de ativar a via de produção de óxido nítrico (NO) nos hepatócitos infectados, levando a morte do parasito (74, 75).

A resposta imune humoral também atua na proteção do hospedeiro durante a fase pré-eritrocítica. Os anticorpos produzidos nessa fase são capazes de inibir a infecção dos hepatócitos através da neutralização, opsonização e bloqueio da invasão dos esporozoítos. Nesse sentido, os anticorpos mais bem estudados são contra a proteína circunsporozoíta (CSP). Foi verificado que anticorpos anti-CSP são capazes de bloquear a infecção *in vitro* e *in vivo* (76-78). Além da CSP, uma grande variedade de proteínas da fase pré-eritrocítica apresentam potencial para desenvolverem uma resposta protetora. No entanto, essa proteção só é eficaz se altos títulos de anticorpos estiverem presentes o que só acontece após sucessivas exposições aos antígenos parasitários (76).

A fase eritrocítica da malária tem como característica principal os ciclos repetitivos de invasão, multiplicação e ruptura dos eritrócitos, liberando uma grande quantidade de produtos do parasito e debris celulares, o que provoca um processo inflamatório sistêmico e os sintomas da malária. O mecanismo mais básico de proteção nessa fase é a fagocitose de eritrócitos infectados por células mononucleares. A fagocitose pode ocorrer diretamente pela interação do receptor CD36 presente em monócitos e macrófagos com o eritrócito infectado ou ser facilitada pela ligação do complemento (C3b) ou de anticorpos (principalmente IgG1 e IgG3) as células parasitadas (66, 79). Os monócitos circulantes também podem ser ativados por merozoítos cobertos por anticorpos e passar a secretar fatores solúveis que inibem a divisão de parasitos nas células (80). Esse mecanismo de proteção é denominado inibição celular dependente de anticorpos (ADCI, do inglês *Antibody-Dependent Cellular Inhibition*) e é eficaz mesmo quando as concentrações de anticorpos são

baixas, em oposição aos níveis elevados de anticorpos necessários para a neutralização dos parasitos (66, 80).

Grande parte dos eritrócitos infectados é eliminada no baço. O baço é um órgão linfoide secundário importante para o desenvolvimento das respostas imunes inata e adaptativa e também para a fagocitose de eritrócitos senescentes, danificados ou infectados. O órgão é formado, basicamente, pela polpa branca que são áreas onde se concentram as células T e B, pela zona marginal onde são encontradas as células dendríticas e pela polpa vermelha onde se localizam os vasos sanguíneos (81, 82). A anatomia complexa do baço permite que a remoção das células parasitadas e o desenvolvimento da resposta imune ocorram simultaneamente. Na polpa vermelha, os macrófagos removem os eritrócitos opsonizados ou parasitados que perderam a capacidade de se deformar e atravessar os sinusóides esplênicos. Na zona marginal os antígenos parasitários são capturados pelas células dendríticas. Elas passam por um processo de maturação e migram para a polpa branca onde ativam as células T. Ainda na polpa branca, as células B iniciam a expansão clonal pelo estímulo das células T CD4 auxiliaadoras e das células dendríticas e, em seguida, migram para a polpa vermelha ou para a medula óssea onde passam a secretar anticorpos (83). Todo esse processo acontecendo simultaneamente causa modificações dramáticas no baço, sendo a característica mais marcante a esplenomegalia que é acompanhada por uma intensa desorganização tecidual, hiperplasia da polpa branca, migração de macrófagos e apoptose de linfócitos (84-86). A importância do baço no curso da malária é confirmada em estudos com pacientes esplenectomizados, nos quais foram observadas parasitemias mais altas, eliminação mais lenta dos parasitos circulantes após o tratamento e maior incidência de malária grave (87-89).

O elevado número de eritrócitos infectados na fase sanguínea da malária é responsável por uma intensa ativação do sistema imune. A produção precoce de IFN- γ por diferentes células está relacionada ao controle da infecção e ao direcionamento da resposta para o perfil do tipo 1 (Th1). Além das células T $\alpha\beta$, outras fontes importantes de IFN- γ que ainda não foram

citadas são as células $T\gamma\delta$ e as células *Natural Killer* (NK) (Figura 6) (90). As células $T\gamma\delta$ são linfócitos que apresentam receptores de células T (TCRs) formados por cadeias gama e delta e que podem reconhecer antígenos no contexto do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I e II ou diretamente, sem a necessidade do MHC, quando se tratam de antígenos não-peptídicos fosforilados (90). Considerando que os eritrócitos são células anucleadas e desprovidas de MHC de classe I e II, a importância das células $T\gamma\delta$ reside no fato de serem capazes de responder diretamente aos eritrócitos parasitados na ausência de células apresentadoras de antígenos. *In vitro*, foi demonstrado que as células $T\gamma\delta$ produzem $INF-\gamma$ na presença de eritrócitos infectados com *P. falciparum* (91-93). Em infecções experimentais, o número de células $T\gamma\delta$ aumenta no baço, no fígado e no sangue periférico dos camundongos infectados e parece haver um papel protetor dessas células na malária já que a depleção delas com anticorpos prejudica a eliminação do parasito (94). Já as células NK são linfócitos granulares derivados de precursores da medula óssea que são ativados em resposta as citocinas produzidas por macrófagos e células dendríticas (IL-12, IL-18, $INF-\alpha$ e $INF-\beta$). Elas atuam sobre células infectadas através da exocitose de grânulos, principalmente perforinas e granzimas (95, 96). Além da atividade citotóxica, as células NK são poderosas produtoras e secretoras de citocinas e quimiocinas, principalmente o $INF-\gamma$ na presença de eritrócitos parasitados (Figura 6) (97, 98).

Como mencionado anteriormente, a ativação dos fagócitos e das células da imunidade inata no baço e nos órgãos linfóides periféricos induz a produção das citocinas pró-inflamatórias como $INF-\gamma$, IL-12, $TNF-\alpha$, IL-6 e IL-1 ao mesmo tempo que antígenos do parasito são processados e apresentados para as células T CD4 e CD8. As células T CD4 *naive* se diferenciam em células T CD4⁺ efectoras auxiliaadoras do tipo 1 (Th1) pelo estímulo do $INF-\gamma$ e da IL-12 e passam a produzir mais $INF-\gamma$, intensificando a síntese de NO e $TNF-\alpha$ nos macrófagos responsáveis pelo controle inicial da parasitemia. As formas eritrocíticas também são capazes de ativar outro tipo de célula T CD4⁺ auxiliadora que produz pouco ou nenhum $INF-\gamma$. Essas células, produtoras de

IL-4 e denominadas Th2, são importantes para a ativação das células B e para a produção de anticorpos que completam o processo de eliminação dos parasitos. Contudo, outros perfis de células CD4 auxiliaadoras podem estar envolvidos na resposta imune à malária visto que essas células exibem certa multifuncionalidade e plasticidade fenotípica (99-102). Células CD4⁺ produtoras de IL-17 (Th17) e de IL-22 (Th22), por exemplo, já foram verificadas em infecções com plasmódio, mas os seus papéis no curso da doença ainda não foram completamente definidos (103, 104).

Para que a resposta à malária seja eficiente, é necessário que haja um balanço entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias de forma que a infecção seja resolvida sem que ocorram danos ao hospedeiro. As citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , por exemplo, são pirógenos endógenos que induzem febre no centro regulador da temperatura, causam supressão da hematopoiese e anemia (105-107). TNF- α também induz a expressão de moléculas de adesão no endotélio e em leucócitos explicando, em parte, outro mecanismo patológico da doença, a citoadesão (108). A regulação da resposta imune na malária ocorre principalmente pela produção de IL-10. Essa citocina é capaz de suprimir a apresentação de antígenos e a ativação das células T pela regulação negativa do MHC de classe II e de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) em células dendríticas e macrófagos. A IL-10 também inibe diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- α , e quimiocinas (109). Inicialmente, a IL-10 foi descrita como um fator produzido pelas células Th2 para regular a produção de citocinas das células Th1. Posteriormente, foi verificado que quase todas as células do sistema imune inato e adaptativo são capazes de produzir IL-10, incluindo macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células NK, eosinófilos, neutrófilos, células B, células T CD8⁺ e células T CD4⁺ dos tipos Th1, Th2, Th17, T reguladoras (Tregs) e T reguladoras do tipo 1 (Tr1) (109, 110).

Algumas células Th1 efectoras IFN- γ ⁺ tem a capacidade de se autorregular através da produção de IL-10, prevenindo, desta forma, a resposta pró-inflamatória exagerada. Em infecções com *P. falciparum*, foi verificada uma frequência mais elevada dessas células em crianças com

malária não complicada do que em crianças com malária grave, indicando que essas células podem ter um papel relevante na regulação da inflamação (111). Também foi observado um resultado semelhante em camundongos, nos quais as células T efectoras produtoras de IL-10 estão relacionadas com a regulação da imunopatologia associada à infecção com *P. chabaudi* (109, 112). As células T reguladoras, por outro lado, são uma subpopulação de células T CD4⁺ com atividade supressora que apresentam a cadeia alfa do receptor da IL-2 (CD25) e o fator de transcrição Foxp3. Elas podem ser classificadas em células T reguladoras naturais (nTregs) ou T reguladoras induzidas (iTregs). As primeiras são produzidas no timo e expressam níveis elevados de CD25 e Foxp3, enquanto as últimas se desenvolvem na periferia na presença de antígenos e das citocinas TGF- β , IL-4 e IL-10 (109). Alguns trabalhos verificaram o aumento de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em infecções humanas com *P. falciparum* e *P. vivax* (113, 114) e em infecções experimentais com *P. yoelii* (115, 116), *P. berghei* (117) e *P. chabaudi* (112, 118). Contudo, o papel das células Tregs na malária ainda é controverso. De uma forma geral, elas parecem estar envolvidas na redução da inflamação excessiva mas também no aumento da parasitemia (109). As células Tr1, ao contrário, não expressam constitutivamente o fator de transcrição Foxp3. Elas podem ser induzidas na periferia pelo estímulo de antígenos na presença de IL-10. O principal mecanismo de regulação dessas células está relacionado com a produção de IL-10 e TGF- β , mas também podem atuar através da secreção de granzima B e perforina (109, 119). As células Tr1 já foram observadas na malária humana e murina, mas sua importância no curso da doença ainda não foi bem caracterizada (109).

Células B reguladoras (Bregs) são igualmente capazes de modular a função das células T efectoras. Essas células são, na verdade, um grupo heterogêneo de células B capazes de suprimir direta ou indiretamente a resposta inflamatória através da secreção de IL-10, TGF- β , IL-17 e IL-35 (120, 121). Além disso, a IL-10 produzida pelas Bregs é importante para a geração e manutenção das células Tregs e Tr1 (122). O efeito imunorregulador das Bregs é bastante estudado em doenças autoimunes, mas na malária o papel dessas células na imunopatologia da doença ainda é incerto. Experimentalmente foi

demonstrado que a infecção com *P. berghei* ANKA induz a expansão das células Bregs em camundongos C57BL/6 e que a transferência dessas células protege contra a malária cerebral, aumentando a sobrevivência dos animais (123).

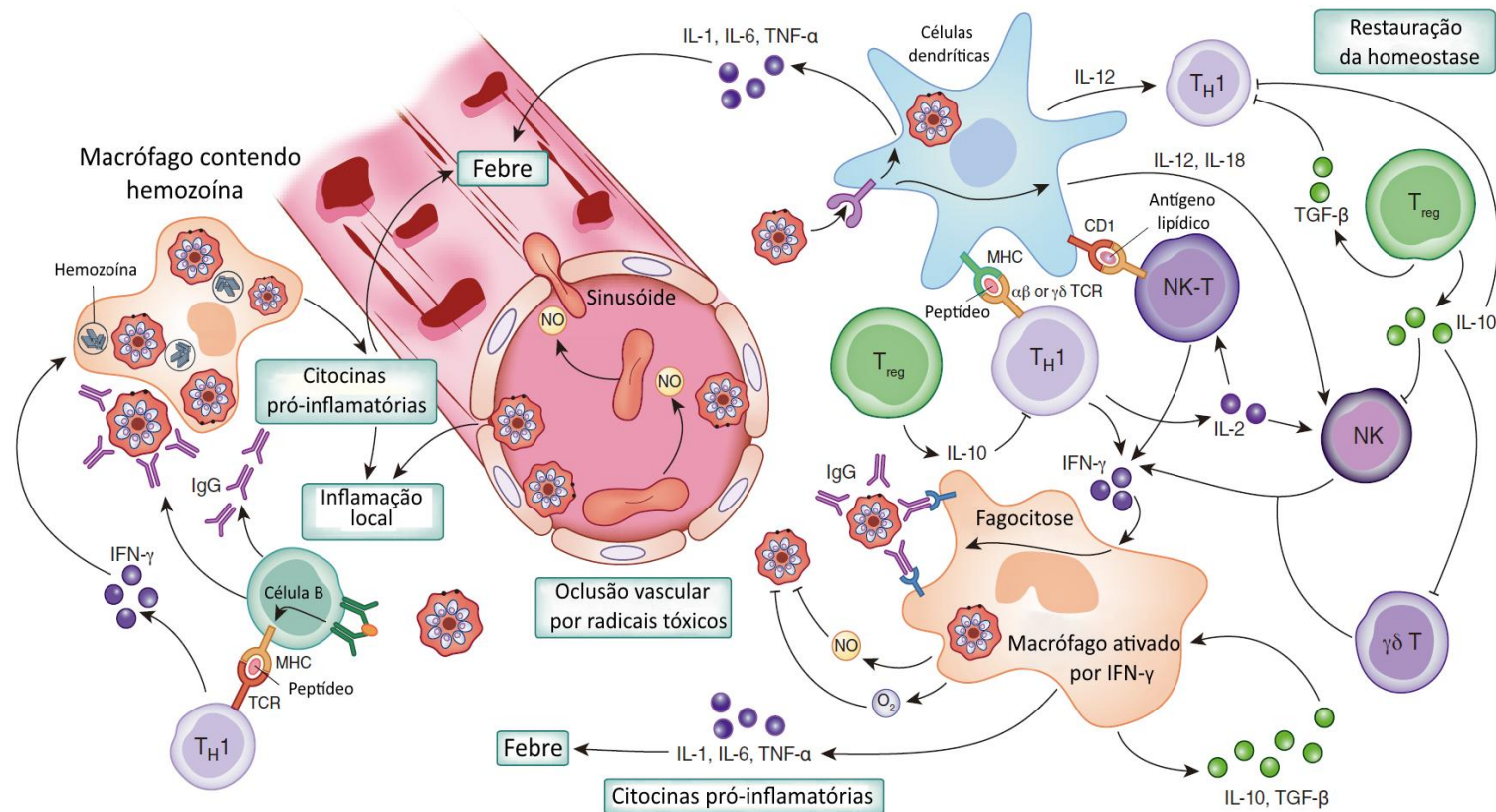


Figura 6 - Resposta imune na fase eritrocítica da malária. Parasitos e células infectadas ativam as células dendríticas e os antígenos são apresentados para as células T. A ativação dessas células leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias que levam a polarização para o perfil Th1. Macrófagos ativados por IFN- γ fagocitam parasitos opsonizados e os eliminam através da produção de NO. A inflamação excessiva é controlada por células reguladoras que produzem IL-10 e TGF- β . Adaptado de Riley & Stewart, 2013 (124).

1.6 Uso de modelos experimentais na malária

Apesar do gênero *Plasmodium* infectar uma gama de animais, cada espécie está restrita a um ou poucos hospedeiros. Os plasmódios que infectam o homem, por exemplo, são capazes de infectar naturalmente alguns outros primatas, como gorilas e chimpanzés, e, em determinadas circunstâncias, macacos do Novo Mundo dos gêneros *Aotus* e *Saimiri* (125, 126). Contudo, o alto custo de manutenção e as dificuldades no manejo desses animais reduzem a utilidade prática desses modelos. Por esse motivo, a maior parte dos trabalhos de infecção experimental é realizada em camundongos.

Os modelos experimentais murinos para o estudo da malária têm sido utilizados há décadas e vêm contribuindo para o entendimento de aspectos da biologia do parasito, da resposta imune do hospedeiro e da patogênese da doença. A primeira espécie de plasmódio encontrada em roedores, *P. berghei*, foi descrita por Vincke e Lips em 1948 (127). Nos anos seguintes, outras espécies também foram identificadas e adaptadas para estudos em laboratório: *P. vinckei* (Rodhain 1952), *P. chabaudi* (Landau 1965) e *P. yoelii* (Landau e Chabaud 1965) (128-130). Dependendo da espécie/cepa de plasmódio e da linhagem de camundongos empregada na infecção experimental, o curso e o desfecho da malária são diferentes (Tabela 1). Em relação à virulência, alguns parasitos causam infecção letal em todas as linhagens de camundongos; outros são letais apenas para determinadas linhagens; e há ainda aqueles que não são letais em nenhuma linhagem de camundongo, desde que o animal seja imunologicamente competente (125, 131). Nas infecções não letais, após a resolução da doença, os camundongos costumam apresentar imunidade protetora a uma segunda infecção com a mesma cepa ou espécie, mas não contra um parasito heterólogo (131). Por esse motivo, os trabalhos que têm como objetivo desvendar os mecanismos imunes e sua regulação são realizados em modelos não letais, sendo as espécies *P. chabaudi* e *P. yoelii* as mais utilizadas com essa finalidade (132, 133). Também existem modelos bem estabelecidos para o estudo de algumas complicações como malária cerebral, malária gestacional, anemia, doença aguda pulmonar, entre outras (Tabela 1).

Em camundongos, as infecções não letais são caracterizadas por uma doença transitória, com cura espontânea, na qual os animais apresentam emagrecimento, hepatoesplenomegalia, hipotermia, piloereção, anemia e hipoglicemia (132, 133). Essas manifestações estão relacionadas à resposta imune do hospedeiro frente ao aumento gradual da parasitemia e tendem a diminuir com a redução do número de parasitos circulantes. As infecções letais, ao contrário, cursam com um aumento súbito da parasitemia, que não consegue ser controlada pela resposta imune do animal, e que culmina na morte em poucos dias (134). Além da combinação entre linhagem do camundongo, espécie e cepa do parasito, outros fatores interferem no desfecho da infecção. Camundongos fêmeas, por exemplo, costumam ser mais resistentes do que os machos (132, 135). A idade do animal no momento da infecção é outro fator relevante. Foi observado que camundongos mais novos apresentam uma maior taxa de mortalidade do que os animais mais velhos, provavelmente, devido à imaturidade do sistema imune (136). Aspectos nutricionais (137-139) e infecções concomitantes (140-142) também são fatores capazes de alterar o curso da doença.

A principal vantagem dos modelos experimentais murinos é a possibilidade de realizar a infecção em condições controladas. Ela pode ocorrer de duas formas: utilizando os esporozoítos ou as formas sanguíneas do parasito. No caso dos esporozoítos a infecção pode ser feita naturalmente através da picada de mosquitos infectados ou pela injeção dos parasitos por via intradérmica ou intravenosa. A infecção utilizando as formas sanguíneas é mais comumente empregada. Nela, hemácias parasitadas de um animal doador são inoculadas por via intravenosa ou intraperitoneal, estabelecendo a infecção sem a ocorrência do ciclo exoeritrocítico (143). O ciclo biológico dos plasmódios de roedores na fase sanguínea dura aproximadamente 24h, enquanto o ciclo dos parasitos humanos leva de 48 a 72h (125). A malária murina também diverge da malária humana nos seguintes aspectos: altas parasitemias (muito maiores do que as parasitemias humanas, mesmo em infecções graves); hipotermia ao invés de febre; sequestro de hemácias parasitadas principalmente no fígado e ausência de hipnozoítos (132, 143). Apesar dessas diferenças, a resposta imune de camundongos e humanos à

malária são similares. Foi observado, por exemplo, que em ambos os casos é desenvolvida uma resposta do tipo Th1 seguida por uma resposta do tipo Th2 e a produção de anticorpos (101, 132). Adicionalmente, a manipulação da resposta imune em animais geneticamente modificados permite a incriminação de determinados receptores ou mediadores na proteção ou suscetibilidade à malária (143). Além disso, órgãos e tecidos afetados são de fácil acesso e fornecem material para os mais diversos tipos de estudos.

Tabela 1 - Infecção por *Plasmodium* spp. em diferentes linhagens de camundongos

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

Adaptado de Zuzarte et al., 2014 (143) e Li *et al.*, 2001 (131).

1.7 Leishmanioses: aspectos gerais

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos aos mais diversos tipos de animais, como cães, roedores, marsupiais e seres humanos, através da picada de dípteros dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomya* (Novo Mundo). Aproximadamente 53 espécies de *Leishmania*, distribuídas em 5 subgêneros e complexos (*Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, complexo *L. enriettii* e *Paraleishmania*) foram descritas. Dessas, 31 espécies parasitam mamíferos e 20 espécies são patogênicas para o homem (144). As leishmanioses são doenças com amplo espectro clínico e são classificadas em cutâneas (ou tegumentares) e viscerais (145).

A leishmaniose é uma doença bastante antiga. Há evidências arqueológicas que indicam que civilizações ancestrais sofriam tanto da forma cutânea quanto da forma visceral da doença. O relato mais antigo de lesões semelhantes àquelas encontradas na leishmaniose cutânea datam de 2.500 anos a.C. e há evidências da infecção por *L. donovani*, causadora de leishmaniose visceral, em múmias egípcias de cerca de 1.500 anos a.C. (144). Apesar disso, apenas em 1903 os parasitos causadores da doença foram descritos por William Boog Leishman (146). Ele havia identificado estruturas semelhantes a parasitos do grupo dos tripanossomatídeos no baço de um soldado em Dum-dum, na Índia, que tinha sido vítima da doença conhecida localmente como Kala Azar (febre negra) (146, 147). No mesmo ano, Ronald Ross confirmou a descoberta do novo parasito e sugeriu o nome *Leishmania* ao novo gênero (148). A partir daquele momento, uma série de espécies foram descobertas causando as formas viscerais e cutâneas da doença, o que tornou a classificação e a validação das espécies de *Leishmania* um assunto de constante debate na comunidade científica (149).

1.8 Classificação das leishmanioses

As leishmanioses são classificadas de acordo com a apresentação clínica em cutâneas (ou tegumentares) e viscerais (Tabela 2). A forma cutânea

é a mais comum. Ela é caracterizada por lesões na pele, a maioria apresentando úlceras, que são localizadas nas partes expostas do corpo. Devido às diferenças na distribuição geográfica das espécies de *Leishmania*, epidemiologia e manifestações clínicas, as leishmanioses cutâneas são divididas em Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A leishmaniose cutânea do Velho Mundo é causada pelas espécies: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. donovani*. Normalmente, as infecções por essas espécies cursam de forma benigna. As lesões são únicas, não-complicadas, e, frequentemente, curam espontaneamente (145). A leishmaniose cutânea do Novo Mundo, por outro lado, possui um espectro de manifestações clínicas mais amplo que está relacionado a maior diversidade de espécies de *Leishmania* encontradas nessa região. As apresentações clínicas incluem as formas localizada, disseminada, difusa e mucocutânea.

A forma cutânea localizada é responsável pela maioria dos casos de LTA. Ela é causada por uma série de espécies dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, sendo esta última menos frequentemente associada a forma cutânea da doença (145). A lesão típica, e mais comumente encontrada, é uma úlcera na pele com borda elevada em moldura, fundo avermelhado e com granulações grosseiras, podendo ou não ser acompanhada de linfadenopatia regional ou linfangite patente. A lesão surge no local onde originalmente ocorreu a picada do flebotomíneo infectado e evolui da seguinte maneira: primeiro, se forma uma pápula eritematosa que se torna firme e que, em seguida, sofre ulceração. Os pacientes com essa forma clínica respondem bem ao tratamento específico. O curso da infecção normalmente é benigno e, mesmo os pacientes não tratados, apresentam tendência à cura espontânea após meses de evolução (145, 150).

A forma disseminada é mais rara, sendo caracterizada pelo aparecimento de várias lesões papulosas, ulceradas ou acneiformes distribuídas pelo corpo e associadas a infecção por *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (145). Ela se inicia com uma ou várias lesões localizadas com as características clássicas de úlceras com

fundo granulomatoso e bordas elevadas. Pouco tempo depois, ocorre disseminação do parasito por via linfática ou pela circulação sanguínea para outras regiões do corpo. Começam, então, a aparecer úlceras em locais distantes e não relacionados com o local da picada do vetor (150, 151). Frequentemente, a forma disseminada da doença é encontrada em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (150).

A leishmaniose cutânea difusa é uma forma rara e grave. Ela ocorre em pacientes anérgicos com deficiências específicas na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Se inicia com uma lesão única, que não responde ao tratamento, e que evolui de forma arrastada com formação de placas infiltradas e múltiplas nodulações não-ulceradas, que recobrem grandes extensões da pele. É causada pela espécie *L. amazonensis* e *L. mexicana* (145, 150, 151).

A leishmaniose mucocutânea geralmente é causada pela infecção com *L. braziliensis* ou *L. panamensis*, sendo a maioria dos casos registrados na Bolívia, Brasil e Peru (145). Ela tem como principal característica lesões destrutivas localizadas na mucosa das vias áreas superiores. Essas lesões associadas à intensa resposta inflamatória têm como consequência mais grave a deformação e a mutilação da face. A maioria dos casos de leishmaniose mucocutâneas são secundários à lesão cutânea localizada. Acredita-se que a disseminação da pele para as mucosas ocorra através da circulação sanguínea ou pelo sistema linfático e, menos frequentemente, pelo contato entre a lesão cutânea e a mucosa quando essas estão em proximidade. Outra possibilidade é que a forma mucocutânea ocorra de forma primária quando a picada do inseto vetor se dá diretamente na mucosa afetada (150). Mais recentemente, a descoberta de um vírus que infecta leishmânias, o *Leishmania* RNA Virus (LRV) 1 e 2, levantou a possibilidade das lesões mucosas serem causadas, na verdade, pela intensa resposta inflamatória do hospedeiro aos ácidos nucleicos liberados pelo vírus. Diferentes espécies de leishmânias já foram encontradas infectadas por esse vírus, incluindo, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. amazonensis* e *L. lainsoni*, e foi verificado uma associação entre a infecção pelo vírus e o maior risco de desenvolvimento de lesões mucosas tanto em modelos experimentais quanto em humanos (152-156).

A leishmaniose visceral (ou calazar) é a forma mais grave da doença, podendo ser fatal caso não seja tratada. Os principais sintomas são febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e perda de peso (157). As espécies de leishmânias que causam essa forma clínica têm tropismo por fagócitos mononucleares de órgãos internos como fígado, baço, medula óssea e linfonodos (157). No Velho Mundo, a leishmaniose visceral é causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* enquanto no Novo Mundo é causada apenas por *L. infantum* (145). Após o tratamento e aparente cura clínica, a leishmaniose visceral pode evoluir para uma forma cutânea conhecida como leishmaniose cutânea pós-calazar (PKDL). Ela é caracterizada por lesões maculares hipopigmentadas ou eritomasas espalhadas por todo o corpo que podem se transformar em lesões papulares ou nodulares infiltrativas, especialmente no rosto. Essa apresentação clínica é comum em áreas endêmicas para *L. donovani* (145).

Tabela 2- Principais espécies de *Leishmania* causadoras de doença humana

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

Adaptado de Controle da Leishmaniose – Organização Mundial da Saúde, 2010 (145) e Kaye & Scott, 2011(158).

1.9 Leishmaniose no mundo

Nos últimos anos, a área de distribuição e o número de casos de leishmaniose registrados aumentou consideravelmente. Os fatores que contribuem para a expansão da doença incluem questões socioeconômicas, desnutrição, mudanças climáticas, aumento da migração, conflitos armados, imunossupressão (como a causada pelo HIV), e, em alguns casos, a rápida urbanização e o estabelecimento de novos assentamentos humanos (145, 159,

160). Atualmente, a leishmaniose é endêmica em mais de 98 países e territórios (161). A OMS estima que ocorram cerca de 1,3 milhões de casos de leishmaniose a cada ano. Destes, 1 milhão são de leishmaniose cutânea e 300 mil de leishmaniose visceral. Já o número de mortes causadas pela leishmaniose visceral varia de 20 a 50 mil anualmente (159).

A leishmaniose cutânea tem ampla distribuição mundial. No continente americano há registro de casos desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, com exceção do Chile e do Uruguai (Figura 7). A epidemiologia da LTA é complexa, com espécies de *Leishmania*, ciclo de transmissão, reservatórios, vetores, manifestações clínicas e resposta terapêuticas diferentes. Aproximadamente 95% de todos os casos de leishmaniose cutânea do mundo estão concentrados em apenas seis países, dentre eles, o Brasil e a Colômbia, localizados no continente americano. Além disso, a maioria dos casos da forma mucosa registrados no mundo estão concentrados em apenas três países - Bolívia, Brasil e Peru - demonstrando a importância da região no cenário mundial da doença (162).

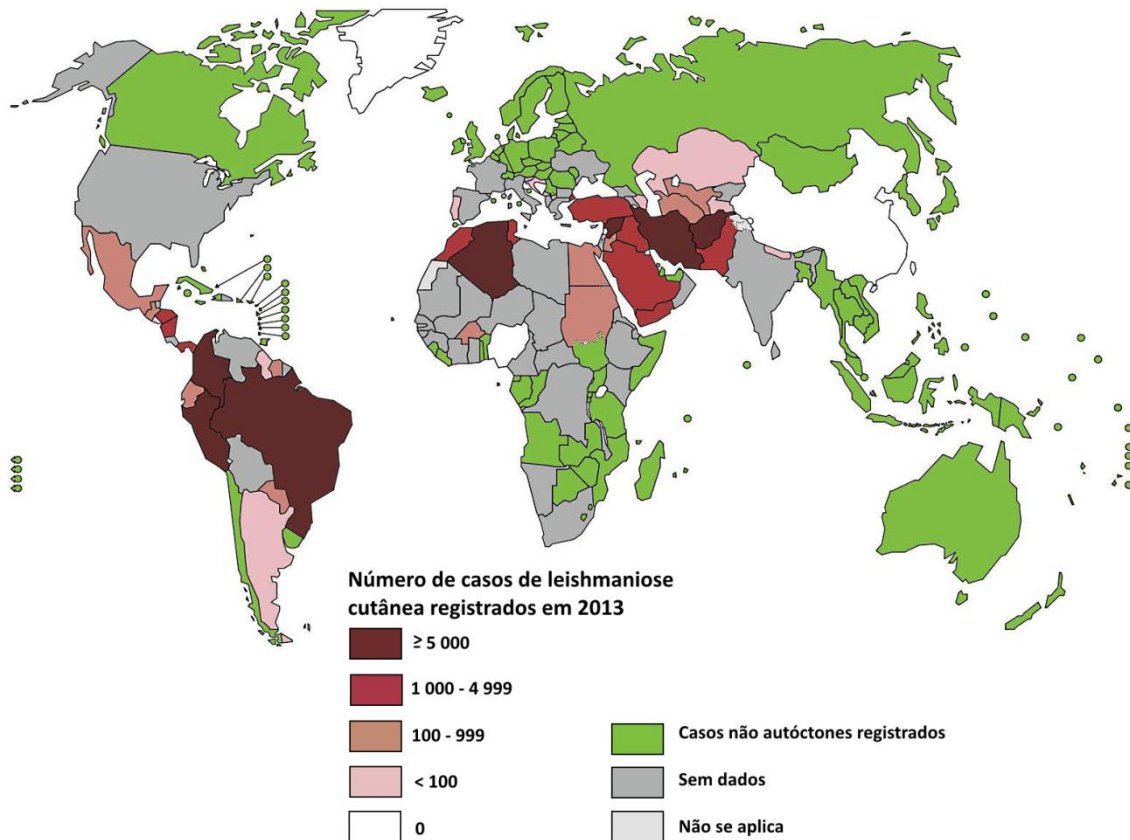


Figura 7- Distribuição mundial da leishmaniose cutânea em 2013. Fonte: Organização Mundial da Saúde (162).

1.10 Leishmaniose cutânea no Brasil

A leishmaniose cutânea ocorre em todo o Brasil, sendo 7 espécies responsáveis pela infecção humana: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindendergi* e *L. shawi* (150, 163). *L. braziliensis* foi a primeira espécie descrita e incriminada como agente etiológico da LTA no Brasil. Ela é encontrada em todos os estados e é responsável pela maioria dos casos registrados no país. *L. amazonensis* também tem uma ampla distribuição no território brasileiro. Ela é encontrada principalmente em florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal, mas também em alguns estados da região Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul. *L. guyanensis* está distribuída em alguns estados da região Norte, sobretudo em áreas de floresta que não alagam no período de chuvas. As espécies *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L.*

lindenbergi e *L. shawi* foram identificadas há menos tempo em estados do Norte e Nordeste e têm menor importância epidemiológica (Figura 8) (150, 163-166).

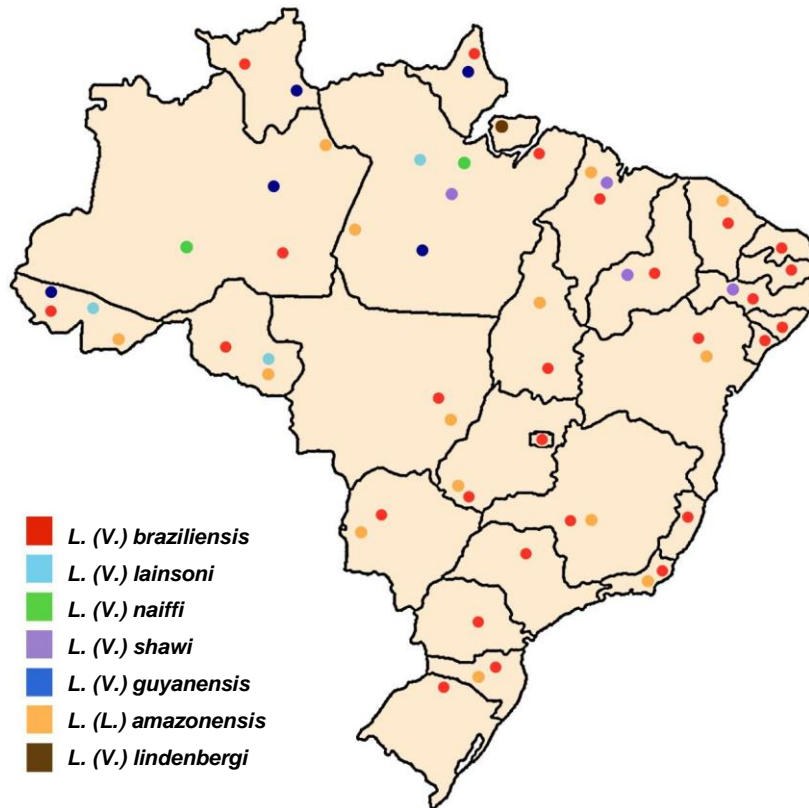


Figura 8- Distribuição de espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil. Fonte: Ministério da Saúde, 2007 (150).

O primeiro registro da leishmaniose cutânea no Brasil foi feito por Moreira em 1895, mas a confirmação só ocorreu em 1909 quando Lindenberg encontrou parasitos em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamento em São Paulo. A forma mucocutânea foi identificada alguns anos depois, em 1911, por Splendore, sendo o parasito causador da doença denominado *L. braziliensis* por Gaspar Vianna. Os vetores só foram conhecidos em 1922, quando Aragão demonstrou o papel dos flebotomíneos na sua transmissão (150).

No Brasil a LTA era considerada uma zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente indivíduos que adentravam as florestas. Posteriormente, a doença passou a ocorrer também em zonas rurais, em áreas desmatadas e, mais recentemente, também em regiões periurbanas às quais os vetores foram capazes de se adaptar (150, 167). Apesar dos esforços do Ministério da Saúde no controle das leishmanioses, o número de casos registrados não vêm apresentando reduções significativas nos últimos anos. Com isso, o Brasil continua a ser um dos países com o maior número de leishmaniose cutânea do mundo. Em 2014, foram registrados cerca de 20 mil casos da doença, a maioria proveniente da região norte (10.387), seguida da região nordeste (4.969), centro-oeste (3.038), sudeste (1.460) e sul (373) (168).

1.11 Ciclo biológico de *Leishmania* sp.

As leishmânias são parasitos com ciclo de vida heteroxeno, alternando entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Figura 9). Os hospedeiros vertebrados são os mais diversos tipos de mamíferos incluindo animais domésticos (como cães, gatos e cavalos), animais silvestres (roedores, em sua maioria, mas também tatus, preguiças, tamanduás, morcegos, marsupiais, primatas e canídeos silvestres) e o homem (150, 169-171). Já os hospedeiros invertebrados são dípteros psicodídeos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomya*, no novo mundo. O parasito se apresenta sob duas formas evolutivas principais: a forma flagelada denominada promastigota encontrada no inseto vetor e a forma amastigota desprovida de flagelo e encontrada no interior de células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado.

O ciclo se inicia quando flebotomíneos fêmeas infectadas regurgitam durante o repasto sanguíneo as formas infectantes no hospedeiro vertebrado (Figura 9). Para que isso aconteça, o aparelho bucal do inseto dilacera o tecido e os vasos superficiais da pele, formando um pequeno hematoma do qual o inseto se alimenta e onde são depositadas as promastigotas metacíclicas (172, 173). A saliva dos flebotomíneos é composta por diversas proteínas que exercem funções importantes para a alimentação do inseto e também para a

infecção com *Leishmania*. Já foi demonstrado que componentes da saliva são capazes de inibir a coagulação sanguínea, tem efeito vasodilator e modulam a resposta de células T e de células apresentadoras de antígeno além de induzir a apoptose de neutrófilos (172, 174). Desta forma, a picada dos flebotomíneos, por si só, é capaz de provocar uma intensa resposta inflamatória com migração células para o local da infecção (175).

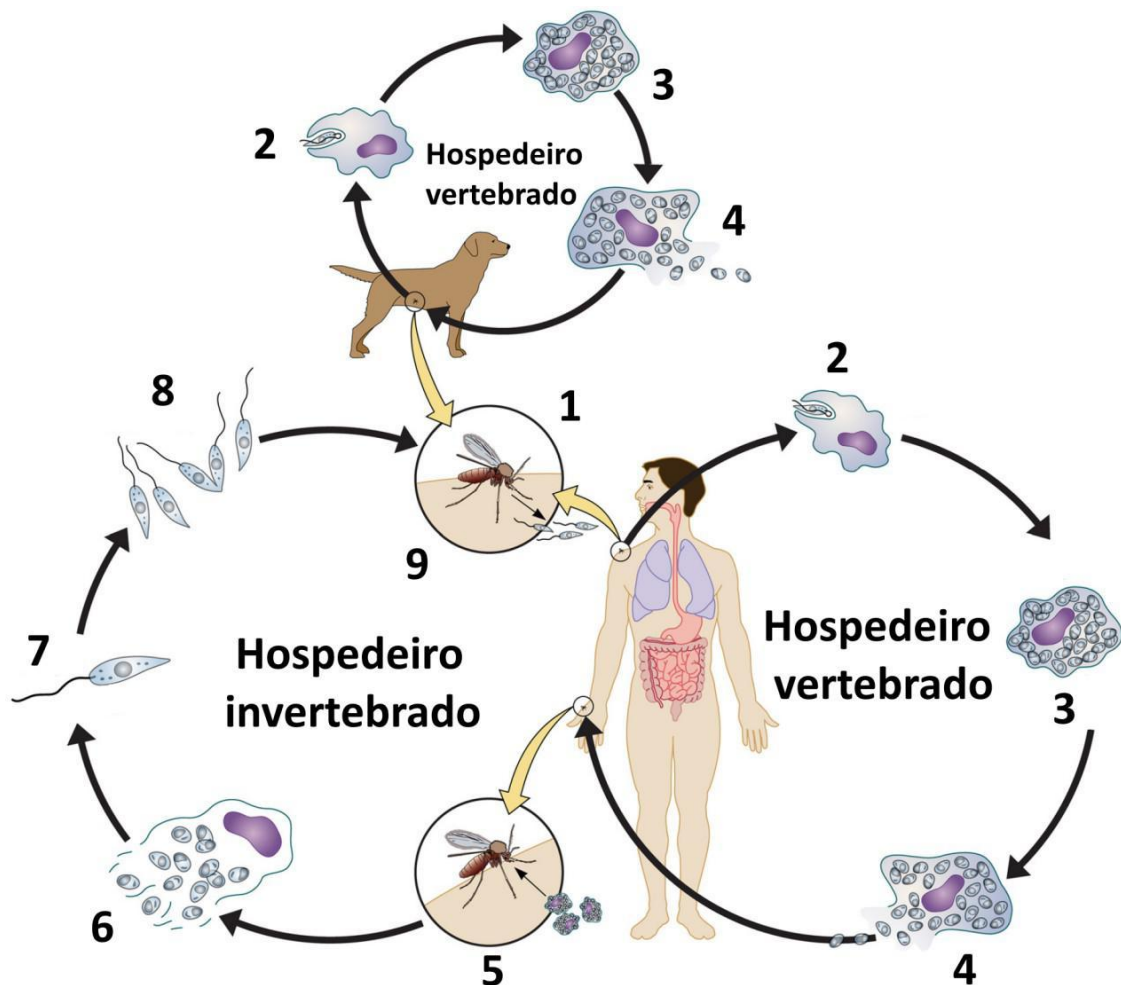


Figura 9- Ciclo biológico de *Leishmania* sp. nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. 1) Flebotomíneos fêmeas infectados transmitem as formas promastigotas metacíclicas para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. 2) As promastigotas são fagocitadas por neutrófilos, monócitos, células dendríticas e macrófagos. 3) Nos macrófagos, se transformam em amastigotas e começam a se multiplicar no interior do vacúolo parasitóforo. 4) Os macrófagos parasitados se rompem ou entram e apoptose e as amastigotas liberadas infectam outras células. 5) Flebotomíneos fêmeas ingerem macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo. 6) As amastigotas são liberadas no intestino do inseto. 7) As amastigotas transformam na promastigotas. 8) As promastigotas se multiplicam e se desenvolvem até a forma promastigota metacíclica (infectante para o homem, animais domésticos e silvestres). 9) As promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do inseto vetor. Adaptado de Esch & Petersen, 2013 (176).

Na pele, as formas metacíclicas tem pouca motilidade e são rapidamente fagocitadas pelos neutrófilos recém-chegados. O papel dessas células durante a infecção por *Leishmania* ainda não está bem esclarecido, mas já foi observado que o parasito é capaz de retardar a morte programada desses fagócitos em até 24h, favorecendo a sua sobrevivência até que um número suficiente de macrófagos e células dendríticas migrem até o local da infecção (177). Apesar de conseguirem sobreviver no interior de neutrófilos, os parasitos não são capazes de se desenvolverem em formas amastigotas para dar continuidade ao ciclo (178). Desta forma, os neutrófilos que entraram em contato, mas que não foram eficazes na eliminação das leishmânias, atuam auxiliando na infecção das células-alvo, os macrófagos, de duas maneiras: 1) os neutrófilos infectados entram em apoptose e são fagocitados pelos macrófagos; 2) os parasitos escapam dos neutrófilos em apoptose antes de infectarem os macrófagos (179, 180) (Figura 10).

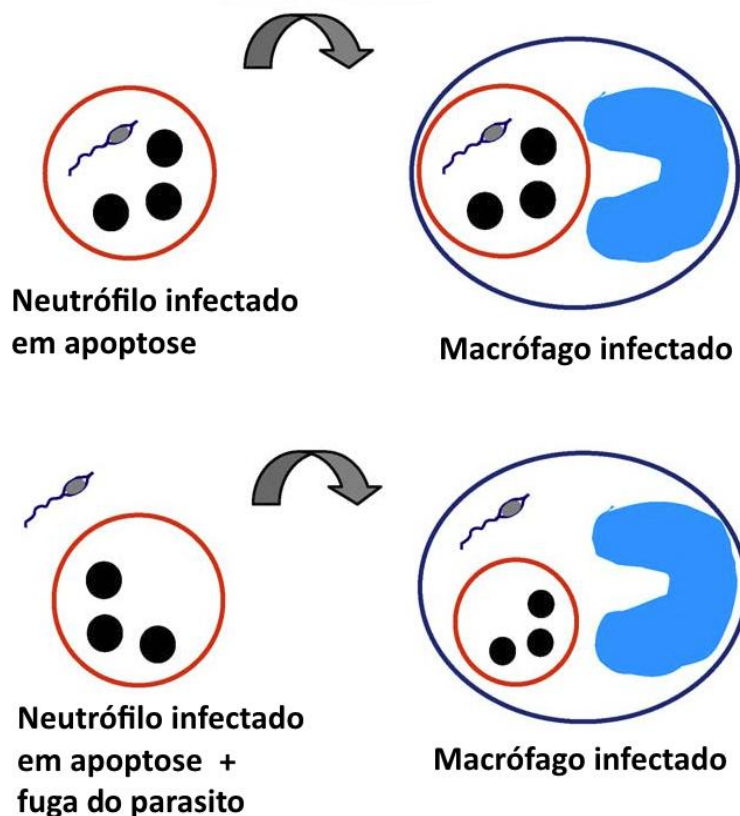


Figura 10- Possibilidades de infecção de macrófagos com *Leishmania* através da interação com neutrófilos. Os neutrófilos que entram em apoptose, ao serem fagocitados, levam para o interior dos macrófagos os parasitos ou as leishmânias deixam os neutrófilos em apoptose antes da fagocitose pelos macrófagos e depois os infectam. Adaptado de Ritter *et al.*, 2009 (181).

Além dos neutrófilos, as células dendríticas e os monócitos também são capazes de fagocitar as leishmânias inoculadas pelos flebotomíneos. Algumas dessas células já estão presentes na pele e outras são atraídas pelo estímulo inflamatório da picada do inseto vetor (158, 182). As células dendríticas tem um papel importante na resposta imune, pois são capazes de migrar até os linfonodos de drenagem e apresentar antígenos do parasito para células T dando início a resposta adaptativa (179, 182).

Contudo, a maior parte das leishmânias são fagocitados por macrófagos (183). A interação inicial com a célula-alvo ocorre pelo flagelo e o parasito utiliza a maquinaria fagocítica celular para se ligar a membrana e ser

internalizado sem gasto energético (179, 184, 185). Diferentes receptores presentes na membrana do macrófago já foram identificados nesse processo, incluindo os receptores de complemento (CR) do tipo 1 e 3, receptores manose, receptores de fibronectina e de fração Fc dos anticorpos (186). Dependendo do tipo de receptor utilizado, o curso da infecção pode ocorrer de maneira diferente (182, 186). A entrada do parasito via CR1 e CR3, por exemplo, inibe a inflamação e a explosão oxidativa, favorecendo a sobrevivência do parasito, enquanto a entrada pelo receptor manose facilita a liberação de enzimas hidrolíticas (186).

Depois do reconhecimento na superfície do macrófago, as leishmânias são internalizadas em fagossomos que se fundem com lisossomos e endossomos e dão origem aos fagolisossomos ou vacúolos parasitóforos. Esses vacúolos apresentam morfologia diferente de acordo com a espécie de leishmânia envolvida na infecção. Alguns são grandes e possuem vários parasitos como os de *L. amazonensis* e os de *L. mexicana*, outros são pequenos e contém um único parasito como os de *L. major* e *L. donovani* (182, 186, 187). Apesar disso, os vacúolos parasitóforos possuem características em comum. Todos são compartimentos ácidos que contém enzimas lisossomais e que são envolvidos por uma membrana rica em proteínas lisossomais/endossomais tardias - rab7p, macrosialina (CD68), proteína associada à membrana do lisossomo 1 (LAMP-1), LAMP-2 e H⁺ ATPase vacuolar - e moléculas apresentadoras de antígenos (MHC de classe II e H-2M) (179, 187). É nesse local que o parasito se instala e se transforma em amastigota. Acredita-se que a fusão do lisossomo ao fagossomo e a acidificação do vacúolo parasitóforo juntamente com a mudança de temperatura do inseto vetor para o mamífero hospedeiro, sejam os estímulos que desencadeiam o processo de diferenciação da forma promastigota metacíclica para amastigota no interior do macrófago (179, 182). As amastigotas se multiplicam no interior do vacúolo parasitóforo por divisão binária e quando a célula fica repleta de parasitos, ela se rompe ou entra em apoptose (183). As amastigotas liberadas são, então, fagocitadas por outros macrófagos, dando continuidade a infecção.

Ao se alimentarem do sangue de mamíferos infectados, os flebotomíneos ingerem monócitos e macrófagos contendo amastigotas. Durante a digestão, as amastigotas são liberadas no intestino do vetor (Figura 11). A diminuição da temperatura e o aumento do pH são os estímulos que induzem a mudança da forma amastigota para promastigota. Primeiramente, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, que são formas que apresentam um pequeno flagelo na porção anterior e tem pouca motilidade. Esta primeira forma replicativa se desenvolve ainda em meio ao sangue ingerido pelo flebotomíneo e está separada fisicamente da parede do intestino pela matriz peritrófica. Depois de 48 a 72 horas, os parasitos começam a se replicar mais lentamente e a se diferenciarem em formas mais móveis denominadas nectomônadas (188). Estas formas são capazes de escapar da matriz peritrófica e de aderir nas células epiteliais do intestino médio através do flagelo. A localização precisa do parasito no intestino vai depender do subgênero de *Leishmania* estudado. O subgênero *Viannia* entra pelo intestino posterior e depois migra para o intestino médio, sendo chamados, por esse motivo, de parasitos peripilários. Já o subgênero *Leishmania* se desenvolve diretamente no intestino médio, sendo chamados de suprapilários (189). As nectomônadas se transformam em formas leptomônadas que iniciam o segundo ciclo de replicação do parasito. Na válvula do intestino anterior, mais duas formas de promastigotas são encontradas: as haptomônadas e as metacíclicas. As formas haptomônadas são parasitos em forma de folha que possuem flagelos curtos e que funcionam como ponte para outros parasitos e a válvula do intestino anterior ou estomodeu. As promastigotas metacíclicas são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado e se desenvolvem a partir das leptomônadas. Essas formas são menores e mais delgadas do que as demais e possuem flagelo longo que permite que o parasito tenha grande mobilidade. A obstrução e a destruição da válvula do estomodeu pelos parasitos faz com que o sangue ingerido pelo flebotomíneo seja regurgitado, carregando as formas promastigotas metacíclicas para um novo hospedeiro vertebrado (188-191).

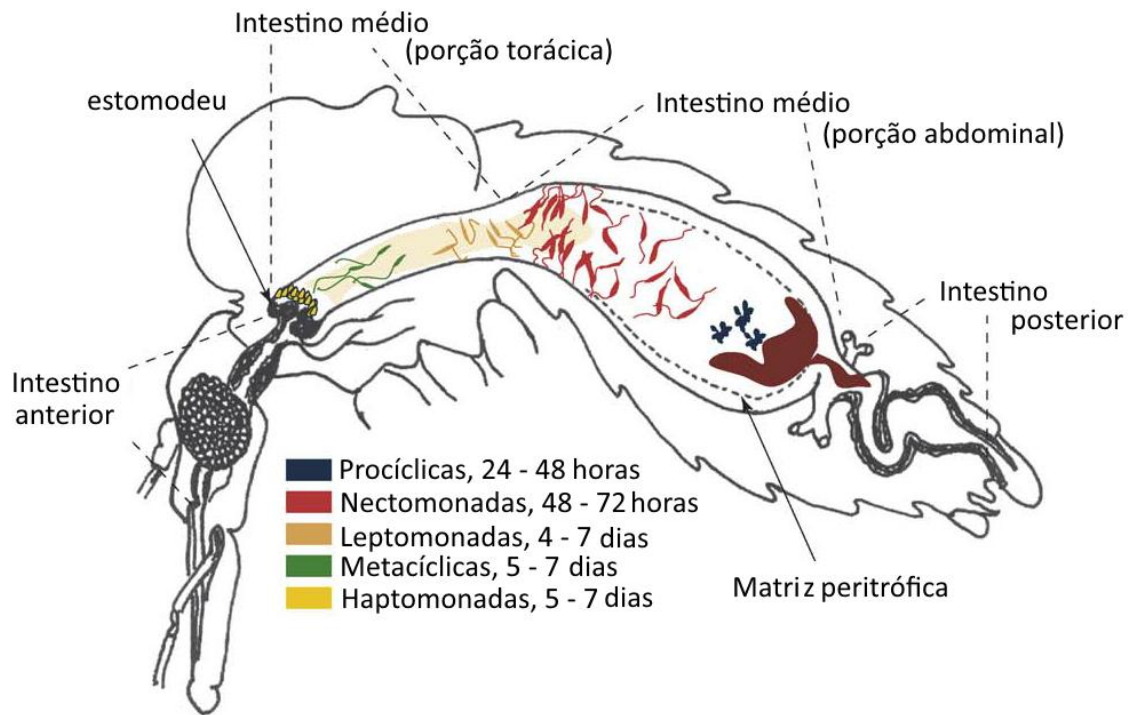


Figura 11- Desenvolvimento de *Leishmania* (*Leishmania*) no flebotomíneo vetor. Adaptado de Kamhawi et al, 2006 (188).

1.12 Resposta imune na leishmaniose tegumentar

A inoculação de *Leishmania* pelo inseto vetor pode ocasionar uma infecção inaparente, assintomática, ou levar ao desenvolvimento da leishmaniose nas formas cutânea ou visceral (192). O desfecho da infecção primária irá depender de fatores do parasito, do hospedeiro e do vetor. No que diz respeito ao hospedeiro, uma resposta imune adequada que envolva mecanismos da imunidade inata e adaptativa é fundamental para o controle da doença.

Logo após a infecção, as promastigotas metacíclicas entram em contato com neutrófilos, macrófagos, monócitos e células dendríticas. Todas essas células podem ser infectadas por *Leishmania*. Os neutrófilos são células do sistema imune inato encontradas no sangue. Elas são as primeiras células a migrarem para áreas que sofreram algum dano tecidual ou que estão

infectadas e, por isso, exercem um papel fundamental na resposta inicial aos patógenos. Os neutrófilos são capazes de eliminar microorganismos através da liberação do conteúdo de seus grânulos tóxicos (no local da lesão ou no fagolisossomo) e através da formação de estruturas fibrosas extracelulares denominadas de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (193-195). Diversos fatores contribuem para a migração dos neutrófilos após a infecção com *Leishmania*, dentre eles, a injúria tecidual causada pela picada do flebotomíneo, componentes da saliva do vetor e proteínas produzidas pelo parasito (195). Vários estudos experimentais já demonstraram a migração de neutrófilos para o local do inóculo, independentemente da espécie de *Leishmania* utilizada, reforçando a importância dessas células durante os primeiros momentos da infecção (195-200). Além da eliminação direta dos parasitos, os neutrófilos também parecem atuar na modulação da resposta imune inata e adaptativa através da produção de citocinas e da interação com outras células, tais como, células dendríticas, macrófagos, células NK e linfócitos T e B (180, 201, 202).

A infecção dos macrófagos na pele pode ocorrer diretamente ou ser facilitada pelos neutrófilos. A forma pela qual o parasito entra em contato com sua célula-alvo pode influenciar no tipo de resposta desenvolvida e, conseqüentemente, no desfecho da doença. Assim, quando os neutrófilos infectados entram em apoptose e são fagocitados, as leishmânias são transferidas de forma silenciosa, sem que haja ativação dos macrófagos (192). Este processo parece ser importante para o estabelecimento inicial da infecção pelo parasito já que a forma de ativação dos macrófagos e o tipo de resposta imune induzida depende do microambiente em que a célula se encontra. Os macrófagos podem ser ativados de duas maneiras: a primeira, chamada de ativação clássica, ocorre na presença das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e TNF, ou de lipopolissacarídeos (LPS), sendo os macrófagos ativados por essa via denominados M1; a segunda forma de ativação, chamada de alternativa, se dá na presença das citocinas IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β , bem como de corpos apoptóticos e complexos imune, sendo os macrófagos denominados de M2 (M2a, M2b e M2c) (Figura 12) (203, 204). Os macrófagos M1 têm alto potencial germicida, pois são capazes de produzir espécies reativas do oxigênio (ROS) e

do nitrogênio (RNS), produzir e secretar a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e desviar o metabolismo da arginina para a produção de óxido nítrico (NO). Além disso, os macrófagos M1 produzem as citocinas TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23, que promovem a diferenciação dos linfócitos T em células do tipo Th1 e o recrutamento de células NK para o local da lesão. Já os macrófagos do tipo M2 são orientados para o remodelamento e o reparo tecidual através da atuação da enzima arginase 1 (Arg1). Também produzem as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β e induzem o desenvolvimento de células Th2 e Treg (203, 204). A entrada do parasito via corpos apoptóticos é um mecanismo que induz a polarização dos macrófagos para o perfil M2, favorecendo a perpetuação da infecção. Outro fator importante para o estabelecimento da infecção é a liberação de IL-6 e TNF por macrófagos infectados com algumas espécies de *Leishmania* (203, 205). Essas citocinas induzem a expressão de fatores de adesão e quimiocinas que facilitam a migração de neutrófilos e monócitos, amplificando o número de células suscetíveis ao parasito (203).

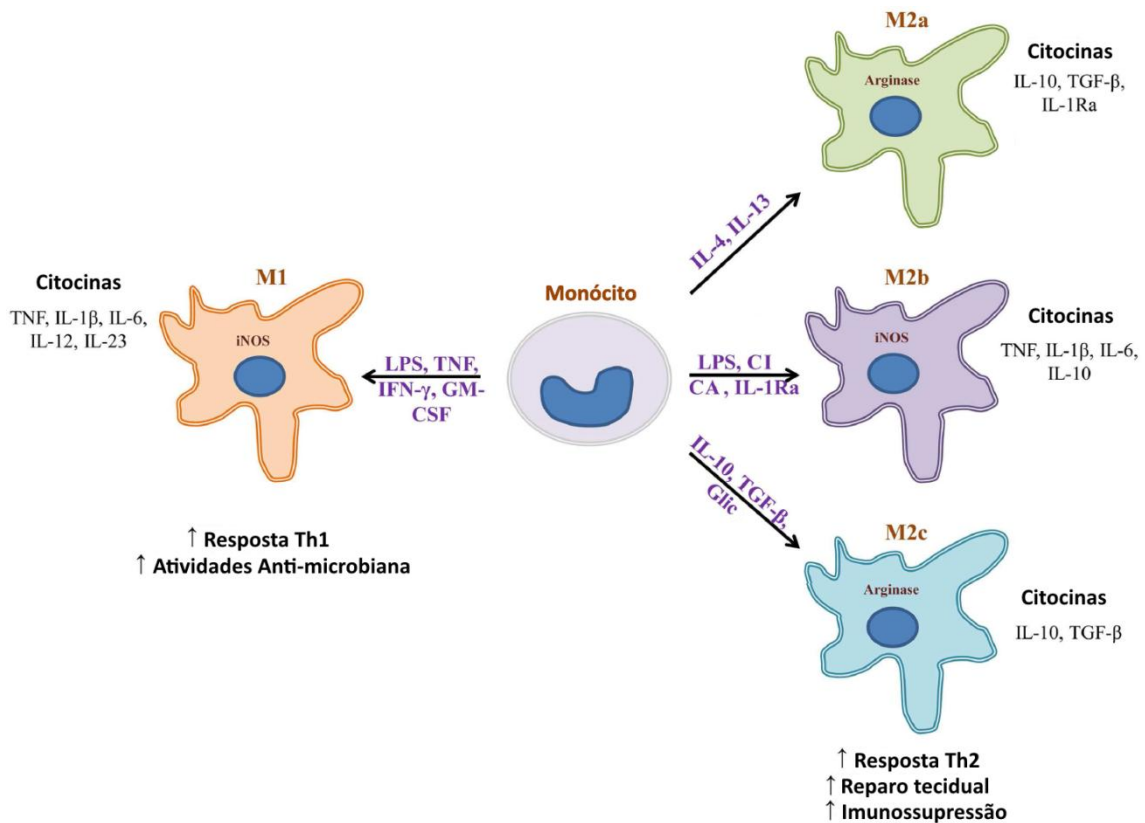


Figura 12- Formas de ativação dos macrófagos. CA, células apoptóticas; Glic, glicocorticóides; CI, complexos imune. Adaptado de Arango Duque & Descoteaux, 2014 (203).

De fato, é observada uma migração mais intensa de monócitos para o local da infecção no decorrer dos dias. Essas células auxiliam na eliminação dos parasitos através da fagocitose. Elas também podem se diferenciar em macrófagos ou adotar uma morfologia semelhante à das células dendríticas sendo, por esse motivo, chamados de células dendríticas derivadas de monócitos (MoDC) (206, 207). Além dos neutrófilos, macrófagos e monócitos, as células de Langerhans e as células dendríticas residentes também são capazes de fagocitar os parasitos na pele. Inicialmente, acreditava-se que as células de Langerhans eram as responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T nos linfonodos. Contudo, trabalhos posteriores demonstraram que as células dendríticas dérmicas é que, na verdade, exercem essa função. As células de Langerhans infectadas teriam função regulatória e estariam envolvidas na persistência do parasito (208-210)

As células dendríticas são uma população heterogênea de células apresentadoras de antígenos profissionais que são divididas em dois grandes grupos: 1) células dendríticas convencionais (cDC), especializadas na captura, processamento e apresentação de antígenos para as células T; e 2) células dendríticas plasmocitóides (pDC), que produzem interferon do tipo I (IFN- α e IFN- β) (209). Após o contato com patógenos ou estímulos inflamatórios, as células dendríticas passam por um processo de maturação e migração para os linfonodos, onde apresentam antígenos para os linfócitos T. Experimentalmente, já foi verificado que a infecção de células dendríticas com *L. major* é capaz de induzir a produção de IL-12 (211). Apesar dos macrófagos também serem células apresentadoras de antígenos profissionais, quando infectados por *Leishmania*, perdem a capacidade de produzir essa citocina (212, 213). Desta forma, as células dendríticas passam a ser as principais responsáveis pela polarização da resposta para o perfil Th1 na leishmaniose. No entanto, certas espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. tropica*) induzem fracamente a produção de IL-12 pelas células dendríticas na fase amastigota. Por outro lado, foi verificado que na presença de células NK ativadas, as células dendríticas eram capazes de voltar a produzir essa citocina e expressar moléculas coestimulatórias, em um mecanismo de cooperação entre elas, levando a produção de IL-12 e IFN- γ (209).

A diferenciação das células T naive em células efetoras ocorre nos linfonodos através da interação com as células apresentadoras de antígenos. Na presença de IL-12 e IFN- γ , as células T CD4⁺ se diferenciam em células T auxiliaadoras do tipo 1 (Th1) que são produtoras de IFN- γ e TNF. Essas células migram até o local da infecção onde liberam suas citocinas. Tanto o IFN- γ quanto o TNF- α são capazes de ativar os macrófagos pela via clássica, levando a produção de NO que é tóxico para o parasito. Os macrófagos ativados também produzem TNF- α , que de forma autócrina, aumenta a produção de NO e de ROS por essas células (213, 214). Quando ocorre polarização para o perfil Th2, as células T CD4⁺ secretam IL-4. Esta citocina induz regulação negativa da expressão do receptor para IL-12 em células Th1, levando a redução na produção de IFN- γ e um padrão de resposta Th2.

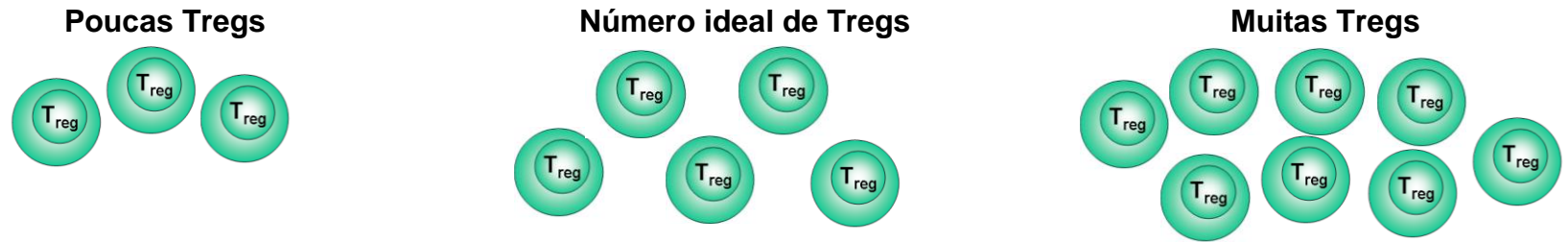
A resposta imune celular tem sido amplamente estudada em modelos experimentais murinos. A infecção de diferentes linhagens de camundongos com *L. major* demonstrou, pela primeira vez, o paradigma Th1/Th2 relacionado a resistência e a suscetibilidade às infecções intracelulares (215). Camundongos suscetíveis (BALB/c) desenvolvem lesões progressivas, com predominância da resposta Th2 e das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Já os camundongos resistentes (C57BL/6) apresentam pequenas lesões, com poucos parasitos e predominância das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2, características da resposta Th1 (216, 217). Contudo, o mesmo padrão não é observado nas infecções experimentais com outras espécies de leishmânia e nas infecções humanas. Nas infecções experimentais com *L. braziliensis*, por exemplo, parece existir um maior equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, fazendo com que os parasitos sejam eliminados e as lesões curem espontaneamente (218). Na leishmaniose humana a resposta celular do tipo Th1 tem sido relacionada ao controle da infecção, mas também à patologia associada às formas cutâneas da doença (192). Além disso, tanto células com fenótipo Th1 quanto células com fenótipo Th2 podem ser encontradas simultaneamente na infecção humana (219), de forma que a caracterização de um perfil Th1 ou Th2 é determinado pela predominância de um tipo celular em relação ao outro.

Um terceiro subconjunto de células T CD4⁺ efectoras, as células Th17, também parece estar envolvido na resposta imune a leishmaniose. Elas são células T auxiliaadoras pró-inflamatórias que produzem a citocina IL-17. Esta citocina é responsável pelo recrutamento, migração e ativação de neutrófilos. Acredita-se que a IL-17 participe de mecanismos de proteção de epitélios contra bactérias extracelulares e fungos, mas que também esteja envolvida com dano tecidual em doenças inflamatórias imunomediadas (220). Na leishmaniose experimental, as células Th17 foram associadas à destruição tecidual, pois camundongos deficientes para a citocina apresentam lesões menores e com menos neutrófilos em comparação às lesões de camundongos normais. Adicionalmente, níveis elevados de IL-17 não conferiram diminuição da carga parasitária (221). O papel das células Th17 e dos neutrófilos no dano tecidual também vem sendo demonstrado na leishmaniose tegumentar

humana, na qual essas células foram associadas à patogênese da forma cutâneas da doença (222-224).

Apesar de controlar a multiplicação do parasito, a resposta inflamatória excessiva acaba causando dano tecidual importante. Na forma mucosa da leishmaniose tegumentar, por exemplo, é observada uma intensa resposta do tipo Th1, enquanto na doença localizada a resposta inflamatória das células T CD4⁺ é contrabalanceada pelo aumento de células T produtoras de IL-10 (192, 216). A principal função desta citocina é limitar a resposta imune através da inativação de macrófagos e células dendríticas com consequente inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, da expressão de MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias (CD40, CD80, CD86) (203). Quase todas as células do sistema imune inato e adaptativo podem produzir IL-10, incluindo: células dendríticas (225), macrófagos (203), mastócitos (226), células NK (227), eosinófilos (226), neutrófilos (228), células B (203), células T CD8⁺ e CD4⁺ dos tipos Th1, Th2, Th17 e Treg (216, 226, 229). Destas, a mais estudada na leishmaniose tegumentar são as células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). Diversos estudos demonstraram que essas células estão relacionadas com a maior persistência dos parasitos e a cronicidade da doença (230-232). Por outro lado, elas têm um papel importante no controle do dano tecidual e do desenvolvimento de células de memória, demonstrando que o equilíbrio entre as funções efetoras e reguladoras das células T é crítico para o desenvolvimento de uma resposta imune adequada na leishmaniose (Tabela 3) (233-236). Mais recentemente, diferentes estudos demonstraram que as células Treg podem não ser as principais produtoras de IL-10 na leishmaniose. Foi sugerido que outras células possam atuar nesse processo de regulação, entre elas, as células Tr1 (237, 238).

Tabela 3 - Vantagens e desvantagens das células T reguladoras (Tregs) na infecção por *Leishmania* spp.



	Vantagem	Desvantagem	Vantagem	Desvantagem	Vantagem	Desvantagem
Parasito	nenhuma	eliminação do parasito	sobrevivência transmissão	nenhuma	prevenção da resposta imune sobrevivência transmissão	dano ao hospedeiro
Hospedeiro	eliminação do parasito	dano tecidual	controle da resposta imune excessiva manutenção de uma resposta imune protetora	nenhuma	nenhuma	reativação cronicidade

Adaptado de Belkaid, 2003 (235).

Outra população de linfócitos T, as células CD8⁺, também parece estar relacionada com mecanismos de proteção na leishmaniose. Essas células normalmente atuam de duas maneiras: através da liberação de perforinas e granzimas na sinapse imunológica ou pela produção de citocinas, principalmente IFN- γ . Na leishmaniose, este último mecanismo é o mais relevante no controle da infecção, pois o IFN- γ produzido pelas células CD8⁺ é capaz de bloquear o desenvolvimento de células Th2, ativar os macrófagos e direcionar a diferenciação para o perfil Th1 (Figura 13) (216, 239). Já a citotoxicidade está mais relacionada com o agravamento das lesões, pelo menos no caso das infecções por *L. braziliensis* (216, 239, 240). A lise de células infectadas aumenta a inflamação e a liberação de parasitos, bem como a migração de células CD8⁺ de memória geradas antes da infecção por *Leishmania* (Figura 14). Acredita-se que esse processo desencadeado pelas células T CD8⁺ citotóxicas pode estar relacionado com a maior gravidade das lesões e com o aparecimento de metástases, como já foi observado em infecções experimentais (241).

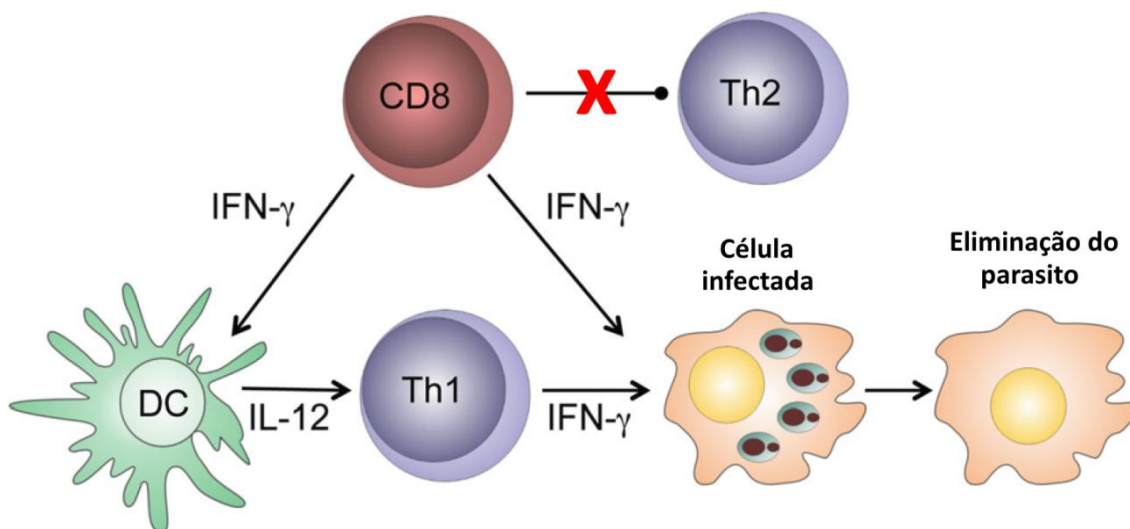


Figura 13 - Papel protetor das células T CD8⁺ na infecção por *Leishmania* sp.. As células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ ativam os macrófagos, levando a eliminação dos parasitos. O IFN- γ liberado pelas células T CD8⁺ também aumenta a produção de IL-12 direcionando a resposta imune para o perfil Th1. Adaptado de Novais & Scott, 2015 (239).

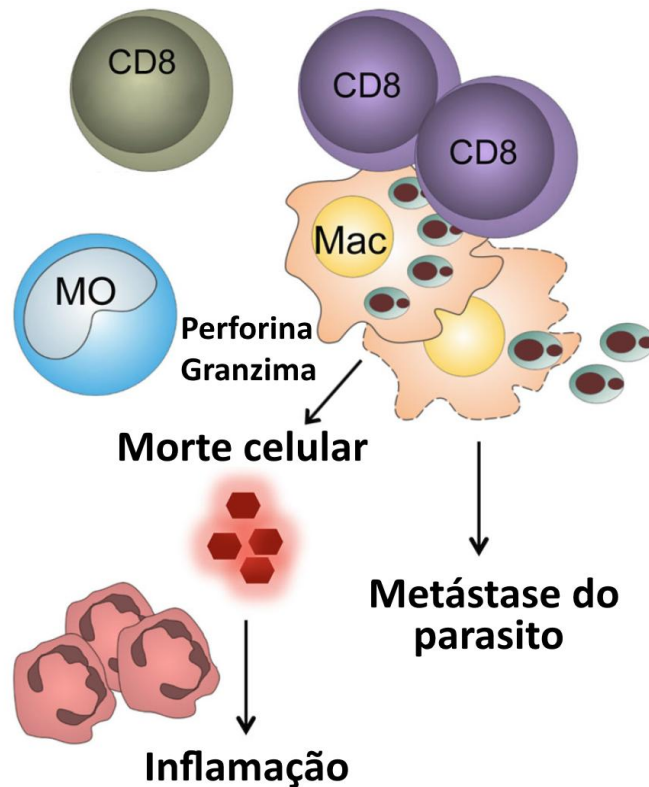


Figura 14 - Efeito patogênico das células T CD8⁺ citotóxicas na infecção por *Leishmania* sp.. As células T citotóxicas migram até a lesões e lisam células infectadas, liberando moléculas pró-inflamatórias e parasitos. Com isso, outras células CD8⁺ migram até o local da infecção, amplificando o processo inflamatório. Os parasitos liberados infectam outras células e podem gerar metástases. Mac, macrófago; Mo, monócito; Adaptado de Novais & Scott, 2015 (239).

Há, ainda, uma última subpopulação de linfócitos T CD4⁻CD8⁻, denominadas células T duplo negativas (DN), que produzem elevadas concentrações de citocinas. Elas podem ser células T $\alpha\beta$, por possuírem as cadeias alfa e beta do TCR, ou células T $\gamma\delta$, por possuírem as cadeias gama e delta do receptor. Diversos estudos demonstraram o aumento de células T DN no sangue de humanos e no baço de camundongos infectados com *Leishmania* (242-244). Normalmente, o percentual de células DN na periferia é pequeno, variando de 1 a 5% do total de células T, sendo a maioria composta por células T $\gamma\delta$ (242, 244). Nos pacientes infectados com *Leishmania* foi

observado o contrário: a maioria das células DN expressavam o receptor $\alpha\beta$ (242). Ao avaliar as células DN desses pacientes foi observado que ambas eram capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), porém as células T $\gamma\delta$ produziam uma maior quantidade de IL-10 (192, 242). Estes resultados sugerem que as células T DN também exercem um papel importante no controle e na regulação da resposta imune a leishmaniose já que são importantes produtoras de citocinas. Assim, o maior percentual de células T $\alpha\beta$ DN beneficia uma resposta protetora que leva a eliminação dos parasitos, mas que é regulada pela IL-10 produzida pelas células T $\gamma\delta$.

1.13 Uso de modelos experimentais na leishmaniose tegumentar

Os modelos experimentais têm fornecido informações valiosas para a compreensão de diversos aspectos da leishmaniose. Eles são empregados, principalmente, em estudos que visam entender a patógenese e os mecanismos imunes responsáveis pela eliminação e persistência dos parasitos, mas também em trabalhos voltados para o desenvolvimento de drogas e vacinas. Diferentes animais podem ser empregados nas infecções experimentais com *Leishmania*: roedores de laboratório (camundongo, rato ou hamster), roedores silvestres, cães e primatas (245, 246). Dentre esses, o modelo mais utilizado são os roedores de laboratório, em especial, os camundongos porque são de fácil acesso, tem custo de manutenção baixo em relação aos outros animais, possuem diferentes linhagens bem-estabelecidas e contam com inúmeros reagentes específicos para a espécie (245).

Como a maioria das espécies de *Leishmania* são zoonóticas e, muitas vezes, os reservatórios naturais da doença são roedores encontrados em desertos, savanas ou florestas, a adaptação de camundongos como modelos experimentais para o estudo da leishmaniose foi algo relativamente fácil. Mesmo as espécies antroponóticas (como *L. donovani* e *L. tropica*) ou aquelas em que os animais reservatórios não são roedores (*L. infantum*) puderam ser empregadas em estudos com animais de laboratório, desde que altas doses ou inóculos sistêmicos do parasito fossem utilizados (247).

O modelo murino reproduz muitos aspectos das leishmanioses encontradas no Velho e no Novo Mundo. Os padrões produzidos durante a infecção experimental dependem da linhagem de camundongo (*background* genético), da espécie de leishmânia, da cepa, do número de parasitos e da via de inoculação utilizados (Tabela 4) (217, 248-251). Assim, os animais podem ser resistentes ou suscetíveis à infecção dependendo das condições experimentais, o que os tornam úteis no estudo das diversas manifestações clínicas que ocorrem nas doenças humanas. Apesar dos benefícios, os modelos murinos para estudo das leishmanioses humanas têm algumas limitações. A primeira delas é a variação genética existente na população humana que não é reproduzida nas linhagens de camundongos isogênicas. Outro fator importante é que não existem modelos murinos que reproduzam a leishmaniose mucosa (252). Além disso, a infecção normalmente é realizada com seringa, o que pode alterar o tipo de resposta imune desenvolvida, já que na saliva dos flebotomíneos existem uma série de moléculas com atividades biológicas importantes (174, 252, 253).

Tabela 4 - Diferentes modelos de infecção experimental com espécies dermatrópicas de *Leishmania* sp.

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

Adaptado de Sacks & Melby, 2015 (247).

As infecções experimentais com espécies dermatrópicas de *Leishmania* podem ser realizadas em diferentes locais: focinho, base da cauda, pata ou orelhas (246, 252, 254). O modelo de infecção em uma das patas traseiras é o mais utilizado (247). Nele, o número de parasitos inoculados por via subcutânea varia de 10^5 a 10^7 e a evolução da doença é acompanhada semanalmente pelo tamanho do inchaço observado na pata. O modelo de infecção na orelha foi desenvolvido mais recentemente e tem como vantagem utilizar um número menor de parasitos (10^3 a 10^5) por via intradérmica, o que reproduz melhor as infecções naturais causadas pelo inseto vetor (253, 255).

Outra vantagem da infecção intradérmica na orelha, é que camundongos infectados *L. braziliensis* por essa via, desenvolvem lesões ulceradas que curam espontaneamente (255). Quando a infecção é feita pela via subcutânea na pata traseira, os animais não apresentam lesão ou

apresentam apenas pequenos inchaços que logo em seguida desaparecem (248). Foi observado que a infecção subcutânea com *L. braziliensis* nas linhagens C3H/HeJ, C57BL/6 e CBA/CaJ não mostraram nenhuma evidência de infecção enquanto as linhagens AKR/J e CBA/J apresentaram um edema pequeno e de curta duração quando os parasitas foram injetados no focinho dos animais. Já as linhagens SWR/J, C57L/J, A/J, A/HeJ e DBA/1J, desenvolveram pequenos nódulos que curaram espontaneamente. A linhagem de camundongos BALB/c foi considerada a mais suscetível à infecção subcutânea apesar dos animais não desenvolverem lesões graves e de longa duração (254).

Outras espécies do subgênero *Viannia* (*L. panamensis* e *L. guyanensis*) também apresentam essa mesma dificuldade. Uma alternativa é o uso do hamster da espécie *Mesocricetus auratus*. Esse roedor é mais suscetível do que o camundongo e quando infectado com *Leishmania* (*Viannia*) spp. apresenta lesões com evolução rápida que, sob determinadas condições experimentais, podem se disseminar (246, 248). Essa característica de evolução rápida das lesões faz com que esses animais também sejam utilizados no isolamento de leishmânias a partir de amostras de campo (248). No entanto, o uso de hamsters não é muito comum no meio científico devido à carência de reagentes específicos para essa espécie.

O desfecho das infecções experimentais com *Leishmania* em diferentes modelos está relacionado ao tipo de resposta imune desenvolvida. A cura espontânea da infecção subcutânea com *L. braziliensis* em camundongos BALB/c é dependente da produção de IFN- γ , IL-12 e TNF e uma menor expressão de IL-4, IL-10 e IL-13 nos linfonodos (218, 256). Na infecção intradérmica da orelha, algo semelhante foi encontrado. Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ desses animais produziam quantidades significativas de IFN- γ , fazendo com que a resposta imune celular fosse direcionada para o perfil Th1 e, conseqüentemente, que a replicação do parasito fosse controlada na lesão. Em contrapartida, os efeitos do IFN- γ eram contrabalanceados com a presença de IL-4, IL-5 e IL-10. Como resultado do equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, as lesões curam espontaneamente e os parasitos são eliminados do local de

infecção, mas não dos linfonodos (255), o que pode ser importante para o desenvolvimento de uma resposta de memória.

A infecção experimental com *L. amazonensis* cursa de forma diferente dependendo da linhagem de camundongo utilizada. Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/10 são considerados mais suscetíveis à infecção e desenvolvem lesões crônicas (257, 258), enquanto camundongos das linhagens C3H, DBA, CBA e C57BL/6 apresentam resistência parcial à infecção com desenvolvimento mais demorado das lesões (259). Como não existe nenhuma linhagem de camundongo completamente resistente a infecção por *L. amazonensis*, a caracterização de uma resposta imune protetora e o papel da dicotomia de Th1 e Th2 não é bem definido neste modelo. De maneira geral, acredita-se que a resposta Th1 esteja relacionada à resistência e a resposta Th2 à suscetibilidade, sendo a combinação das duas responsável pelo desfecho da infecção. A suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* pode ser, portanto, resultado de uma série de fatores como a ausência da resposta Th1 (254), a prevalência da resposta Th2 sobre a resposta Th1 (260), ou a presença das duas respostas de maneira ineficiente (261). Mesmo a polarização para a resposta do tipo Th1 não confere necessariamente o fenótipo de resistência aos animais (262, 263). Tudo isso indica que outros mecanismos estão atuando na modulação da resposta imune durante a infecção com *L. amazonensis*. De fato, foi demonstrado que há regulação da expressão de IL-12, de maneira independente de IL-4, induzida pelo patógeno que limita a resposta do tipo Th1 nas infecções com *L. amazonensis* (264). Em seguida, foi verificado que a deficiência na resposta a IL-12 em camundongos infectados com *L. amazonensis* estava associada com um defeito específico na cadeia beta 2 do receptor de IL-12 que leva a uma diminuição da expressão do receptor funcional dessa citocina (264).

1.14 Coinfecção

A coinfecção é um evento comum nas populações naturais (265-267). A constante interação entre diferentes espécies na natureza facilita o estabelecimento do parasitismo e a ocorrência de infecções concomitantes. As

coinfecções podem envolver uma série de patógenos e causar diferentes efeitos no hospedeiro. Os sintomas, a suscetibilidade, o tempo de duração e o risco de transmissão das doenças podem ser modificados, dificultando o diagnóstico, o tratamento e o controle das mesmas (268).

Os efeitos da coinfeção são resultado do tipo de interação que os parasitos estabelecem entre si e com seu hospedeiro e não simplesmente a soma dos efeitos individuais de cada parasito no hospedeiro. As interações dos parasitos podem ser neutras, quando a presença de um não afeta positiva ou negativamente o outro; sinérgicas, quando a presença de um parasito favorecer o estabelecimento do outro; ou antagônicas, quando um parasito prejudica o outro (Figura 15) (269). Além disso, as interações entre os parasitos podem ocorrer de forma direta ou indireta. Normalmente as interações indiretas são mediadas pelo hospedeiro e estão relacionadas a disponibilidade de recursos e ao sistema imune (270).

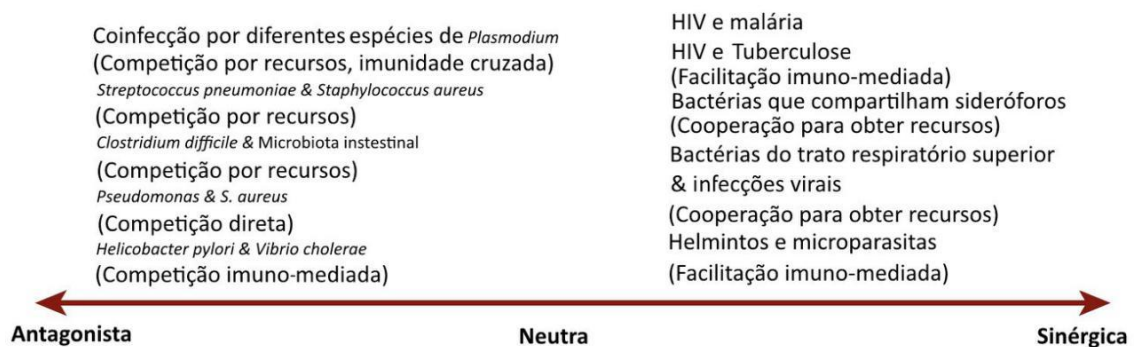


Figura 15 - Exemplos de interações anagonistas, neutras e sinérgicas entre os parasitos. Adaptado de Birger *et al.*, 2015 (269).

Assim que entram em contato com o hospedeiro, os parasitos precisam sobreviver aos diferentes mecanismos desencadeados pela resposta imune inata e adaptativa para se estabelecerem. Alguns patógenos são capazes de suprimir o sistema imune facilitando a sua permanência, mas também a infecção por outros organismos. Por outro lado, a resposta imune desenvolvida em função de um parasito pode reconhecer outros agentes

antigenicamente parecidos, num fenômeno chamado de imunidade cruzada, prevenindo, desta forma, infecções sucessivas ou concomitantes. O ponto negativo para o hospedeiro, é que a imunidade cruzada pode desencadear processos auto-ímmunes quando moléculas, células ou tecidos próprios também passam a ser reconhecidos (268). Determinados parasitos podem, ainda, induzir o desenvolvimento de uma resposta imune celular com perfil Th1 ou Th2, sendo o grau e o tipo de polarização dependentes do tipo de patógeno envolvido (268, 271). De uma forma geral, protozoários intracelulares induzem respostas do tipo Th1 e helmintos estimulam respostas do tipo Th2. Como os dois tipos de respostas se contrapõem, acredita-se que a polarização para um dos dois perfis irá afetar a resposta ao segundo parasito modificando a imunopatologia da doença (271). A maioria dos estudos de coinfeção leva em consideração essa última abordagem, porém alterações muito mais complexas podem ocorrer no sistema imune durante as coinfeções o que justificaria alguns resultados inesperados em infecções experimentais ou em estudos longitudinais com populações humanas.

Inúmeros trabalhos relatam a infecção concomitante de plasmódios com helmintos, vírus ou bactérias (141, 272-274). Muitos desses estudos são controversos, mostrando ora maior, ora menor suscetibilidade, ou nenhuma influência na evolução da malária. Na coinfeção humana com *Schistosoma mansoni*, por exemplo, alguns trabalhos demonstraram um aumento da morbidade da malária enquanto outros não encontraram nenhuma associação (275-277). Alguns helmintos, como os ancilostomídeos, causam redução do número de eritrócitos disponíveis para a reprodução dos plasmódios. No entanto, a anemia provocada pelos parasitos intestinais pioram os sintomas da malária, aumentando a gravidade da doença (273). Em relação aos vírus, a maior parte dos trabalhos avaliam a malária em pacientes portadores de HIV. Normalmente são observadas parasitemias maiores e índices hematimétricos menores em pacientes coinfectados, especialmente quando as contagens de células CD4 estão baixas (278-281).

A coinfeção de leishmaniose tegumentar e HIV é igualmente estudada. Em geral, os pacientes têm apresentações atípicas da LTA. Acredita-se que a imunodepressão causada pelo vírus facilite a progressão e o agravamento da

doença, explicando o aparecimento das formas atípicas (282-284). Também foi verificado que as coinfeções por *L. braziliensis* e helmintos em humanos alteram tanto o curso clínico da leishmaniose cutânea quanto à resposta imune à infecção, ocorrendo aumento no tempo de cura das lesões e mudança de perfil de resposta Th1 para Th2 (285-287).

Até o momento, não existem relatos da coinfeção humana com *Plasmodium* e espécies dermatrópicas de *Leishmania* apesar das áreas de distribuição das doenças se sobreporem em muitas regiões do mundo, inclusive no Brasil. No entanto, existem vários relatos de pacientes com leishmaniose visceral e malária em diferentes países como Índia, Sudão, o Iêmen, Uganda e Malásia, além de um relato de 1948 em Atenas, Grécia (288-293). Nestes trabalhos, foi observado que os pacientes coinfectados normalmente apresentavam maior gravidade e anemia mais acentuada. A dificuldade em se fazer o diagnóstico das duas doenças simultaneamente pode estar relacionada com esse fato, já que, em grande parte dos casos, uma doença é tratada antes que se descubra a existência da outra (291, 292). Mas também é possível que alterações da resposta imunológica estejam influenciando no curso das infecções. Ao avaliar o perfil de citocinas séricas de pacientes coinfectados, van den Bogaart e colaboradores observaram uma polarização da resposta para o perfil Th1, com produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF) e de IL-12 e IL-17 em níveis mais elevados do que nas monoinfecções, demonstrando que o sistema imune responde de maneira diferente em infecções concomitantes pelos dois parasitos (294). Posteriormente, o mesmo grupo observou que células dendríticas estimuladas *in vitro* com promastigotas de *L. donovani* e com eritrócitos infectados com *P. falciparum* não maturavam adequadamente e que produziam níveis baixos de IL-12 (295), sugerindo uma possível modificação na resposta inicial do hospedeiro na presença dos dois parasitos.

A coinfeção malária e leishmaniose cutânea foi avaliada apenas em modelos experimentais. Coleman e colaboradores observaram que a coinfeção de camundongos com *L. amazonensis* e *P. yoelii* nas linhagens BALB/c e C57BL/6 aumentava a suscetibilidade e a severidade das duas

doenças. As parasitemias dos animais coinfectedos eram maiores do que as parasitemias dos animais infectados apenas com *P. yoelii* quando *L. amazonensis* foi inoculada semanas ou dias antes do inóculo de plasmódio. As lesões causadas pela infecção com *L. amazonensis* também foram maiores nos camundongos concomitantemente infectados com *P. yoelii* em comparação com camundongos infectados apenas por *L. amazonensis* (296, 297). No entanto, esses autores não avaliaram as possíveis alterações da resposta imune que poderiam estar atuando no agravamento das infecções.

1.15 Justificativa

No Brasil, malária e leishmaniose cutânea apresentam áreas de distribuição em comum e ambas têm alta prevalência na região Amazônica. Apesar disso, não existem dados do Ministério da Saúde sobre a prevalência da coinfeção humana por *Plasmodium* spp. e *Leishmania* spp. dermatóricas e nem trabalhos que relatem a ocorrência de alterações na história natural das dessas doenças quando se encontram associadas. Também não existem dados a respeito da infecção humana por espécies dermatóricas de leishmânia e plasmódios em outros países. Contudo, a coinfeção por plasmódio e leishmânias do Complexo Donovanii (leishmaniose visceral) já foi relatada em diferentes trabalhos demonstrando que a infecção simultânea pelos dois parasitos não é um evento raro na natureza (288-292).

O modelo experimental utilizando roedores é bem aceito no meio científico e a grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção por diferentes espécies de *Plasmodium* spp. e de *Leishmania* spp. têm contribuído para compreender aspectos envolvidos na patogênese dessas doenças. O estudo da malária a partir de modelos murinos oferece a oportunidade de desvendar mecanismos imunológicos que podem estar envolvidos na doença, uma vez que há similaridades entre a resposta imune e características patológicas da infecção em humanos e camundongos (131, 132, 143, 298, 299). O modelo murino também é muito importante no estudo das leishmanioses cutâneas. Ele reproduz muitos aspectos das doenças encontradas no Velho e no Novo Mundo, sendo os padrões produzidos durante

a infecção experimental dependentes da linhagem de camundongo, da espécie de leishmânia, do número de parasitos e da via de inoculação utilizada (217, 245, 246, 249-251).

Existem poucos trabalhos de coinfeção entre *P. yoelii* e leishmânias dermatóricas em modelos experimentais e nenhum deles avalia as possíveis alterações da resposta imune no curso das doenças (296, 297, 300, 301). Acreditamos que as coinfeções possam ser um mecanismo importante de modulação da resposta imune, já que diversos trabalhos vêm demonstrando a alteração do curso das infecções que ocorrem simultaneamente. Em alguns casos, as coinfeções podem ser benéficas aos hospedeiros e em outros causar prejuízos. Na coinfeção de camundongos BALB/c com *Listeria monocytogenes* e a cepa letal de *P. yoelii*, por exemplo, foi observada uma inibição da multiplicação do plasmódio e um aumento na produção de IFN- γ no início da infecção, aumentando a sobrevivência dos camundongos coinfectados em relação aos infectados apenas com *P. yoelii* (302). Em outro modelo de coinfeção, desta vez, com *Salmonella*, foi observado que o metabolismo do heme na infecção malárica altera os mecanismos de explosão oxidativa dos granulócitos e que isso contribui para a suscetibilidade à infecção pela bactéria (303, 304). Também nas coinfeções por leishmânia o desfecho pode ser benéfico ou prejudicial dependendo dos parasitos envolvidos. Na coinfeção por *L. major* e *Toxoplasma gondii* foi observada uma redução do tamanho das lesões, do infiltrado inflamatório e da carga parasitária de leishmânia durante a fase aguda da toxoplasmose, mas não na fase crônica da doença (305). Na coinfeção com *Schistosoma mansoni* a resolução das lesões de *L. major* ocorreu mais tardiamente provavelmente em função de uma resposta do tipo Th2 inicial ao helminto (306).

Considerando a importância do estudo da coinfeção *Plasmodium* spp. e *Leishmania* spp. para o entendimento do curso das infecções naturais, visto que diversas populações estão sobre o risco de contrair as duas doenças simultaneamente, este trabalho investiga os aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos da coinfeção por *P. yoelii* 17XNL (não-letal) e *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* no modelo murino.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência das coinfeções por *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* no curso das infecções e da resposta imunológica de camundongos BALB/c.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar as possíveis influências das coinfeções por *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* no curso da malária e das leishmanioses nos camundongos BALB/c;
- Avaliar a evolução da parasitemia na coinfeção *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* em relação ao grupo infectado apenas com *P. yoelii* 17XNL;
- Comparar o desenvolvimento das lesões e o aparecimento de úlceras na coinfeção *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* em relação ao grupo infectado apenas com *L. braziliensis*;
- Comparar o desenvolvimento das lesões e o aparecimento de úlceras na coinfeção *P. yoelii* 17XNL e *L. amazonensis* em relação ao grupo infectado apenas com *L. amazonensis*;
- Avaliar a carga parasitária das lesões na coinfeção *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* e nas monoinfeções;
- Avaliar a carga parasitária dos linfonodos de drenagem das lesões na coinfeção *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* e nas monoinfeções;

- Verificar se há diferenças entre a coinfeção por *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* em relação a coinfeção por *P. yoelii* 17XNL e *L. amazonensis*;
- Caracterizar as populações de células T no baço, timo e linfonodos dos animais mono e coinfectados ao longo da infecção;
- Analisar a cinética dos níveis de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-6, IL-4, IL-2, IL-10, IL-13 e IL-17) no soro de camundongos mono e coinfectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

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

3.2 Parasitos

3.2.1 *Plasmodium yoelii* 17XNL

O plasmódio murino, *Plasmodium yoelii* 17XNL (não letal), gentilmente cedido pelo Dr. Fábio T. M. Costa da Universidade de Campinas-SP, foi mantido criopreservado à -196 °C em solução de *Alserver* no Laboratório de Simulídeos, Oncocercose e Infecções Simpátricas: Mansonelose e Malária - IOC/FIOCRUZ.

3.2.2 *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*

As espécies *Leishmania braziliensis* (MCAN/BR/98/R619) e *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), previamente caracterizadas através de três diferentes técnicas moleculares (análise do perfil de restrição do DNA do cinetoplasto, eletroforese de isoenzimas e radioimunoensaio usando anticorpos monoclonais específicos pelo Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose - IOC/FIOCRUZ), foram mantidas criopreservadas a -196 °C em meio Schneider

contendo 30% de Soro Fetal Bovino (SFB, Hyclone - EUA) inativado e 8% de glicerol no Laboratório de Imunoparasitologia - IOC/FIOCRUZ.

3.3 Infecção experimental

3.3.1 *Plasmodium yoelii* 17XNL

Para a infecção experimental com plasmódio, alíquotas de sangue de camundongos contendo 2×10^8 hemácias parasitadas (HP)/200 μ L foram descongeladas a temperatura de 36 °C e inoculadas em, pelo menos, 3 camundongos BALB/c por via intraperitoneal (IP). Esses camundongos foram fontes de parasitos para infecção dos animais do experimento. Após 7 dias do inóculo, o sangue destes animais foi coletado com heparina (500 UI). A parasitemia (geralmente em torno de 30%) e a hematimetria foram determinadas para o ajuste da concentração de parasitos a serem inoculados nos camundongos do experimento segundo a Tabela 5.

3.3.2 *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*

Leishmania braziliensis e *L. amazonensis* foram mantidas em cultura no meio Schneider Drosophila (Sigma) com 10% de SFB, 100 UI de penicilina, 100 μ g de estreptomicina e 1.5 mM de glutamina (todos reagentes da Sigma). As formas promastigotas até a quinta passagem em cultura foram mantidas em estufa para Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) à 25 °C até que atingissem a fase estacionária. Os parasitos foram, então, centrifugados (1.000 X g, 10 min, 20 °C) e ressuspensos em salina tamponada com fosfato (PBS, 0,15 M; pH 7,2). Neste momento foi realizada a contagem do número de parasitos em câmara de Neubauer e o ajuste da concentração para a infecção das duas orelhas de cada animal como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5- Via e inóculo da infecção experimental de camundongos BALB/c com *Plasmodium yoelii* e *Leishmania* spp.

Parasitas	Via de Inóculo	Inóculo/Animal
<i>P. yoelii</i> 17XNL	IP	1 X 10 ⁶ HP / 200 µL de NaCl 0,9%*
<i>L. braziliensis</i>	ID – orelhas	1 X 10 ⁵ parasitos / 10 µL de PBS*
<i>L. amazonensis</i>	ID – orelhas	1 X 10 ⁴ parasitos / 10 µL de PBS*

HP = hemácias parasitadas; IP = Intraperitoneal; ID = Intradérmica. * estéril

3.4 Desenho experimental

Os camundongos BALB/c foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais: controle (C), animais não infectados; *P. yoelii* 17XNL (Py), animais inoculados intraperitonealmente com plasmódio; *L. braziliensis* (Lb) e *L. amazonensis* (La), animais inoculados por via intradérmica com as respectivas espécies de leishmânia; e coinfetados (Lb+Py e La+Py), animais infectados com plasmódio e uma das duas espécies de leishmânia citadas anteriormente. Cada grupo experimental continha de 25 a 30 animais e os experimentos foram repetidos, no mínimo, 3 vezes.

Inicialmente, os camundongos foram infectados com *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* três dias antes da infecção com o *P. yoelii* 17XNL definido como dia zero do estudo (Figura 16). Nos dias 5, 10, 17 e 25 do experimento, 6 camundongos dos grupos Py, Lb, La, Lb+Py e La+Py, e 4 camundongos do grupo controle foram submetidos à eutanásia. Amostras de baço, timo, linfonodos, orelhas e alíquotas de sangue foram coletadas, processadas e/ou armazenadas para análises imunológicas e parasitológicas. Os camundongos foram acompanhados ao longo de 11 semanas para avaliação da evolução das lesões e da taxa de sobrevivência. Experimentos preliminares foram realizados para definição das doses, vias de infecção e pontos de avaliação imunológica e parasitológica.

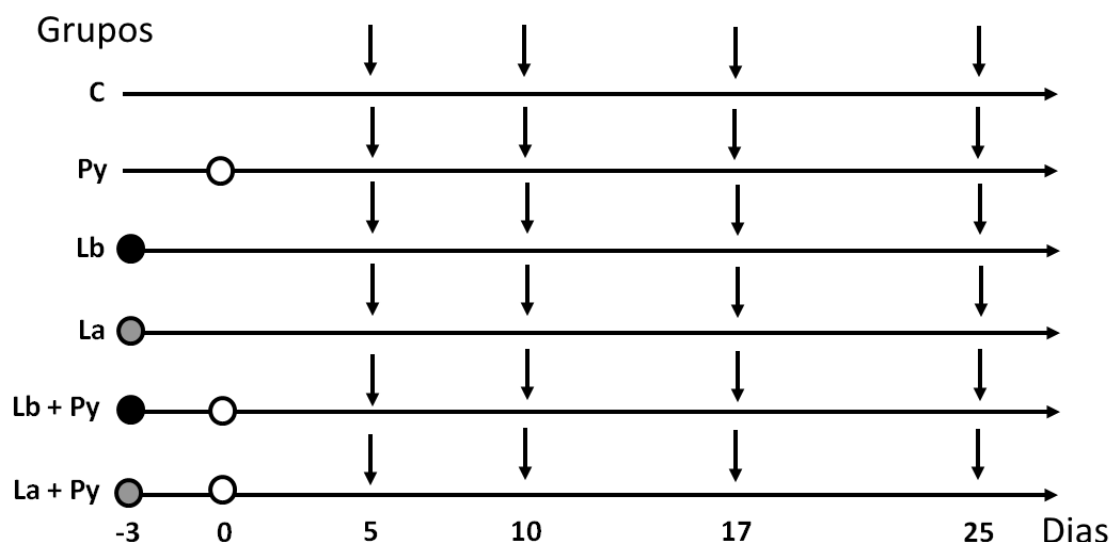


Figura 16- Desenho experimental. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* (círculos pretos) ou *L. amazonensis* (círculos cinzas) três dias antes da infecção com *P. yoelii* 17XNL (círculos brancos). Nos dias assinalados com as setas, 6 animais dos grupos Py, Lb, La, Lb+Py e La+Py e 4 do grupo C foram submetidos à eutanásia para coleta de órgãos e de sangue.

3.5 Acompanhamento das infecções

3.5.1 Infecção por *P. yoelii* 17XNL

Para a avaliação da infecção por *P. yoelii* 17XNL foram confeccionadas distensões sanguíneas em dias alternados, a partir do terceiro dia de infecção, até não serem mais encontradas formas sanguíneas do parasito no sangue periférico. Uma gota de sangue foi retirada da ponta da cauda de cada animal para a confecção da distensão sanguínea. Depois de secar, as lâminas foram fixadas com metanol P.A. e coradas com Giemsa. As leituras foram realizadas em microscópio óptico (Leica, modelo DM55) no aumento de 1.000 vezes. A parasitemia foi estimada pela contabilização do número de células parasitadas em um total de 1.000 hemácias conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de hemácias parasitadas} \times 100}{1.000 \text{ hemácias}}$$

3.5.2 Infecção por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*

3.5.2.1 Avaliação das lesões

A evolução da infecção por *Leishmania* spp. foi acompanhada semanalmente pela medição do tamanho das lesões nas orelhas utilizando o paquímetro digital *Absolute Digimatic* (Mitutoyo) (Figura 17). Simultaneamente, foi verificado o momento do aparecimento e o percentual de úlceras nas lesões dos animais ao longo do período de acompanhamento.



Figura 17- Medição de lesão causada por *Leishmania* spp. com paquímetro digital

3.5.2.2 Avaliação da carga parasitária das lesões

A carga parasitária das lesões causadas pela infecção por *Leishmania* spp. foi quantificada pelo método de diluição limitante. Para isso, seis camundongos de cada grupo mono infectado e co infectado foram selecionados nos dias 5, 10, 17 e 25 do experimento. Portanto, foram analisadas 12 orelhas

e 12 linfonodos de drenagem de cada grupo nos quatro momentos diferentes de infecção.

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

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

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

3.5.2.3 Avaliação da carga parasitária dos linfonodos de drenagem da lesão

Os linfonodos submandibulares e submandibulares acessórios (Figura 18) foram retirados de forma asséptica após a eutanásia dos animais com CO₂

e colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 400 μ L de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Em seguida, foram macerados com o auxílio de um pistilo até que o órgão fosse completamente desagregado. Foi retirado 40 μ L de cada suspensão para a primeira diluição de 1:5 em meio Schneider com antibiótico em placa de 96 poços. Nos demais poços foi feita a diluição seriada de fator 3 até completar 16 poços. Desse ponto em diante, foi seguido o mesmo procedimento descrito anteriormente no item 3.5.2.2 para a determinação da carga parasitária das lesões das orelhas. O cálculo para determinar o número de parasitos no linfonodo foi realizado pela fórmula abaixo:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitos na lesão} = 5 \text{ (primeira diluição)} \times 3^a \times 10$$

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

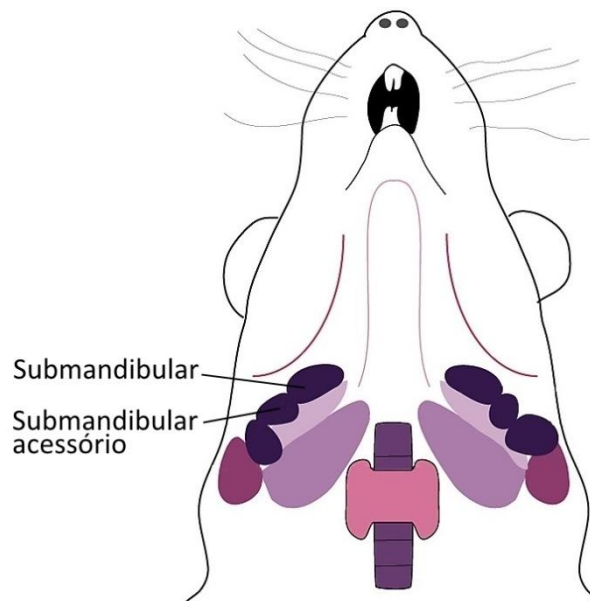


Figura 18- Linfonodos submandibulares e submandibulares acessórios. Adaptado de Walk *et al.*, 2014 (307).

3.6 Quantificação da concentração de citocinas no soro

Para realizar a quantificação da concentração de citocinas no soro dos camundongos, foi coletado cerca de 1 mL de sangue, em tubos de 1,5 mL sem anticoagulante, de 6 animais dos grupos Py, Lb, La, Lb+Py e La+Py e de 4 animais do grupo C nos dias 5, 10, 17 e 25 do estudo. Decorridos cerca de 30 minutos do momento da coleta, o sangue foi centrifugado (600 x g, 10 min, 20 °C). Em seguida, o soro foi recolhido e congelado à -20 °C para posterior utilização.

A dosagem de citocinas no soro foi realizada utilizando o kit comercial *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences) segundo as instruções do fabricante. Os limites de detecção do kit são apresentados na Tabela 6. Resumidamente, foram adicionados 25 µL da mistura de *beads* de captura de citocinas à 25 µL de amostra de soro e 25 µL de reagente de detecção Th1/Th2/Th17 PE. Após uma incubação de 2 h em temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de tampão de lavagem e os tubos foram centrifugados (200 x g, 5 min, 20 °C). O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e foi adicionado mais 300 µL de tampão de lavagem. O precipitado com as beads foi ressuspendido e as amostras foram levadas para a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) da Plataforma de Citometria de Fluxo do IOC/FIOCRUZ. Os dados obtidos foram analisados no programa *FCAP Array* versão 3.0 (BD Biosciences). A partir das intensidades médias de fluorescência de concentrações conhecidas, fornecidas pelo Kit, o programa de análise construiu curvas-padrão para cada citocina e determinou as concentrações de cada uma delas no soro testado automaticamente (Figura 19).

Tabela 6- Limite de detecção do kit *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences)

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

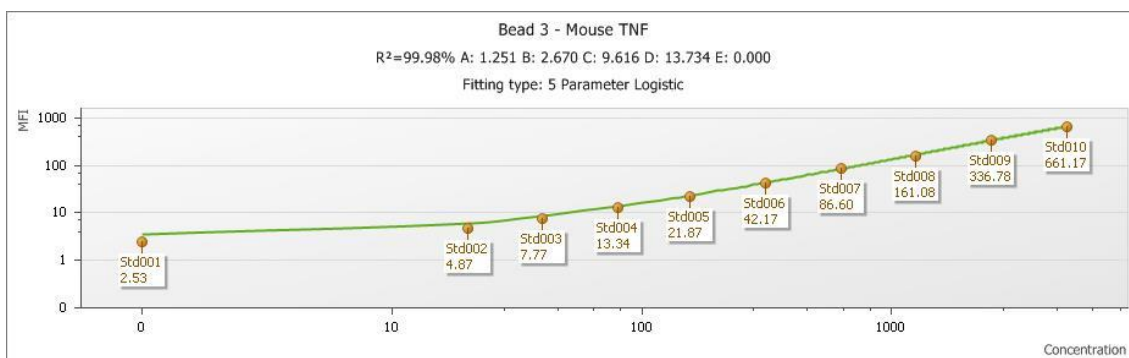


Figura 19- Exemplo de curva-padrão de TNF obtida no programa *FCAP Array* versão 3.0

3.7 Avaliação do timo

3.7.1 Massa relativa do timo

Camundongos de cada grupo de estudo foram pesados em uma balança digital (Shimadzu, modelo BL320H). Após a eutanásia, os timos foram retirados e também foram pesados. A massa relativa do timo, também denominada índice tímico, foi calculada através da relação entre a massa do timo e a massa corporal do respectivo camundongo pela seguinte fórmula:

$$\text{Massa relativa do timo} = \frac{\text{massa do timo (mg)}}{\text{massa corporal do camundongo (g)}}$$

3.7.2 Celularidade e imunofenotipagem de timócitos

Após a remoção do timo, o órgão foi colocado em um *Potter* contendo 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e macerado delicadamente. As células desprendidas foram recolhidas em tubos de 15 mL e centrifugadas (350 x g, por 5 minutos a 20°C). O número de células e a viabilidade celular foram determinados por contagem em câmara de Neubauer utilizando o corante vital Azul de Tripán (Sigma-Aldrich) a 0,1%, segundo a fórmula abaixo. A concentração de células foi ajustada para 1 x 10⁶ células viáveis/mL.

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

Em cada poço de uma placa com fundo em "U" (Nunc), foram depositadas 1 X 10⁶ células para caracterização fenotípica de linfócitos T. As placas foram centrifugadas (5 minutos, 350 X g, a 20 °C) e, em seguida, as células foram ressuspensas em 20 µL de tampão de bloqueio – solução de PBS com 0,1% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma) contendo 10 µg/mL

de anticorpo 2.4G2 (anti-CD16/CD32, BD Biosciences). Após incubação de 15 minutos à 20 °C, foram adicionados 10 µL de tampão de bloqueio contendo os anticorpos de superfície anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD3 conjugados com FITC, APC e PE, respectivamente. Após uma nova incubação (30 min a 4 °C), duas lavagens foram realizadas com 100 µL e depois com 150 µL de PBS/ 0,1% de BSA por centrifugação (350 X g, 5 minutos, 20 °C). Em seguida, as células foram fixadas com 100µL de paraformaldeído (PFA, Sigma-Aldrich) a 1% por 15 min. Mais duas lavagens foram realizadas com a solução PBS / 0,1% BSA (350 X g, 5 minutos, 20 °C). Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 150 µL de solução PBS / 0,1% de BSA e transferidas para tubos próprios para leitura em citômetro de fluxo. As leituras foram realizadas em até 24h após a marcação no citômetro de fluxo FACSCantoll (BD Bioscience) do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (IOC/FIOCRUZ). Os dados obtidos foram analisados no programa *FlowJo* versão 7.5.5 (TreeStar, Estados Unidos).

3.8 Avaliação dos linfonodos

3.8.1 Obtenção e imunofenotipagem das células dos linfonodos

Após a eutanásia dos animais, os linfonodos de drenagem das lesões nas orelhas (submandibulares e submandibulares acessórios, total de 4, (Figura 18) os linfonodos subcutâneos (4 cervicais, 2 axilares, 2 braquiais e 2 inguinais), e mesentéricos (cadeia mesentérica, total de 4) (Figura 20) foram retirados e colocados em tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) com 10% de SFB (Gibco-Invitrogen, Estados Unidos). Os órgãos foram macerados manualmente com o auxílio de um homogeneizador de tecidos tipo *Potter*. As células desprendidas foram recolhidas em tubos de 15 mL e centrifugadas (350 x g, 5 minutos, 20 °C). O número de células e a viabilidade celular foram determinados por contagem em câmara de Neubauer utilizando o corante vital Azul de Tripán (Sigma-Aldrich). Como descrito no item 3.7.2, o número de células e a viabilidade celular foram determinados por

contagem em câmara de Neubauer utilizando o corante vital Azul de Tripan (Sigma-Aldrich) e em seguida, a marcação extracelular foi realizada.

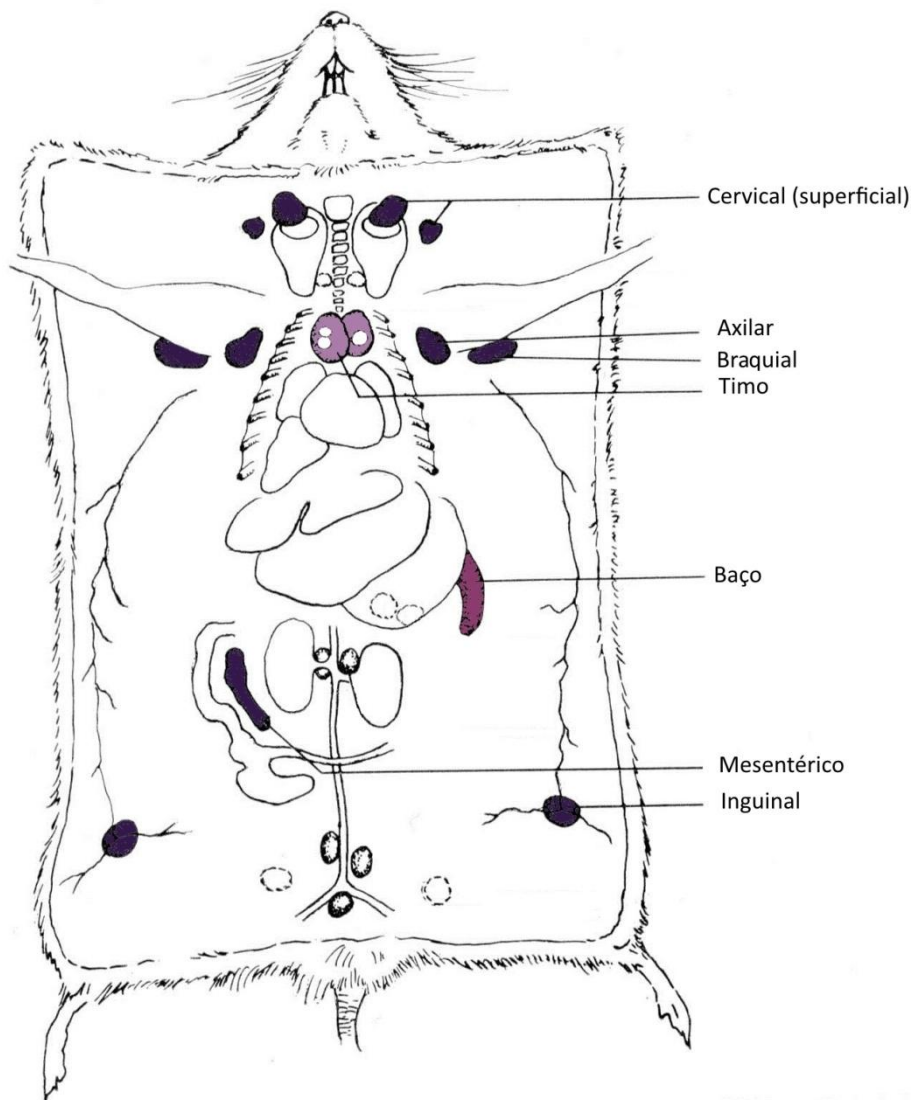


Figura 20- Localização dos linfonodos cervicais, axilares, braquiais, inguinais e mesentéricos em camundongo. Adaptado de Dunn, 1954 (308).

3.9 Avaliação do baço

3.9.1 Obtenção e imunofenotipagem de esplenócitos

Após a eutanásia dos camundongos selecionados em cada ponto de estudo, os baços foram retirados de forma asséptica e colocados em placas de

Petri contendo 5 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Em seguida, os órgãos foram macerados com o auxílio de uma peneira de nylon (BD Falcon *Cell Strainer* 70 µm) e um êmbolo de seringa estéril. O material foi recolhido em tubos tipo Falcon de 50 mL e após completar o volume para 15 mL com RPMI 1640 foi centrifugado (400 x g, 10 min, 10 °C). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi desprezado e as células foram submetidas a mais 2 lavagens com 10 mL de meio RPMI 1640, quantificadas e a viabilidade celular foi avaliada pelo corante vital Azul de Tripán (Sigma-Aldrich). Em seguida, as células obtidas foram marcadas com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 conforme descrito no item 3.7.2.

3.10 Análise estatística

O tamanho dos grupos experimentais foi determinado através do *software* G*Power versão 3.1.9. Para isso, foi feita uma análise *a Priori* levando em consideração o teste estatístico que seria utilizado nas análises futuras (teste não-paramétrico de Mann-Whitney), tamanho de efeito igual a 1, nível de significância de 5% e poder estatístico de 80 à 95%.

Os resultados de parasitemia, medida de lesão, nível de citocinas e perfis celulares foram avaliados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. O aparecimento de úlceras foi avaliado pelo teste Qui-quadrado e as curvas de sobrevivência pelos testes de Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon. Todas as análises foram realizadas no programa *GraphPad Prism* versão 6.0 (GraphPad Software, Estados Unidos). Foram considerados estatisticamente significativos os dados que apresentavam $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Alterações parasitológicas

4.1.1 Infecção por *P. yoelii* 17XNL

O inóculo intraperitoneal com 1×10^6 hemácias parasitadas por *P. yoelii* 17XNL foi capaz de estabelecer a infecção em 100% dos animais dos grupos Py, Lb+Py e La+Py. Os parasitos foram detectados no sangue periférico dos camundongos a partir do terceiro dia de infecção. Foi observado um aumento progressivo da parasitemia com um pico discreto no dia 5 e outro entre os dias 10 e 17 da infecção por *P. yoelii* 17XNL. A partir do dia 17, a parasitemia começou a diminuir rapidamente não sendo mais detectadas formas sanguíneas de plasmódio em, no máximo, 30 dias.

A parasitemia média do grupo coinfectado com *L. braziliensis* (21,37%) ao longo da infecção foi menor do que a parasitemia do grupo infectado apenas com *P. yoelii* (25,92%). Houve diferença estatística entre as parasitemias dos grupos Py e Lb+Py nos dias 3 ($P=0,004$), 11 ($P= 0,029$), 13 ($P= 0,032$) e 19 ($P= 0,040$) de infecção. Além disso, houve redução do período patente nos camundongos coinfectados em relação aos monoinfectados (Figura 21A). No grupo La+Py, ao contrário, a parasitemia média foi maior (28,11%) do que a parasitemia do grupo infectado apenas com plasmódio (27,85%). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as parasitemias dos grupos Py e La+Py no dia 5 ($P= 0,015$) (Figura 21B). O período patente foi maior no grupo Py+La em comparação com os demais (Figura 21A e B). Tanto no grupo Py quanto nos grupos coinfectados, Lb+Py e La+Py, foi observada uma proporção maior de trofozoítos do que de esquizontes em todos os dias avaliados. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação as proporções das duas formas parasitárias entre os grupos Py e Lb+Py/La+Py.

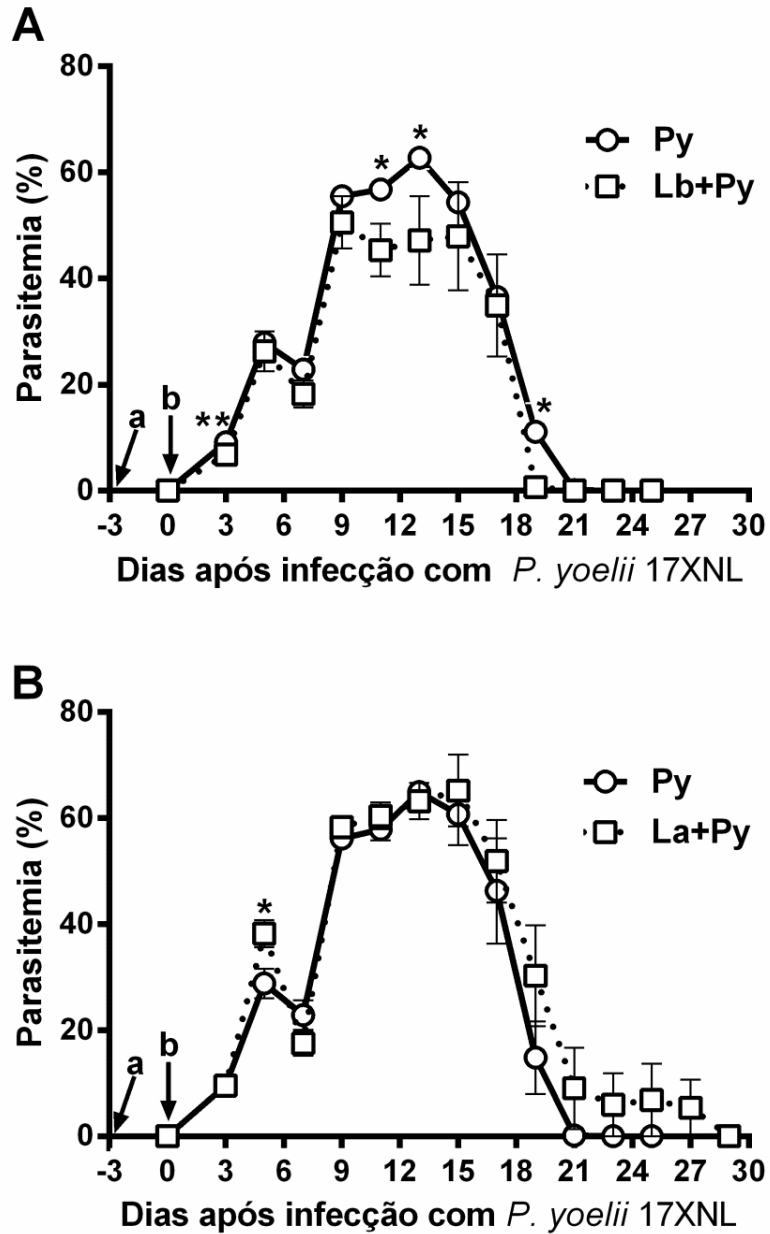


Figura 21- Comparação entre as parasitemias dos animais dos grupos monoinfectados e coinfectados. A) Comparação entre as parasitemias dos grupos *P. yoelii* 17XNL (Py) e coinfectado com *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Comparação entre as parasitemias dos grupos Py e coinfectado com *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL (La+Py). Os asteriscos assinalam os dias em que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Mann-Whitney: (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$. As barras representam as médias \pm erro padrão da média, a e b representam a infecção com *Leishmania* sp. e *P. yoelii*, respectivamente. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

4.1.2 Infecção por *L. braziliensis*

Camundongos infectados com 1×10^5 promastigotas de *L. braziliensis* por via intradérmica, dos grupos Lb e Lb+Py, desenvolveram lesões que foram observadas ao longo do período de estudo. As lesões do grupo Lb começaram a ser visíveis a partir da segunda semana (dia 14) enquanto as lesões do grupo Lb+Py começaram a ser visíveis a partir da terceira semana (dia 21) após infecção com *L. braziliensis*. As lesões do grupo coinfectado Lb+Py foram, em média, menores (1,15 mm) do que as lesões do grupo Lb (1,47 mm). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tamanhos das lesões dos grupos Lb e Lb+Py 14 dias ($P=0,0001$), 21 dias ($P= 0,001$), 35 dias ($P= 0,002$) e 42 dias ($P= 0,031$) após infecção com *L. braziliensis*. Em ambos os grupos, as lesões atingiram o tamanho máximo na quinta semana (dia 35) após infecção e depois começaram a regredir espontaneamente (Figura 22A). Foram observadas úlceras nas lesões dos grupos Lb e Lb+Py. Contudo, no grupo Lb as úlceras apareceram mais precocemente e em um percentual maior de lesões (83,3%) quando comparado ao grupo Lb+Py (40,9%). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o percentual de lesões ulceradas nos grupos Lb e Lb+Py a partir da sétima semana ($P= 0,048$) (Figura 22B).

Foram detectados parasitos nas orelhas e nos linfonodos de drenagem das lesões dos animais dos dois grupos pelo método da diluição limitante. Contudo, no grupo Lb os parasitos foram detectados mais precocemente nas orelhas (14 dias) do que no grupo Lb+Py (21 dias). Em relação à carga parasitária, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas orelhas (Figura 23A). Já nos linfonodos, a carga parasitária do grupo Lb+Py foi significativamente menor do que no grupo Lb 28 dias após infecção com *L. braziliensis* ($P= 0,001$) (Figura 23B).

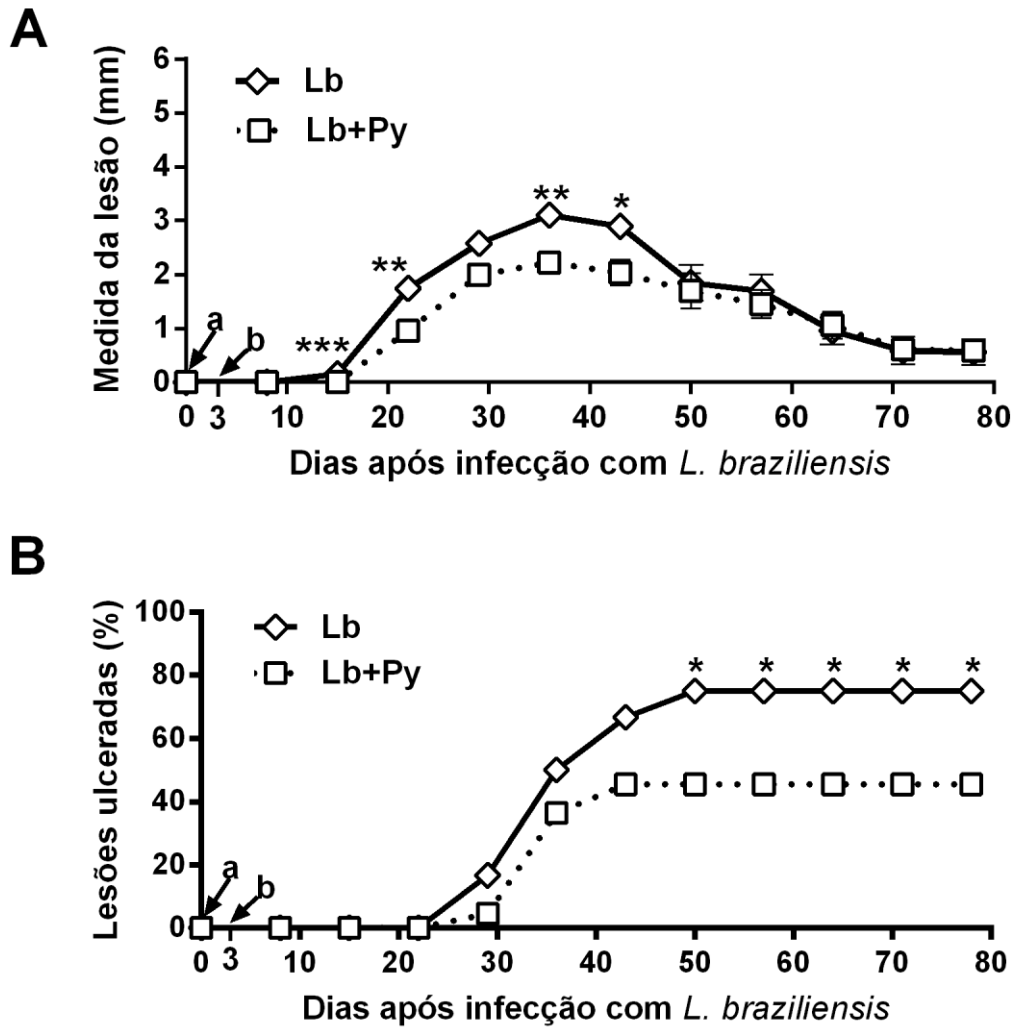


Figura 22- Comparação entre o desenvolvimento de lesões e o aparecimento de úlceras em animais dos grupos *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). A) Comparação entre o desenvolvimento de lesões nos grupos Lb e Lb+Py. B) Comparação entre o percentual de lesões ulceradas nos grupos Lb e Lb+Py. Os asteriscos assinalam os dias em que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Mann-Whitney em A ou pelo teste Qui-quadrado em B: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. As barras representam as médias \pm erro padrão da média, a e b representam a infecção com *L. braziliensis* e *P. yoelii*, respectivamente. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

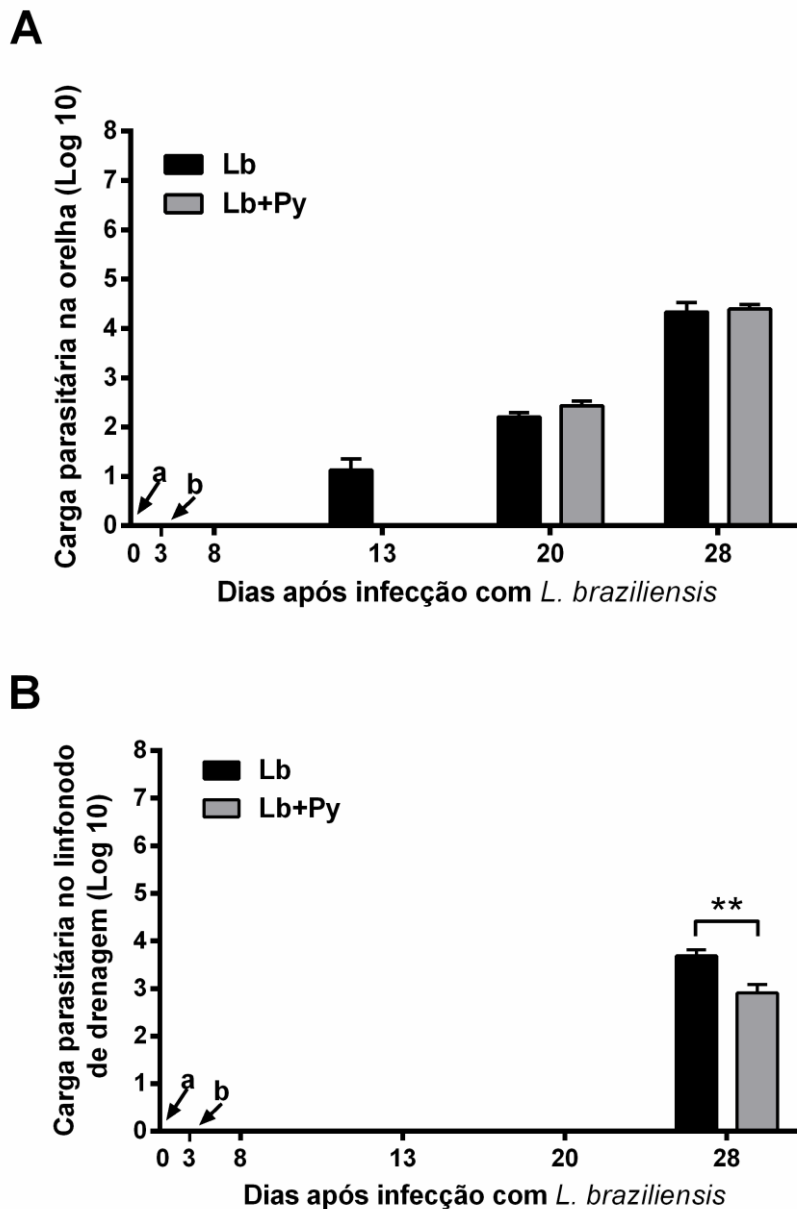


Figura 23- Carga parasitária nas orelhas e nos linfonodos de drenagem dos grupos *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* (Lb+Py). A) Comparação entre a carga parasitária das orelhas dos grupos Lb e Lb+Py. B) Comparação entre a carga parasitária dos linfonodos de drenagem das lesões dos grupos Lb e Lb+Py. Os asteriscos assinalam o dia em que foi encontrada diferença estatisticamente significativa pelo teste de Mann-Whitney: (**) $p < 0,01$. As barras representam as médias \pm erro padrão da média, a e b representam a infecção com *L. braziliensis* e *P. yoelii*, respectivamente. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

4.1.3 Infecção por *L. amazonensis*

Todos os camundongos infectados com 1×10^4 promastigotas de *L. amazonensis* por via intradérmica dos grupos La e La+Py desenvolveram lesões que aumentaram de tamanho de forma progressiva, sem cura espontânea. As lesões do grupo coinfectado La+Py foram, em média, menores (2,90 mm) do que as lesões do grupo La (3,21 mm). As lesões do grupo coinfectado La+Py foram significativamente menores do que as lesões do grupo La durante o período que compreende a fase aguda da malária (primeiros 30 dias). A partir deste momento, as lesões dos grupos mono e coinfectados apresentaram tamanhos similares até o final do acompanhamento (Figura 24A). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tamanhos das lesões dos grupos La e La+Py 14 dias ($P < 0,0001$), 21 dias ($P < 0,0001$) e 28 dias ($P = 0,007$) após infecção com *L. amazonensis*. Em ambos os grupos, La e La+Py, foram observadas úlceras nas lesões. Contudo, no grupo La as úlceras apareceram mais precocemente. No final do experimento, todas as lesões dos dois grupos apresentavam úlceras reforçando o caráter crônico das lesões cutâneas causadas por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c (Figura 24B).

Pelo método de diluição limitante, foram detectados parasitos nas orelhas e nos linfonodos de drenagem das lesões dos animais dos grupos La e La+Py. A carga parasitária nas orelhas do grupo coinfectado La+Py foi significativamente maior do que a carga parasitária nas orelhas dos animais do grupo La no dia 28 ($P = 0,001$). Nos linfonodos, a carga parasitária do grupo La+Py foi significativamente maior do que no grupo La 13 dias ($P = 0,002$), 20 dias ($P = 0,033$) e 28 dias ($P = 0,015$) após infecção com *L. amazonensis* (Figura 25).

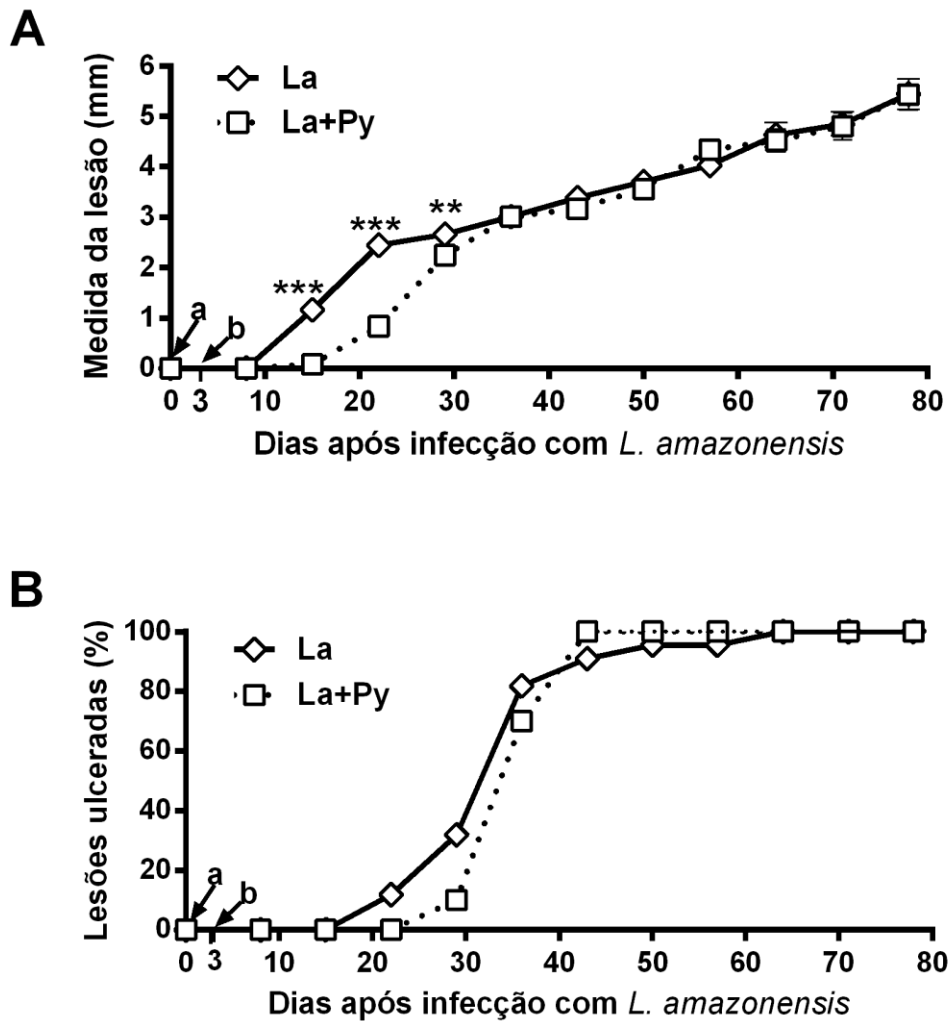


Figura 24- Comparação entre o desenvolvimento de lesões e o aparecimento de úlceras em animais dos grupos *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* (La+Py). A) Comparação entre o desenvolvimento de lesões nos grupos La e La+Py. B) Comparação entre o percentual de lesões ulceradas nos grupos La e La+Py. Os asteriscos assinalam os dias em que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Mann-Whitney: (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. As barras representam as médias \pm erro padrão da média, a e b representam a infecção com *L. amazonensis* e *P. yoelii*, respectivamente. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

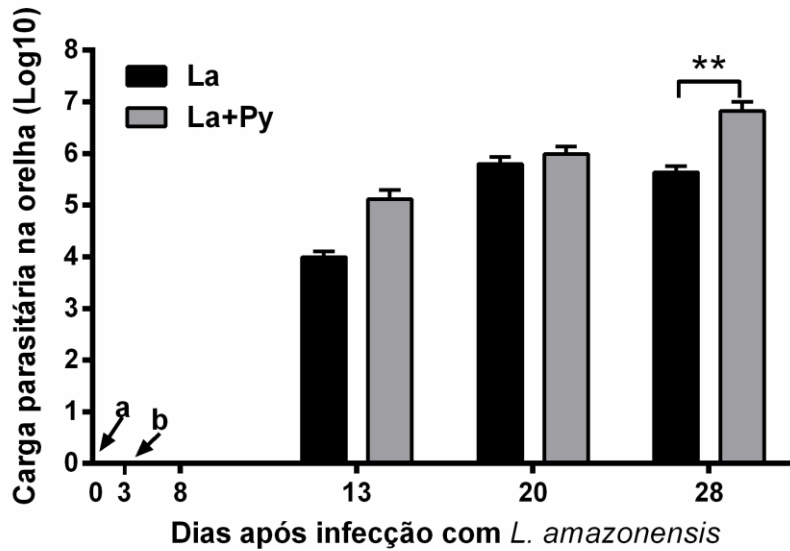
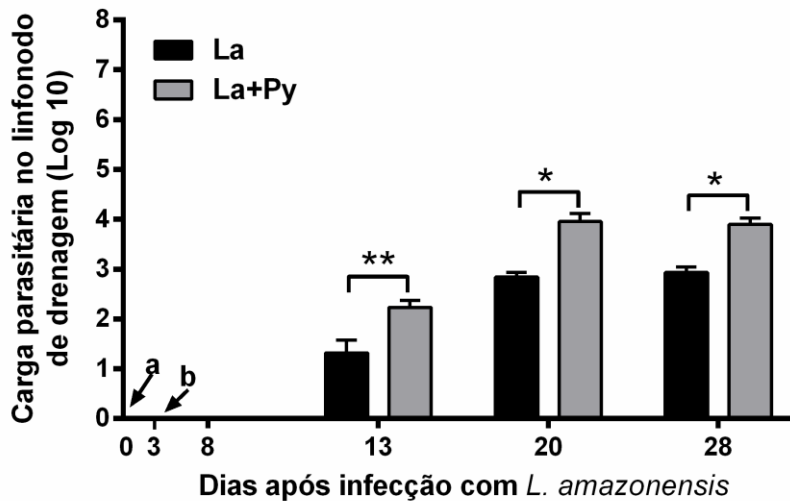
A**B**

Figura 25- Carga parasitária nas orelhas e nos linfonodos de drenagem dos grupos *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* (La+Py). A) Comparação entre a carga parasitária das orelhas dos grupos La e La+Py. B) Comparação entre a carga parasitária dos linfonodos de drenagem das lesões dos grupos La e La+Py. Os asteriscos assinalam os dias em que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Mann-Whitney: (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. As barras representam as médias \pm erro padrão da média, a e b representam a infecção com *L. amazonensis* e *P. yoelii*, respectivamente. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

4.2 Taxa de sobrevivência

As monoinfecções por *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ou *P. yoelii* 17XNL não provocaram a morte dos animais assim como a coinfeção por *L. braziliensis* e *P. yoelii* 17XNL (Figura 26A). Já a coinfeção por *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL diminuiu significativamente a taxa de sobrevivência dos animais deste grupo ($P= 0,035$) (Figura 26B).

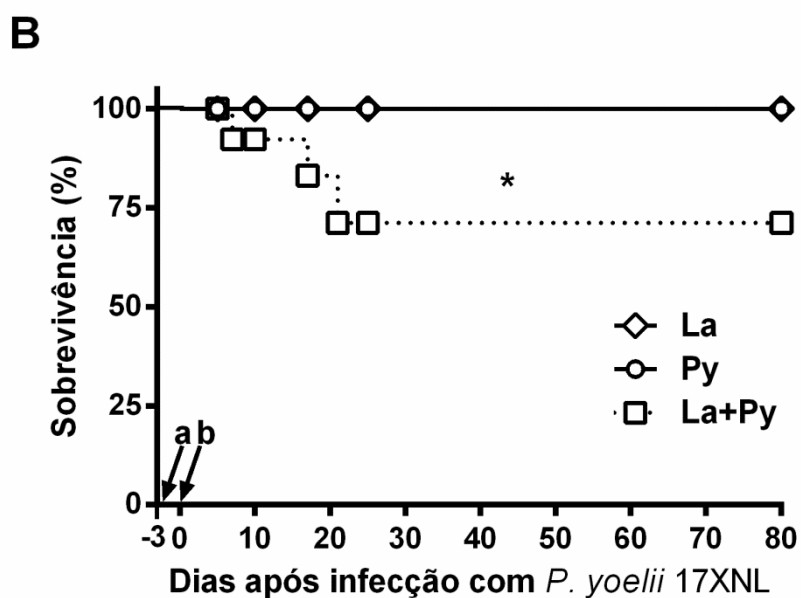
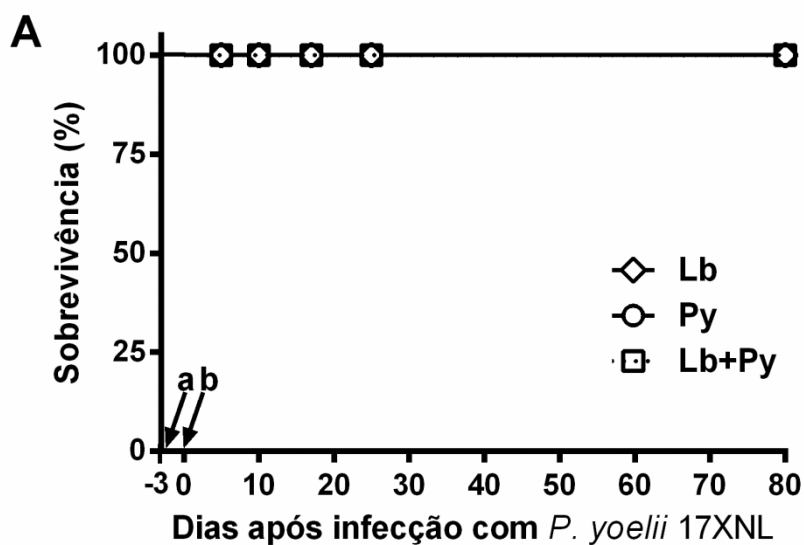


Figura 26- Taxa de sobrevivência nos grupos mono infectados e co infectados. A) Comparação entre a taxa de sobrevivência dos grupos *L. braziliensis* (Lb), *P. yoelii* 17XNL e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Comparação entre a taxa de sobrevivência dos grupos *L. amazonensis* (La), *P. yoelii* 17XNL (Py) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL (La+Py). O asterisco assinala diferença estatisticamente significativa entre as curvas dos animais mono e co infectados pelo teste de Mantel-Cox: (*) $p < 0,05$. a e b representam a infecção com *Leishmania* sp. e *P. yoelii*, respectivamente.

4.3 Citocinas séricas

O nível de citocinas séricas foi determinado em amostras de soro de 4 a 6 animais de cada grupo de estudo nos dias 5, 10, 17 e 25 do experimento. Foi observado um aumento importante na concentração de IFN- γ no dia 5 de infecção nos grupos mono infectado com *P. yoelii* e co infectados (Lb+Py e La+Py) (Figura 27). No dia 10, os níveis de IFN- γ no grupo Py já eram menores do que os níveis encontrados no dia 5, porém permaneceram significativamente mais elevados do que os valores encontrados nos animais do grupo controle (Tabela 7). O mesmo foi observado nos grupos co infectados. Os níveis de TNF, IL-6 e IL-10 aumentaram nos grupos mono e co infectados com plasmódio nos dias 5, 10 e 17 em relação ao grupo controle. No dia 25, os animais do grupo Py ainda apresentavam aumento importante nos níveis de TNF e IL-6 e um aumento discreto nos níveis de IL-10. Nos grupos co infectados Lb+Py e La+Py os níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 foram sempre menores do que os níveis de citocinas dos camundongos do grupo Py, sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas em alguns momentos conforme indicado na Tabela 7. Foi observada uma tendência do grupo Lb+Py apresentar níveis de TNF, IL-6 e IL-10 mais elevados do que o grupo La+Py nos dias 5 e 10 após infecção com *P. yoelii* 17XNL. Contudo, só foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de citocinas dos dois grupos co infectados em relação a IL-6 no dia 10 ($P= 0,037$).

Não foram observadas alterações importantes nos níveis das citocinas nos soros dos grupos Lb e La em comparação aos valores encontrados no grupo controle, exceto pelo aumento de IL-10 no dia 25 no grupo La que, no entanto, não apresentou significância estatística.

As citocinas IL-2, IL-4 e IL-17 também foram testadas, mas não foram detectadas nos soros dos animais avaliados de nenhum dos grupos de estudo.

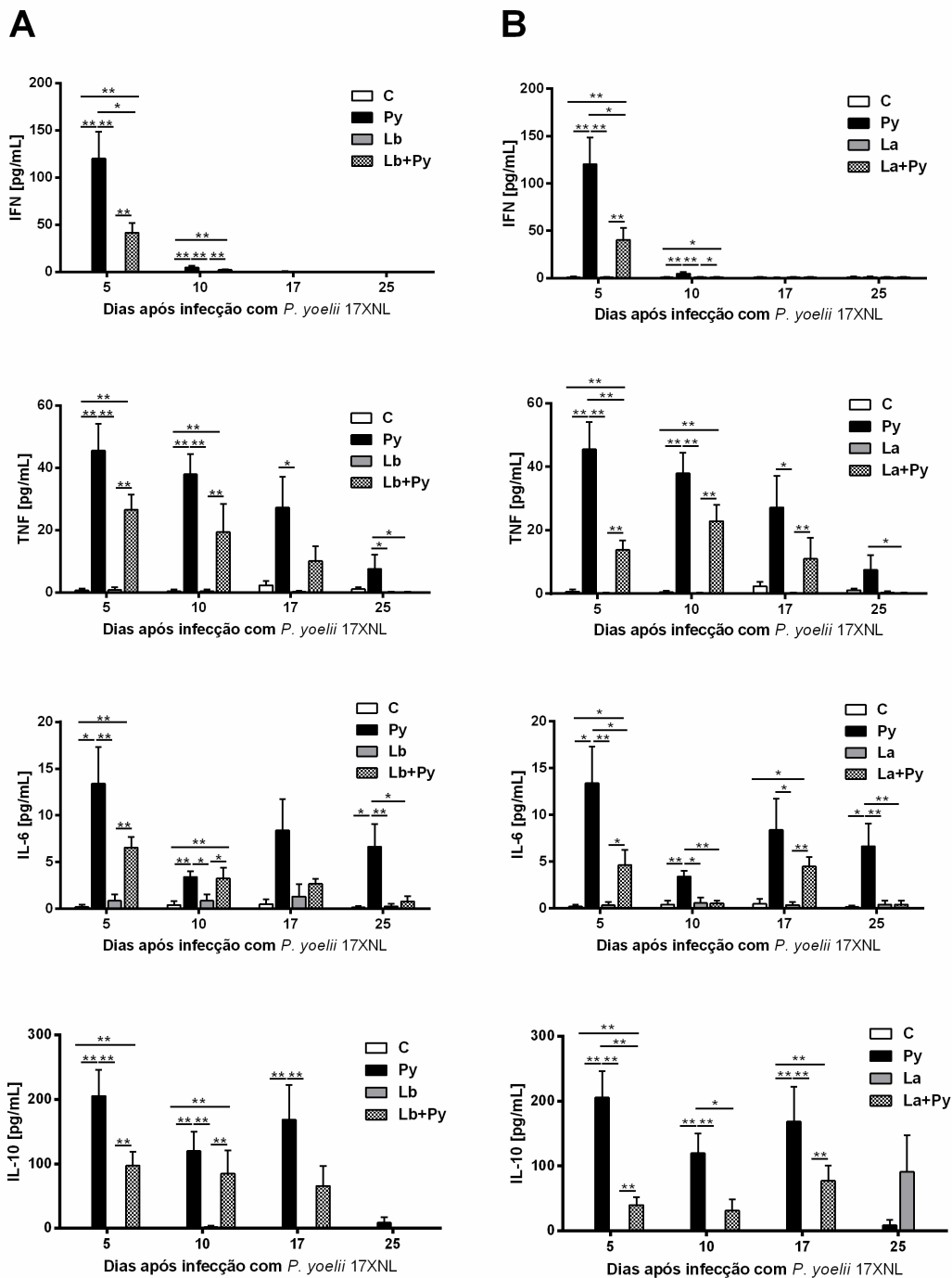


Figura 27- Cinética de citocinas no soro de animais mono infectados e co infectados. A) Nível de citocinas nos grupos *P. yoelii* 17XNL (Py), *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Nível de citocinas nos grupos Py, *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL (La+Py). Os asteriscos assinalam os dias em que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Mann-Whitney: (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. As barras representam as médias \pm erro padrão da média.

Tabela 7- Valores de *P* encontrados na comparação dos níveis de citocinas séricas de camundongos dos grupos controle, monoinfectados e coinfectados.

	Grupos	5 dias					10 dias					17 dias					25 dias				
		C	Py	Lb	La	Lb+Py	C	Py	Lb	La	Lb+Py	C	Py	Lb	La	Lb+Py	C	Py	Lb	La	Lb+Py
IFN- γ	Py	0,008	-	-	-	-	0,008	-	-	-	-	Ns	-	-	-	-	ns	-	-	-	-
	Lb	ns	0,004	-	-	-	ns	0,009	-	-	-	Ns	ns	-	-	-	ns	ns	-	-	-
	La	ns	0,004	ns	-	-	ns	0,004	ns	-	-	Ns	ns	ns	-	-	ns	ns	ns	-	-
	Lb+Py	0,004	0,017	0,002	0,002	-	0,004	ns	0,002	0,002	-	Ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	-
	La+Py	0,004	0,017	0,002	0,002	ns	0,022	ns	0,035	0,015	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
TNF	Py	0,008	-	-	-	-	0,008	-	-	-	-	Ns	-	-	-	-	ns	-	-	-	-
	Lb	ns	0,004	-	-	-	ns	0,004	-	-	-	Ns	0,048	-	-	-	ns	0,041	-	-	-
	La	ns	0,004	ns	-	-	ns	0,004	ns	-	-	Ns	0,028	ns	-	-	ns	ns	ns	-	-
	Lb+Py	0,004	ns	0,002	0,002	-	0,009	ns	0,004	0,002	-	Ns	ns	ns	0,028	-	ns	0,041	ns	ns	-
	La+Py	0,004	0,009	0,002	0,002	ns	0,004	ns	0,002	0,002	ns	Ns	ns	0,015	0,004	ns	ns	0,041	ns	ns	Ns
IL-6	Py	0,016	-	-	-	-	0,008	-	-	-	-	Ns	-	-	-	-	0,016	-	-	-	-
	Lb	ns	0,004	-	-	-	ns	0,039	-	-	-	Ns	ns	-	-	-	ns	0,007	-	-	-
	La	ns	0,004	ns	-	-	ns	0,039	ns	-	-	Ns	0,028	ns	-	-	ns	0,008	ns	-	-
	Lb+Py	0,009	ns	0,004	0,002	-	0,002	ns	0,049	0,009	-	0,049	ns	ns	0,002	-	ns	0,017	ns	ns	-
	La+Py	0,048	0,046	0,019	0,015	ns	ns	0,004	ns	ns	0,037	0,017	ns	ns	0,002	ns	ns	0,009	ns	ns	Ns
IL-10	Py	0,008	-	-	-	-	0,008	-	-	-	-	0,008	-	-	-	-	ns	-	-	-	-
	Lb	ns	0,004	-	-	-	ns	0,004	-	-	-	Ns	0,008	-	-	-	ns	ns	-	-	-
	La	ns	0,004	ns	-	-	ns	0,004	ns	-	-	Ns	0,004	ns	-	-	ns	ns	ns	-	-
	Lb+Py	0,004	ns	0,002	0,002	-	0,004	ns	0,004	0,002	-	Ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	-
	La+Py	0,004	0,009	0,002	0,002	ns	ns	0,030	ns	ns	ns	0,004	ns	0,004	0,002	ns	ns	ns	ns	ns	Ns

ns= não significativo; C= controle; Py= *P. yoelii* 17XNL; Lb= *L. braziliensis*; La= *L. amazonensis*, Lb+Py= *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL; e La+Py= *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL.

4.4 Avaliação do timo

4.4.1 Massa relativa

Os animais infectados com *P. yoelii* 17XNL dos grupos mono infectados (Py) e co infectados (Lb+Py e La+Py) apresentaram uma redução significativa da massa relativa do timo a partir do décimo dia de infecção quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 28 e Tabela 8). No grupo Py a atrofia tímica persistiu até 25 dias após infecção com plasmódio enquanto os grupos co infectados Lb+Py e La+Py apresentaram uma recuperação tímica mais precoce. Nos grupos Lb e La não foram observadas alterações na massa relativa do timo em relação ao grupo controle em nenhum dos dias avaliados (Figura 28).

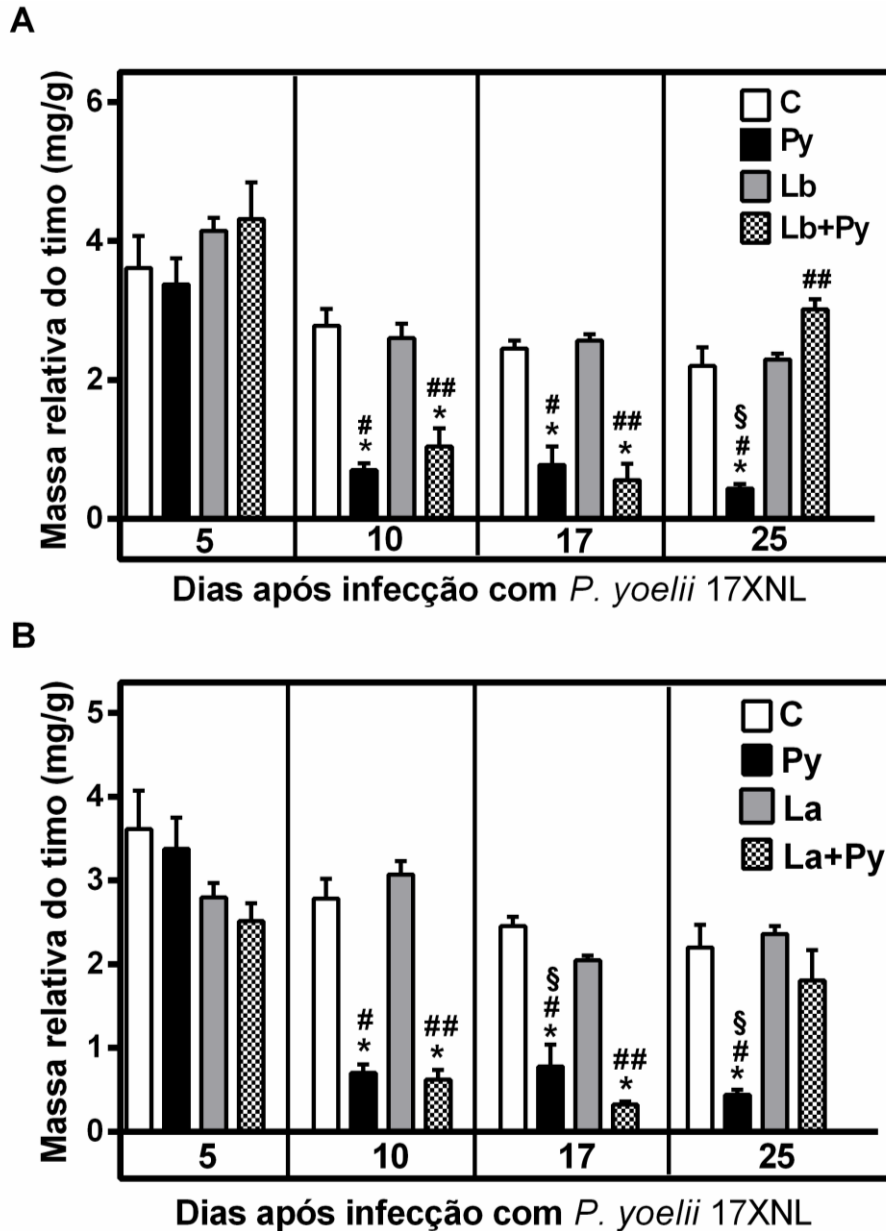


Figura 28- Comparação entre a massa relativa do timo nos grupos controle, monoinfectados e coinfectados. A) Massa relativa do timo nos grupos controle (C), *P. yoelii* 17XNL (Py), *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Massa relativa do timo nos grupos controle C, Py, *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL (La+Py). (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, (#) ao grupo *Leishmania* spp. e (§) ao grupo coinfectado. As análises foram realizadas através do teste de Mann-Whitney. As barras representam as médias \pm erro padrão da média. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

Tabela 8-Valores de *P* encontrados na comparação da massa relativa dos timos de camundongos dos grupos controle, mono infectados e co infectados.

	Grupos	C	Py	Lb	La	Lb+Py
5 dias	Py	ns	-	-	-	-
	Lb	ns	ns	-	-	-
	La	ns	ns	0,008	-	-
	Lb+Py	ns	ns	ns	Ns	-
	La+Py	ns	ns	0,008	Ns	ns
10 dias	Py	0,029	-	-	-	-
	Lb	ns	0,016	-	-	-
	La	ns	0,016	ns	-	-
	Lb+Py	0,016	ns	0,008	0,008	-
	La+Py	0,016	ns	0,008	0,008	ns
17 dias	Py	0,029	-	-	-	-
	Lb	ns	0,016	-	-	-
	La	ns	0,016	0,008	-	-
	Lb+Py	0,016	ns	0,008	0,008	-
	La+Py	0,016	0,032	0,008	0,008	ns
25 dias	Py	0,0286	-	-	-	-
	Lb	ns	0,016	-	-	-
	La	ns	0,016	ns	-	-
	Lb+Py	ns	0,016	0,008	0,016	-
	La+Py	ns	0,032	ns	Ns	0,016

ns= não significativo; C= controle; Py= *P. yoelii* 17XNL; Lb= *L. braziliensis*; La= *L. amazonensis*, Lb+Py= *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL; e La+Py= *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL.

4.4.2 Celularidade

A atrofia tímica foi acompanhada de redução da celularidade no timo dos animais dos grupos Py, Lb+Py e La+Py após 10 dias de infecção com *P. yoelii* 17XNL (Tabela 9 e Figura 29). Além disso, foi observada uma redução estatisticamente significativa no número absoluto de timócitos nos grupos La e La+Py no dia 5 do experimento em relação ao grupo controle e ao grupo Lb

(Tabela 10). No grupo Lb, foi observado uma discreta redução na celularidade do timo em relação ao grupo controle no dia 10, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Tabela 9- Número absoluto de subpopulações celulares no timo

		Total	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
5 dias	C	295.0 ± 82.26	40.17 ± 21.22	17.20 ± 6.93	206.5 ± 31.17	30.88 ± 32.38
	Py	261.3 ± 108.80	33.60 ± 14.91	14.10 ± 9.54	195.3 ± 80.77	18.16 ± 20.50
	Lb	295,8 ± 76.77	37.50 ± 17.20	15.39 ± 8.71	201.1 ± 68.49	41.83 ± 48.48
	La	135.0 ± 63.80	21.91 ± 3.75	5.31 ± 4.37	206.5 ± 31.17	102.4 ± 57.01
	Lb+Py	290.8 ± 131.30	45.79 ± 24.01	15.79 ± 5.78	212.6 ± 92.43	16.60 ± 12.07
	La+Py	163.3 ± 20.66	21.16 ± 3.73	6.99 ± 2.92	195.3 ± 80.77	129.3 ± 16.68
10 dias	C	213.5 ± 127.8	34.08 ± 29.62	7.07 ± 2.05	150.5 ± 74.34	21.47 ± 22.82
	Py	16.25 ± 11.41	4.96 ± 5.37	1.81 ± 1.90	8.86 ± 5.69	0.61 ± 0.60
	Lb	97.67 ± 35.69	11.59 ± 4.02	5.19 ± 3.44	78.89 ± 30.34	2.02 ± 1.26
	La	318.3 ± 90.42	48.90 ± 21.57	8.51 ± 3.14	251.15 ± 70.72	8,84 ± 4.03
	Lb+Py	25.33 ± 16.86	8.46 ± 2.72	3.80 ± 0.95	11.50 ± 14.86	1.57 ± 0.78
	La+Py	22.0 ± 14.16	2.37 ± 1.72	0.71 ± 0.58	18.52 ± 11.64	0.36 ± 0.24
17 dias	C	119.3 ± 18.89	11.25 ± 1.16	5.84 ± 3.65	96.31 ± 17.96	3.85 ± 1.28
	Py	4.75 ± 4.5	1.31 ± 0.84	0.86 ± 0.67	1.39 ± 2.18	0.56 ± 0.31
	Lb	156.0 ± 34.52	15.61 ± 5.15	11.34 ± 4.07	125.0 ± 25.47	4.01 ± 1.07
	La	127.2 ± 56.30	11.82 ± 4.21	3.44 ± 1.24	101.0 ± 48.19	5.28 ± 1.58
	Lb+Py	25.33 ± 35.21	2.76 ± 2.11	1.93 ± 1.80	19.30 ± 29.96	1.35 ± 1.58
	La+Py	1.67 ± 0.82	0.49 ± 0.20	0.27 ± 0.20	0.09 ± 0.11	0.22 ± 0.11
25 dias	C	171.3 ± 54.52	25.46 ± 9.20	7.95 ± 6.33	130.0 ± 56.76	7.91 ± 7.45
	Py	2.53 ± 2.36	0.75 ± 0.54	0.28 ± 0.21	0.99 ± 1.63	0.48 ± 0.35
	Lb	190.0 ± 32.25	23.22 ± 4.66	7.64 ± 2.16	154.2 ± 25.29	4.94 ± 1.10
	La	175.0 ± 36.33	27.37 ± 15.09	10.44 ± 2.15	128.8 ± 26.69	8,40 ± 3.32
	Lb+Py	276.7 ± 56.45	27.41 ± 7.10	6.72 ± 2.16	236.4 ± 45.93	6.15 ± 1.39
	La+Py	67.89 ± 87.45	10.46 ± 11.23	3.56 ± 6.28	50.29 ± 68.17	3.61 ± 3.11

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão da média. C= controle; Py= *P. yoelii* 17XNL; Lb= *L. braziliensis*; La= *L. amazonensis*, Lb+Py= *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL; e La+Py= *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL.

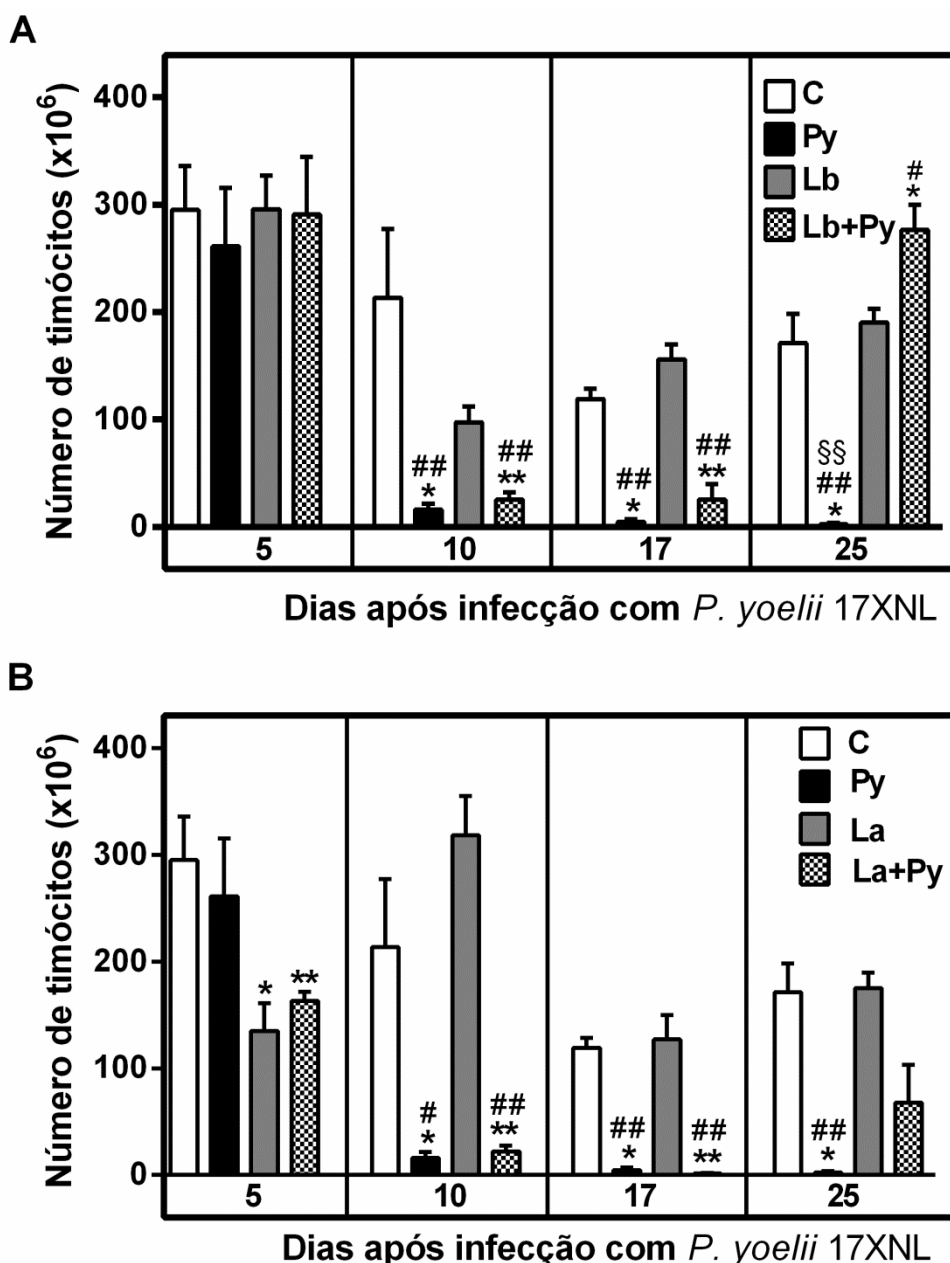


Figura 29- Número absoluto de timócitos nos grupos controle, mono infectados e coinfectados. A) Comparação entre o número de timócitos nos grupos controle (C), *P. yoelii* 17XNL (Py), *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Comparação entre o número de timócitos nos grupos controle C, Py, *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL (La+Py). (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, (#) ao grupo *Leishmania* spp. e (§) ao grupo coinfectado. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney. As barras representam as médias \pm erro padrão da média. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

Tabela 10- Valores de *P* encontrados na comparação do número absoluto de tímócitos de camundongos dos grupos controle, mono infectados e co infectados.

	Grupos	C	Py	Lb	La	Lb+Py
5 dias	Py	ns	-	-	-	-
	Lb	ns	ns	-	-	-
	La	0,019	ns	0,004	-	-
	Lb+Py	ns	ns	ns	0,041	-
	La+Py	0,009	ns	0,002	ns	ns
10 dias	Py	0,029	-	-	-	-
	Lb	ns	0,009	-	-	-
	La	ns	0,014	0,004	-	-
	Lb+Py	0,009	ns	0,002	0,002	-
	La+Py	0,009	ns	0,002	0,005	ns
17 dias	Py	0,029	-	-	-	-
	Lb	ns	0,009	-	-	-
	La	ns	0,009	ns	-	-
	Lb+Py	0,009	0,002	0,002	0,002	-
	La+Py	0,004	0,002	0,002	0,002	0,043
25 dias	Py	0,023	-	-	-	-
	Lb	ns	0,009	-	-	-
	La	ns	0,005	ns	-	-
	Lb+Py	0,038	0,009	0,022	0,002	-
	La+Py	ns	ns	ns	ns	0,009

ns= não significativo; C= controle; Py= *P. yoelii* 17XNL; Lb= *L. braziliensis*; La= *L. amazonensis*, Lb+Py= *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL; e La+Py= *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL.

Em relação as subpopulações celulares do timo, ocorreu uma redução no percentual de células duplo positivas (CD4⁺CD8⁺) e um aumento no percentual de células CD4⁺, CD8⁺ e duplo negativas (CD4⁻CD8⁻) nos grupos infectados com *P. yoelii*. Um aumento estatisticamente significativo de células CD4⁺ no grupo Py foi observado no dia 17 e persistiu até o dia 25 do experimento (Figura 30 e Tabela 11). No grupo co infectado Lb+Py o aumento no percentual de células CD4⁺ foi observado primeiramente no dia 10, persistiu

no dia 17, mas no dia 25 o percentual de células CD4⁺ já era discretamente menor do que o percentual encontrado no grupo controle (Figura 30A). Já no grupo La+Py o aumento transitório no percentual de células CD4⁺ foi observado mais tardiamente, no dia 17 como no grupo Py (Figura 30B). Foi observada a mesma dinâmica de aumento de células CD8⁺, em relação às células CD4⁺, nos grupos Py, Lb+Py e La+Py. O percentual de células duplo negativas aumentou no grupo Py nos dias 17 e 25 enquanto nos grupos coinfectados, Lb+Py e La+Py, esse aumento só foi observado no dia 17. Em paralelo, o percentual de células duplo positivas diminuiu significativamente no timo dos animais do grupo Py no dia 17, permanecendo reduzido até o dia 25. Essa redução no percentual de células duplo positivas foi observada mais precocemente no grupo Lb+Py (dia 10). Porém, no dia 25 o percentual de células duplo positivas no grupo coinfectado Lb+Py superou os valores encontrados para os grupos controle e monoinfectados. Já no grupo La+Py, o percentual de célula duplo positivas aumentou no dia 10, reduziu rapidamente no dia 17, mas no dia 25 atingiu valores semelhantes aos encontrados no grupo controle. Apesar de algumas diferenças na dinâmica das subpopulações celulares em relação à coinfecção com uma ou outra espécie de leishmânia, foi observado que, de uma maneira geral, a recuperação do padrão das subpopulações de timócitos ocorre mais rapidamente no grupo coinfectado do que no grupo monoinfectado com *P. yoelii* 17XNL.

A monoinfecção com *L. amazonensis* não alterou o perfil das subpopulações tímicas em comparação ao grupo controle nos dias avaliados. Já na monoinfecção com *L. braziliensis*, o percentual de células CD8⁺ nos dias 10 e 17 foi um pouco maior do que o percentual dessas células no timo dos animais do grupo controle. Ainda no grupo Lb+Py, o percentual de células DP foi maior e o percentual de células DN foi menor do que no grupo controle no dia 25.

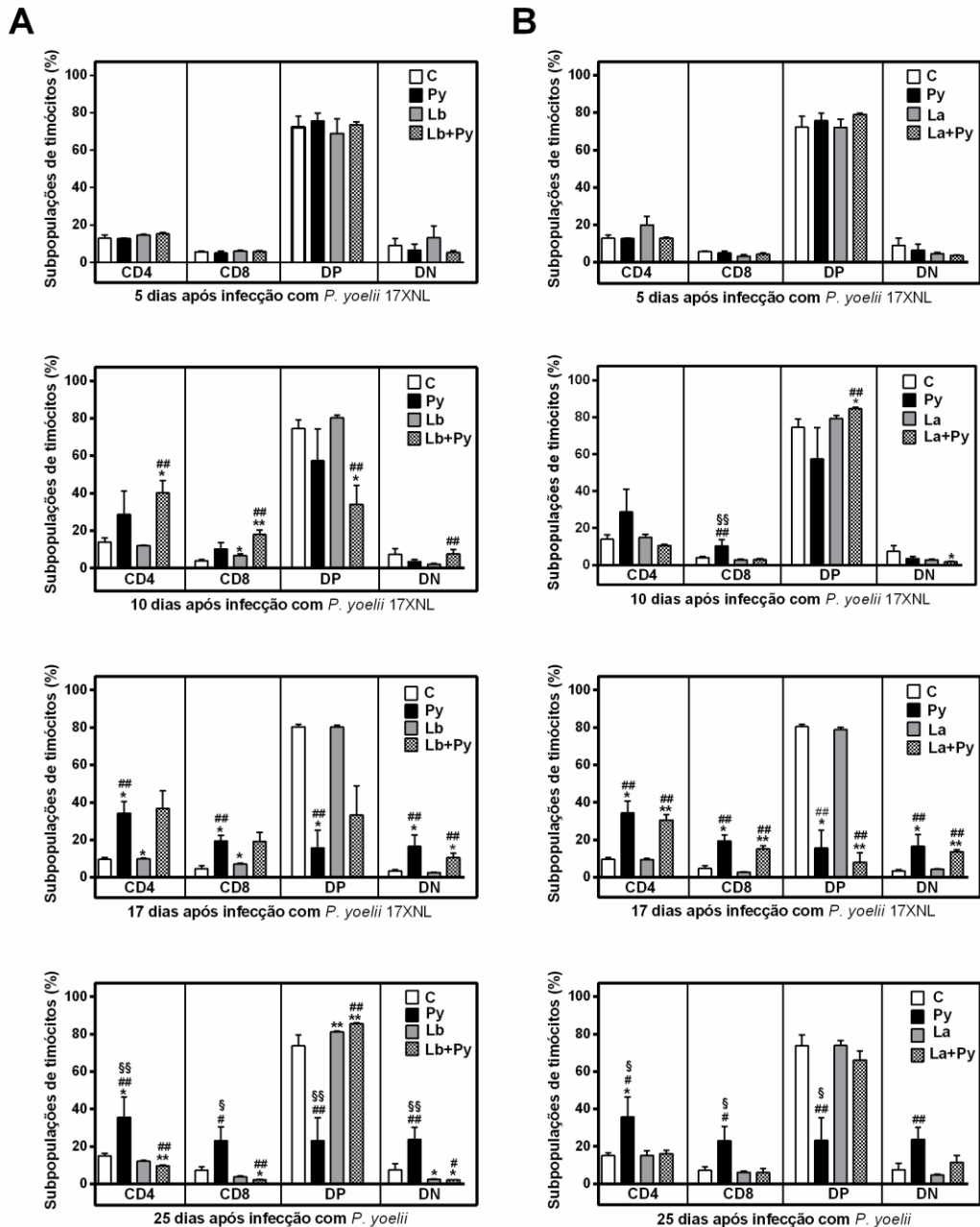


Figura 30- Percentual de subpopulações tímicas nos grupos controle, mono infectados e co infectados. A) Subpopulações de timócitos nos grupos controle (C), *P. yoelii* 17XNL (Py), *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Subpopulações de timócitos nos grupos C, Py, *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL (La+Py). (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, (#) grupo *Leishmania* sp. e (§) grupo co infectado pelo teste de Mann-Whitney. As barras representam as médias \pm erro padrão da média. Gráfico representativo de dois experimentos independentes. DP= duplo positivas e DN= duplo negativas.

Tabela 11- Valores de *P* encontrados na comparação do percentual das subpopulações de timócitos dos grupos controle, monoinfectados e coinfectedados.

	Grupos	5 dias					10 dias					17 dias					25 dias				
		C	Py	Lb	La	Lb+Py	C	Py	Lb	La	Lb+Py	C	Py	Lb	La	Lb+Py	C	Py	Lb	La	Lb+Py
CD4⁺	Py	ns	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	0,029	-	-	-	-	0,029	-	-	-	-
	Lb	ns	ns	-	-	-	ns	ns	-	-	-	ns	0,009	-	-	-	ns	0,009	-	-	-
	La	ns	ns	ns	-	-	ns	ns	ns	-	-	ns	0,009	ns	-	-	ns	0,038	ns	-	-
	Lb+Py	ns	ns	ns	ns	-	0,019	ns	ns	0,009	-	ns	ns	ns	ns	-	0,009	0,009	0,004	0,002	-
	La+Py	ns	ns	0,030	ns	0,026	ns	ns	ns	ns	0,002	0,009	ns	0,002	0,002	ns	ns	0,029	0,041	ns	0,002
CD8⁺	Py	ns	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	0,029	-	-	-	-	ns	-	-	-	-
	Lb	ns	ns	-	-	-	0,016	ns	-	-	-	0,038	0,009	-	-	-	ns	0,024	-	-	-
	La	ns	ns	0,030	-	-	ns	0,009	0,004	-	-	ns	0,009	0,002	-	-	ns	0,024	0,009	-	-
	Lb+Py	ns	ns	ns	0,041	-	0,009	ns	0,009	0,002	-	ns	ns	ns	0,002	-	0,024	0,024	0,004	0,002	-
	La+Py	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,009	0,004	ns	0,002	0,009	ns	0,002	0,002	ns	ns	0,048	ns	ns	0,026
DP	Py	ns	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	0,029	-	-	-	-	ns	-	-	-	-
	Lb	ns	ns	-	-	-	ns	ns	-	-	-	ns	0,009	-	-	-	0,009	ns	-	-	-
	La	ns	ns	ns	-	-	ns	ns	ns	-	-	ns	0,009	ns	-	-	ns	0,009	0,002	-	-
	Lb+Py	ns	ns	ns	ns	-	0,038	ns	0,002	0,002	-	ns	ns	ns	ns	-	0,009	0,009	0,002	0,002	-
	La+Py	ns	ns	ns	ns	0,015	ns	ns	0,024	0,009	0,002	0,009	ns	0,002	0,002	ns	ns	0,019	0,002	ns	0,002
DN	Py	ns	-	-	-	-	ns	-	-	-	-	0,029	-	-	-	-	ns	-	-	-	-
	Lb	ns	ns	-	-	-	ns	ns	-	-	-	ns	0,009	-	-	-	0,024	0,009	-	-	-
	La	ns	ns	ns	-	-	ns	ns	ns	-	-	ns	0,009	0,004	-	-	ns	0,009	0,002	-	-
	Lb+Py	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	0,002	0,004	-	0,038	ns	0,002	ns	-	0,024	0,009	0,026	0,002	-
	La+Py	ns	ns	ns	ns	ns	0,038	ns	ns	ns	0,002	0,009	ns	0,002	0,002	ns	ns	ns	0,002	ns	0,002

ns= não significativo; C= controle; Py= *P. yoelii* 17XNL; Lb= *L. braziliensis*; La= *L. amazonensis*, Lb+Py= *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL; e La+Py= *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL.

4.5 Avaliação dos linfonodos

Foram avaliados os linfócitos T presentes nos linfonodos submandibulares e submandibulares acessórios (linfonodos de drenagem das lesões dos animais infectados com *Leishmania* spp.), nos linfonodos subcutâneos (cervicais, axilares, braquiais e inguinais) e mesentéricos dos animais dos grupos controle, mono infectados e co infectados nos dias 5, 10, 17 e 25 do experimento. Em relação ao percentual de células CD3⁺, não foram observadas alterações importantes nos linfonodos submandibulares e submandibulares acessórios entre os grupos avaliados, exceto pela tendência de redução discreta no percentual de células CD3⁺ nos grupos Lb e La no dia 5 do experimento (8 dias após infecção com *Leishmania* spp.) e no dia 25 nos grupos Py, Lb, La, Lb+Py e La+Py em relação ao grupo controle. Os linfonodos subcutâneos do dia 5 apresentaram, entretanto, uma tendência de terem um percentual maior de células CD3⁺ nos grupos infectados com *P. yoelii* 17XNL (Py, Lb+Py e La+Py). Não foram encontradas alterações marcantes no percentual de células CD3⁺ nos linfonodos mesentéricos dos diferentes grupos avaliados ao longo do tempo (Figura 31).

Também foram avaliadas as subpopulações de células T dos linfonodos dos diferentes grupos. Não foram encontradas diferenças marcantes em relação as subpopulações de linfócitos T nos linfonodos submandibulares e submandibulares acessórios (Figura 32). Nos linfonodos subcutâneos foi observado uma redução discreta no percentual de células CD4⁺ e um aumento no percentual de células CD8⁺ nos grupos mono infectados e co infectados com *P. yoelii* 17XNL (Figura 33). Um perfil semelhante foi encontrado nos linfonodos mesentéricos (Figura 34). Contudo, houve um aumento no percentual de células DN no grupo Py no dia 17 apenas nos linfonodos mesentéricos.

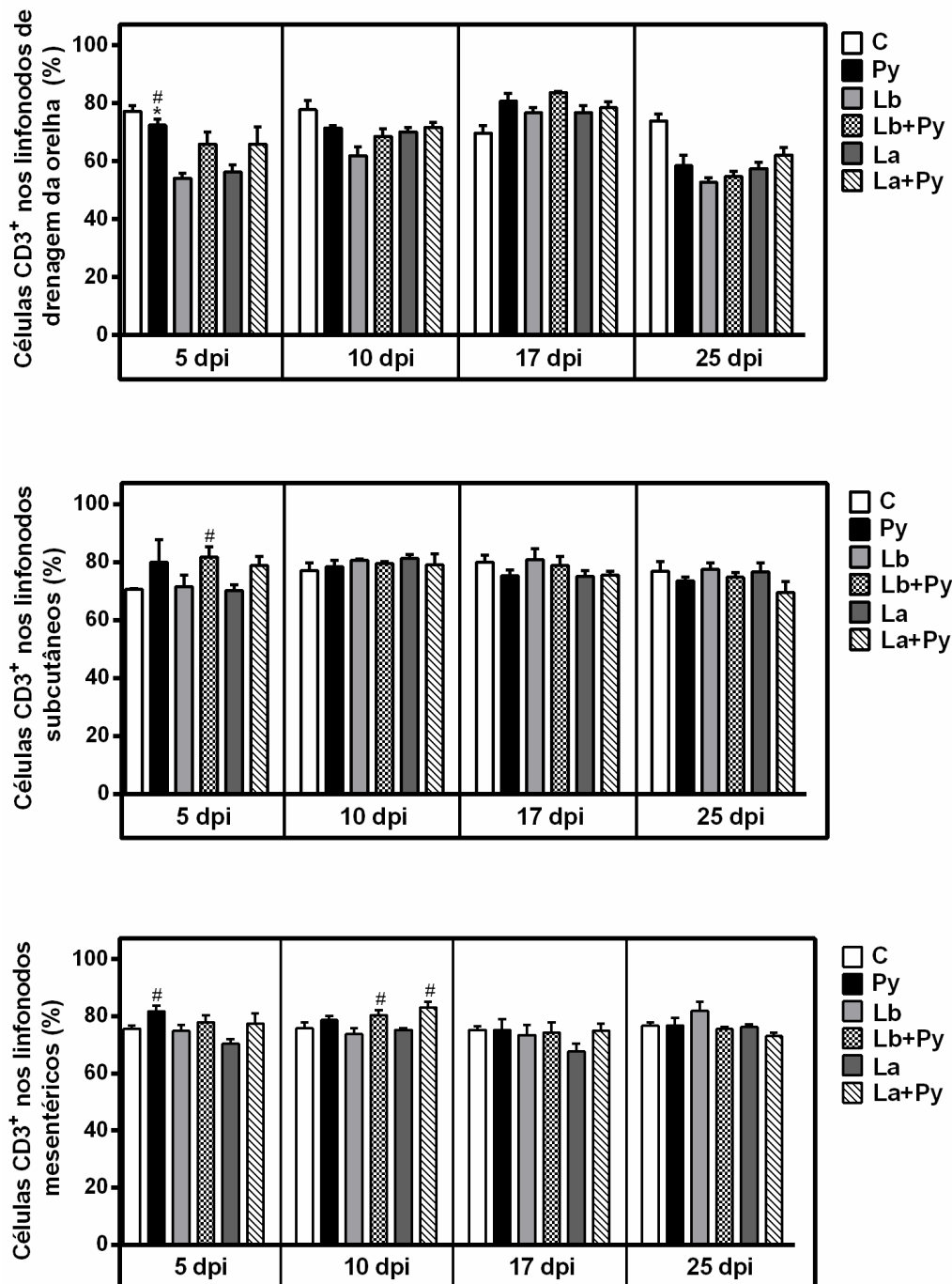


Figura 31- Percentual de células CD3⁺ nos linfonodos de drenagem da orelha, subcutâneos e mesentéricos de animais dos grupos controle, monoinfectados e coinfectados. As barras representam as médias \pm erro padrão da média. (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *L. braziliensis* e (#) *L. amazonensis* pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). dpi = dias após infecção com *P. yoelii* 17XNL; C= controle; Py= *P. yoelii* 17XNL; Lb= *L. braziliensis*; La= *L. amazonensis*, Lb+Py= *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL; e La+Py= *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL

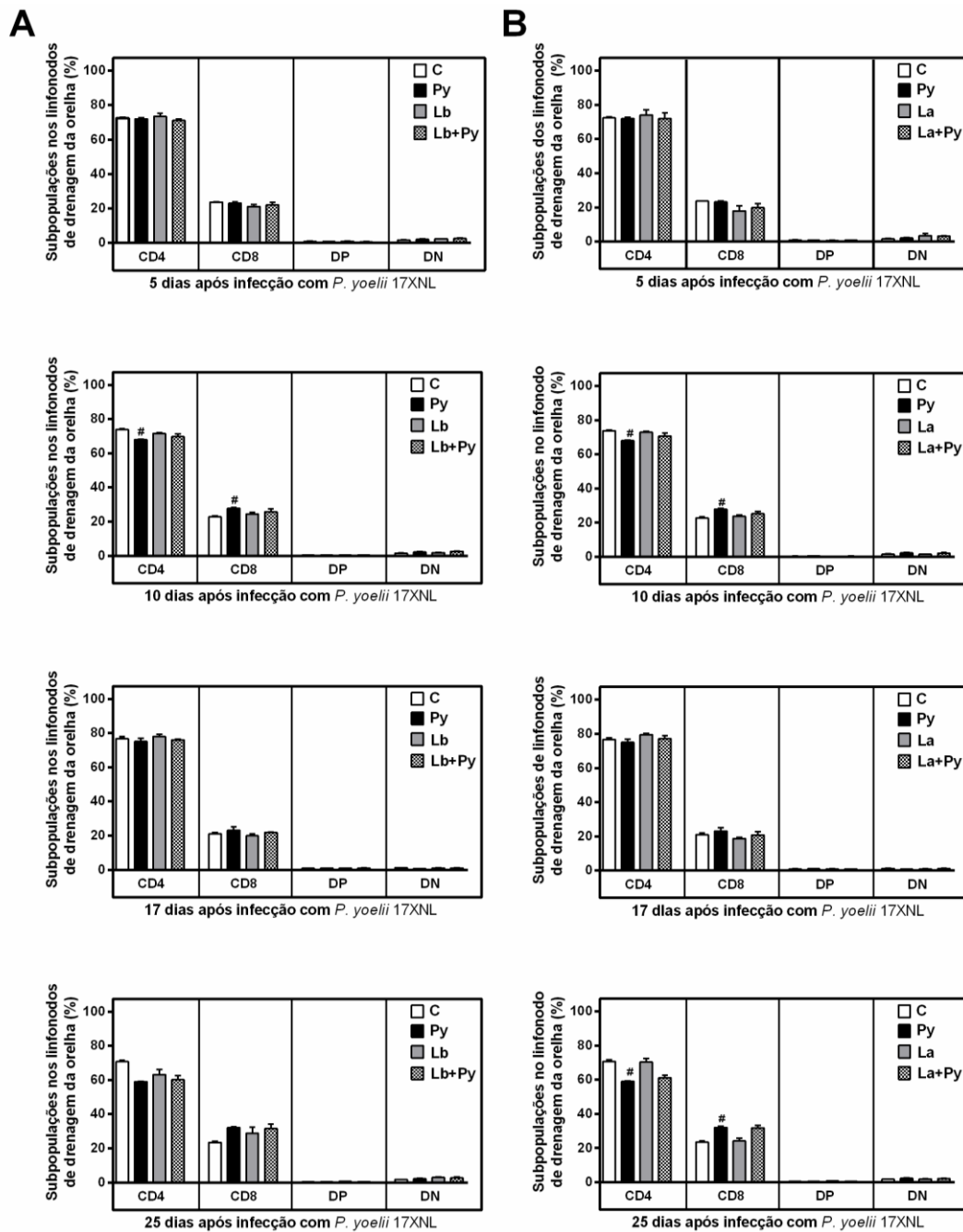


Figura 32- Percentual de subpopulações de linfócitos T nos linfonodos de drenagem das orelhas nos grupos controle, mono infectados e co infectados. A) Subpopulações de linfócitos T nos grupos controle (C), *P. yoelii* 17XNL (Py), *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Subpopulações de linfócitos T nos grupos C, Py, *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL (La+Py). (#) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *Leishmania* spp. pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). As barras representam as médias \pm erro padrão da média. DP= duplo positivas e DN= duplo negativas.

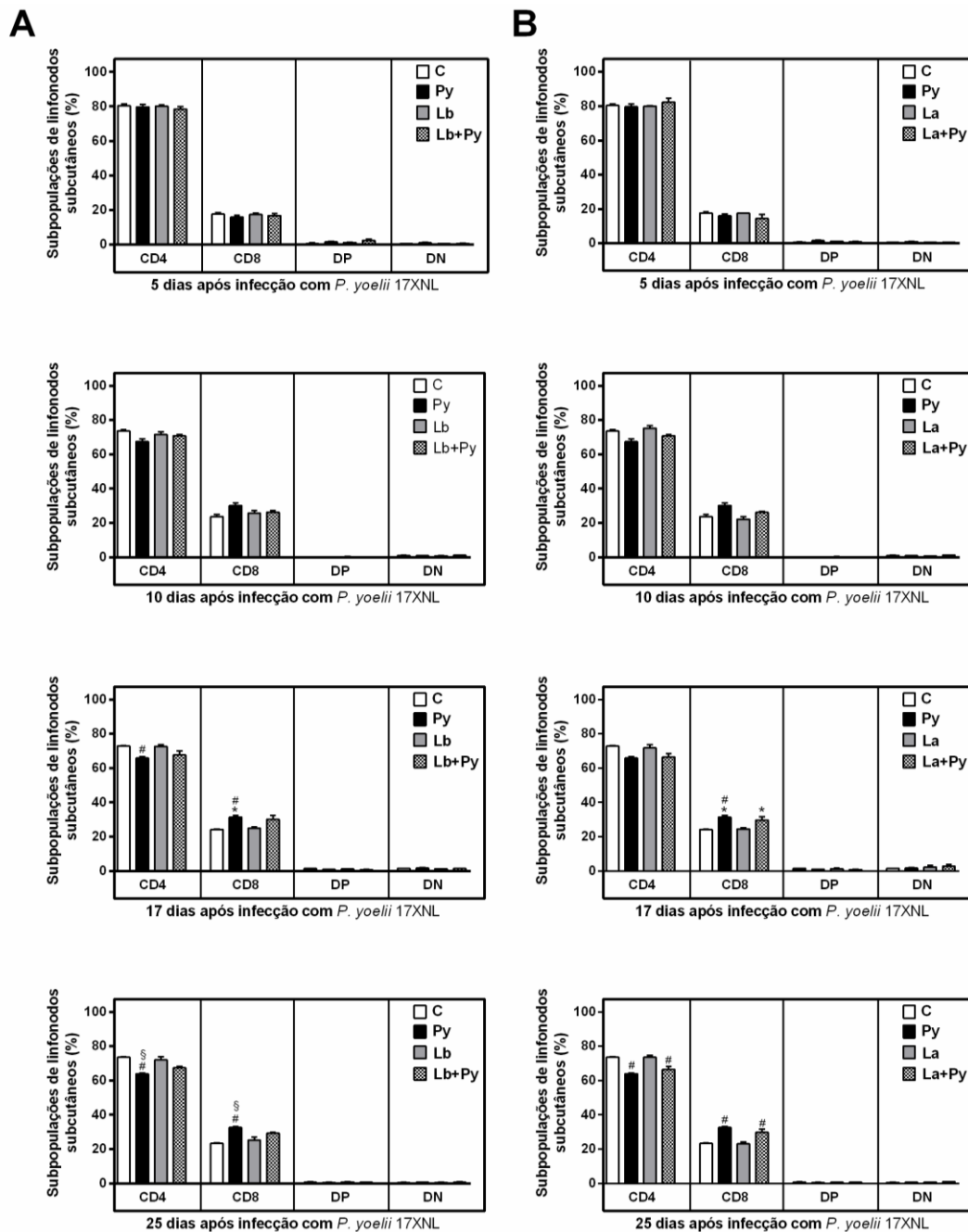


Figura 33- Percentual de subpopulações de linfócitos T nos linfonodos subcutâneos dos grupos controle, mono infectados e co infectados. A) Subpopulações de linfócitos T nos grupos controle (C), *P. yoelii* (Py), *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* (Lb+Py). B) Subpopulações de linfócitos T nos grupos C, Py, *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* (La+Py). (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, (#) grupo *Leishmania* sp. e (§) co infectado pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). As barras representam as médias \pm erro padrão da média. DP= duplo positivas e DN= duplo negativas.

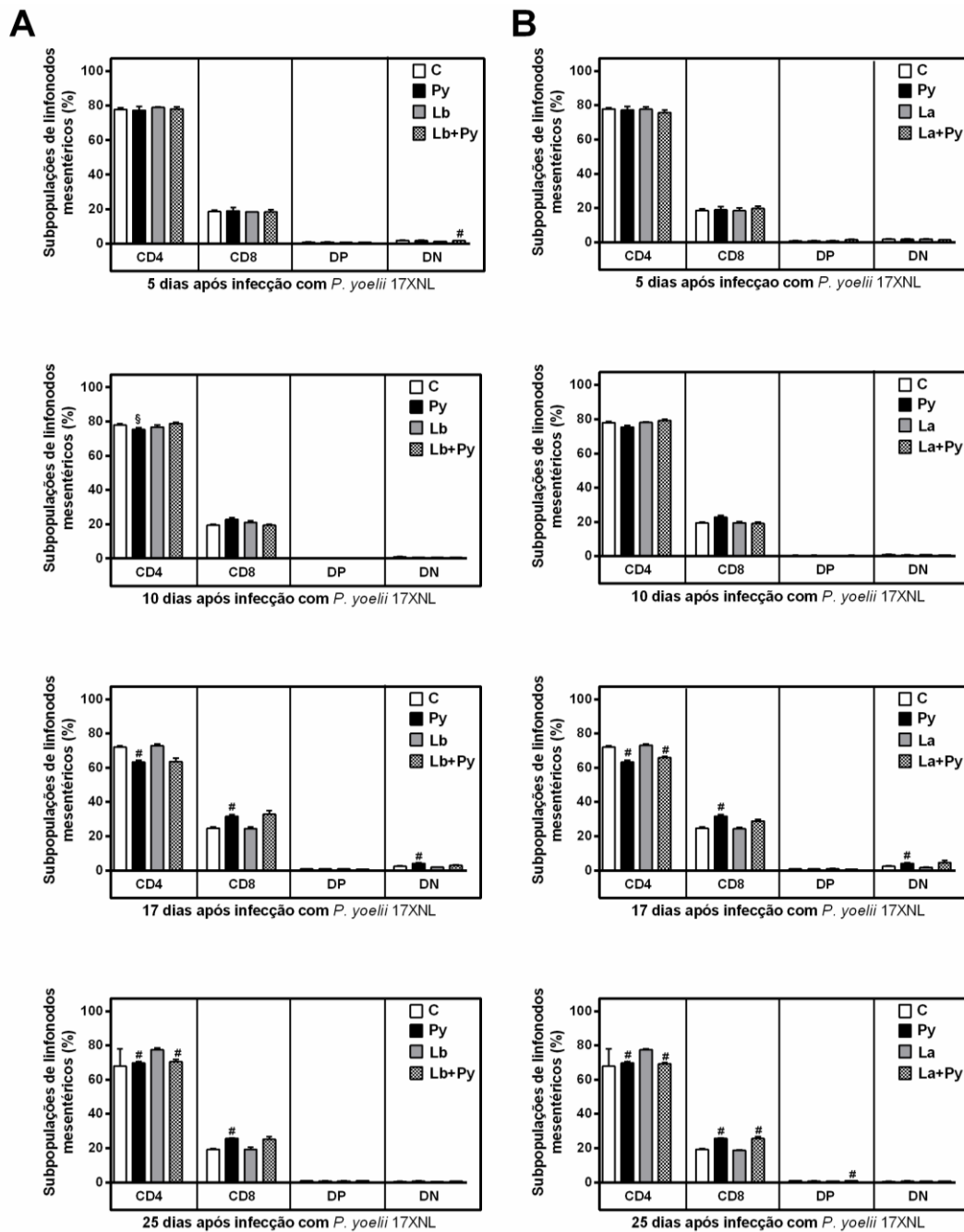


Figura 34- Percentual de subpopulações de linfócitos T nos linfonodos mesentéricos dos grupos controle, mono infectados e co infectados. A) Subpopulações de linfócitos T nos grupos controle (C), *P. yoelii* 17XNL (Py), *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Subpopulações de linfócitos T nos grupos C, Py, *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL (La+Py). (#) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *Leishmania* sp. e (§) co infectado pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). As barras representam as médias \pm erro padrão da média. DP= duplo positivas e DN= duplo negativas.

4.6 Avaliação do baço

4.6.1 Células T

Os linfócitos T presentes nos baços dos animais dos grupos controle, mono infectados e co infectados foram avaliados *ex vivo* (sem cultura) nos dias 5, 10, 17 e 25 do experimento. Foi observado uma redução estatisticamente significativa no percentual de células CD3⁺ nos baços dos animais dos grupos Py, Lb+Py e La+Py em comparação com os grupos C, Lb e La a partir do dia 5 e até o dia 25 (Figura 35). Em relação às subpopulações de linfócitos T, foi observado um aumento significativo no percentual de células CD4⁺ nos grupos Py, Lb+Py e La+Py no dia 10 após infecção com *P. yoelii* 17XNL. No grupo Py, o percentual dessas células reduziu drasticamente no dia 17 e permaneceu abaixo dos valores encontrados no grupo controle no dia 25. No grupo Lb+Py, uma redução significativa no percentual das células CD4⁺ foi observada apenas no dia 25 (Figura 36). No grupo La+Py também foi observado um aumento no percentual de células CD4⁺ no dia 10 e, em seguida, uma redução gradual até o dia 25 (Figura 36B). O percentual de células CD8⁺ nos grupos Py foi menor do que nos grupos C, Lb+Py e La+Py nos dias 5, 10, 17 e 25. Já no grupo co infectado o percentual de células CD8⁺ foi menor do que nos grupos C, Lb e La nos dias 10, 17 e 25. Foi observada uma redução significativa no percentual de células duplo positivas no grupo Py e co infectados nos dias 17 e 25. O percentual de células DN aumentou no baço durante a infecção com *P. yoelii* 17XNL em todos os momentos avaliados. No entanto, nos grupos co infectados, Lb+Py e La+Py, o aumento percentual dessas células ocorreu de uma forma mais gradual em comparação com o grupo Py. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa no percentual de células DN entre os grupos co infectados e o grupo Py no dia 17. Nos grupos Lb e La os percentuais de células CD4⁺, CD8⁺, DP e DN foi semelhante aos percentuais encontrados no grupo controle em todos os dias avaliados (Figura 36).

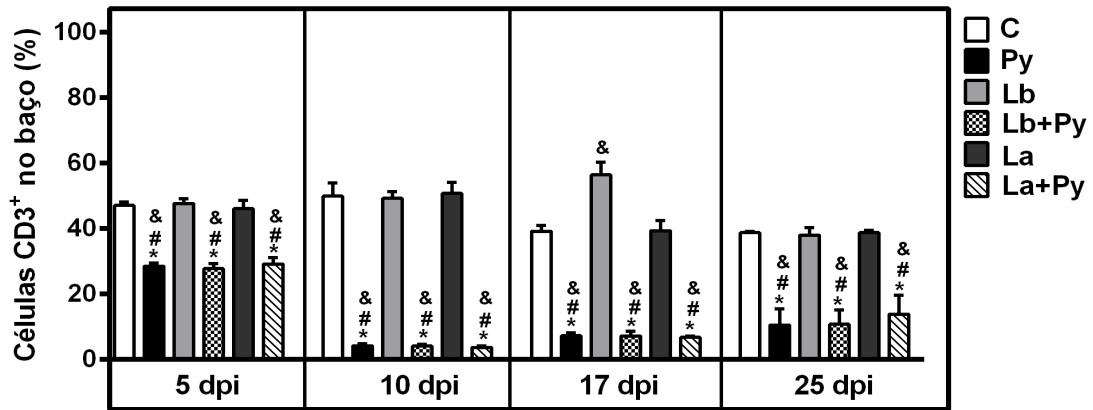


Figura 35- Percentual de células CD3⁺ no baço dos animais dos grupos controle, monoinfectados e coinfectados. (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, (#) grupo *L. braziliensis* e (&) grupo *L. amazonensis* pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). As barras representam as médias \pm erro padrão da média. dpi = dias após infecção com *P. yoelii* 17XNL. C= controle; Py= *P. yoelii* 17XNL; Lb= *L. braziliensis*; La= *L. amazonensis*, Lb+Py= *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL; e La+Py= *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL.

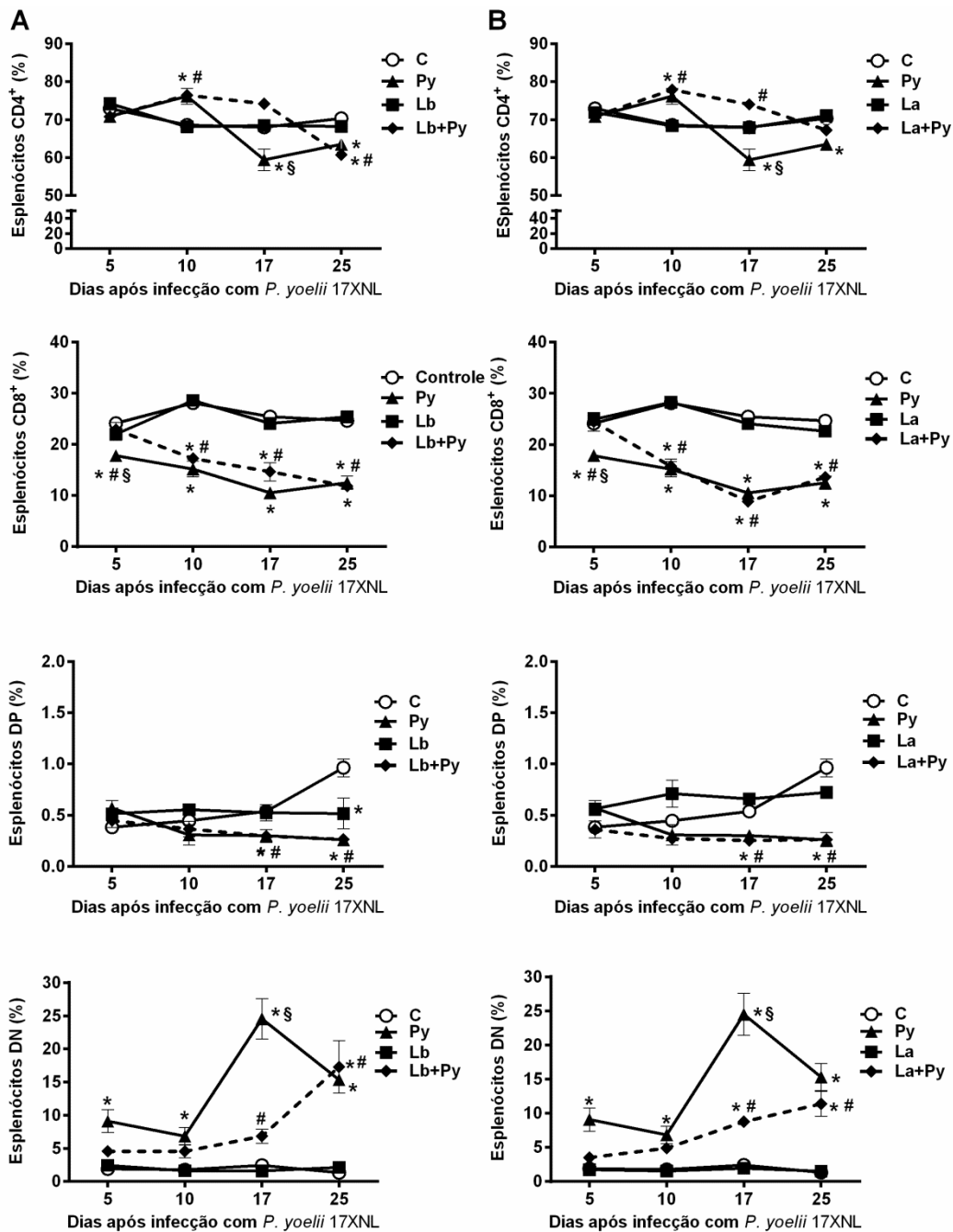


Figura 36- Percentual de subpopulações de esplenócitos no baço dos grupos controle, monoinfectados e coinfectados. A) Subpopulações de linfócitos T nos grupos controle (C), *P. yoelii* 17XNL (Py), *L. braziliensis* (Lb) e *L. braziliensis* + *P. yoelii* 17XNL (Lb+Py). B) Subpopulações de linfócitos T nos grupos C, Py, *L. amazonensis* (La) e *L. amazonensis* + *P. yoelii* 17XNL (La+Py). (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, (#) *Leishmania* sp. e (§) coinfectado pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). As barras representam as médias \pm erro padrão da média. DP= duplo positivas e DN= duplo negativas.

5 DISCUSSÃO

Malária e leishmaniose são doenças parasitárias encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em muitos países, a área de distribuição geográfica das duas doenças se sobrepõem, expondo a população ao constante risco de adquirirem os dois parasitos simultaneamente. O crescente número de viagens internacionais somado ao aumento das migrações também contribuem para a disseminação de doenças e para aumentar o risco de infecções simultâneas. Alguns casos de pacientes com malária e leishmaniose visceral já foram descritos, no passado (288) e recentemente (289-292, 309), em diferentes países, indicando que as coinfeções não são um evento raro na natureza. Diferentes trabalhos demonstraram que as coinfeções podem alterar o curso e o desfecho das doenças devido à modulação do sistema imune (294, 302, 306, 310). No presente estudo, foram avaliados os efeitos da coinfeção de duas espécies de leishmânia dermatóricas comumente encontradas no Brasil, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, e a cepa não letal de *P. yoelii* em camundongos BALB/c.

Os modelos experimentais são amplamente utilizados para o estudo da patogênese e da resposta imune na malária (131, 143). A infecção de camundongos com a cepa não-letal de *P. yoelii* causa uma doença transitória caracterizada por parasitemia moderada, perda de peso, esplenomegalia, hipotermia e anemia (297, 310-313). No nosso estudo, os camundongos BALB/c infectados com a cepa não-letal de *P. yoelii* (17XNL) desenvolveram uma infecção auto-limitada, com parasitemia moderada e resolução em cerca de 4 semanas. A infecção prévia com *L. braziliensis* foi capaz de reduzir a parasitemia média dos animais enquanto a infecção com *L. amazonensis* demonstrou uma tendência de aumento em relação ao grupo infectado apenas com plasmódio. Além disso, a taxa de mortalidade nos animais coinfectados com *L. amazonensis* foi maior do que nos demais grupos sugerindo que diferenças entre as duas espécies de *Leishmania* estudadas podem afetar a sobrevivência dos animais.

O curso da leishmaniose cutânea experimental depende de uma série de fatores, entre eles, espécie e cepa do parasito, hospedeiro, número de promastigotas utilizadas na infecção e local de inoculação (259, 314, 315). O modelo de infecção subcutânea utilizando *L. major* foi o primeiro a demonstrar a importância da resposta imune pró-inflamatória do tipo 1 (Th1) para a cura das lesões em camundongos resistentes (linhagem C57BL/6) bem como a predominância da resposta imune do tipo 2 (Th2), com produção de IL-4 e IL-10, em camundongos suscetíveis (BALB/c). Contudo, o mesmo padrão não foi observado nas infecções subcutâneas utilizando outras espécies de *Leishmania*. Na infecção subcutânea com *L. amazonensis*, por exemplo, todas as linhagens de camundongos são suscetíveis enquanto na infecção com *L. braziliensis* nenhuma linhagem é permissiva (254, 259).

A infecção por via intradérmica com pequenas quantidades de parasitos inoculados nas orelhas, foi primeiramente utilizada para a infecção experimental com *L. major* (316). Mais tarde, esse modelo também se mostrou importante para o estudo experimental com *L. braziliensis* porque as lesões que se desenvolvem nos animais apresentam úlceras e curam espontaneamente, de uma forma muito similar à manifestação clínica mais comum da LTA: a forma cutânea localizada (236, 255, 317). No nosso trabalho, os camundongos infectados com *L. braziliensis* por via intradérmica apresentaram, conforme esperado, lesões que aumentaram de tamanho gradativamente, ulceraram e que se resolveram espontaneamente em cerca de 16 semanas. As lesões dos camundongos coinfetados apresentaram o mesmo tipo de desenvolvimento, contudo, as lesões foram, em média, menores e apresentaram menos úlceras no período avaliado. A infecção com *L. amazonensis*, por outro lado, causa lesões que aumentam progressivamente de tamanho e que não curam. Foi observado que depois de 11 semanas após a infecção com *L. amazonensis* todos os animais apresentavam lesões ulceradas, sem sinais visíveis de melhora. No grupo coinfetado com plasmódio, foi observado um atraso transitório no desenvolvimento das lesões nas primeiras quatro semanas, que correspondem a fase aguda da malária. Nesse período, o tamanho médio das lesões também foi menor no grupo coinfetado em comparação com o grupo infectado apenas com *L.*

amazonensis. A suscetibilidade de camundongos (e de humanos) a diferentes espécies de *Leishmania* é multifatorial, sendo o tipo de resposta imune gerada após a infecção um fator fundamental para o desfecho da doença. Por essa razão, as diferenças observadas no curso das coinfeções por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* durante a malária foram avaliadas no contexto da intensa resposta imune gerada por *P. yoelii* 17XNL nas primeiras semanas de infecção com *Leishmania*.

Na fase eritrocítica da malária diferentes células do sistema imune produzem grandes quantidades de IFN- γ , tanto em humanos quanto em animais (101, 318, 319). No início da infecção, quando a parasitemia ainda é baixa, a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, é sustentada pela resposta imune inata do hospedeiro. Esse ambiente inflamatório induz, então, a polarização das células T CD4⁺ para o perfil Th1. Essas células passam a produzir mais IFN- γ , os macrófagos são ativados pela via clássica e a parasitemia é controlada (97, 320). Nos nossos experimentos, fomos capazes de detectar no soro dos animais infectados e coinfectados com *P. yoelii* 17XNL, um aumento expressivo nos níveis de IFN- γ no início da infecção em concordância com o que é relatado na literatura (136, 312, 313, 319). No entanto, o aumento nos níveis de IFN- γ foi transitório e concentrado nos dias 5 e 10 após a infecção com plasmódio. Já os níveis de TNF e IL-6 no soro se mantiveram elevados ao longo de todo o período patente da infecção por *P. yoelii* 17XNL. Diversos trabalhos relatam que pacientes infectados com *P. falciparum* e *P. vivax* possuem níveis elevados de TNF e IL-6 e que, aqueles com maior severidade, possuem níveis ainda maiores dessas citocinas (321-324).

Ao analisar as lesões cutâneas de *Leishmania* no grupo coinfectado, percebemos que as lesões são menores durante a fase aguda da malária justamente quando os níveis de citocinas séricas estão aumentados. A intensa resposta inflamatória causada pela infecção com *P. yoelii* 17XNL pode ser responsável pelo atraso no desenvolvimento das lesões cutâneas nos grupos coinfectados, já que IFN- γ e TNF exercem um papel importante no controle da replicação de leishmânias no interior dos macrófagos (325). Tanto o IFN-

γ quanto o TNF são capazes de ativar os macrófagos pela via clássica, levando a produção de NO e a eliminação dos parasitos. Também sustentam a diferenciação das células T CD4⁺ para o perfil Th1. É provável que células do infiltrado inflamatório das lesões de *Leishmania* estejam sobre a influência dos elevados níveis de IFN- γ e TNF encontrados nos animais coinfectados e que, por esse motivo, controlem melhor a replicação do parasito. Outra possibilidade é que células não específicas estejam migrando para o local da lesão e modificando o tipo de resposta ao parasito. Em pacientes infectados com *L. braziliensis* já foi verificado que células T específicas para antígenos de *Toxoplasma gondii* eram encontradas em alta frequência nas lesões (326), nos levando a acreditar que o mesmo pode estar acontecendo no nosso modelo de coinfeção experimental.

Nos trabalhos de coinfeção de Coleman e colaboradores, as lesões causadas por *L. amazonensis* nos camundongos coinfectados com *P. yoelii* 17XNL eram maiores do que nos camundongos infectados apenas com *L. amazonensis* (296, 297) em oposição ao que foi encontrado no nosso modelo. A contradição existente entre os dois resultados pode, no entanto, ser explicada por diferenças na via e no número de parasitos de *Leishmania* inoculados. A mudança da via subcutânea para a via intradérmica induz um tipo de resposta imune celular diferente, já que na pele são encontradas células especializadas, tais como queratinócitos, células dendríticas dérmicas e células de Langerhans, que não estão presentes no tecido subcutâneo (327). O número de parasitos inoculados também é outro fator que pode alterar o tipo de resposta gerada. Em estudos de infecção subcutânea com *L. major* em camundongos suscetíveis (BALB/c) foi observado que doses pequenas do parasito determinam uma resposta predominantemente Th1 que converte o fenótipo de suscetibilidade ao de resistência (328). Já no modelo de infecção intradérmica com inóculos de baixa concentração de parasitos (10-1000 por inóculo) de *L. major* ou *L. amazonensis* foram detectadas tanto citocinas Th1 (IFN- γ) quanto citocinas Th2 (IL-4, IL-13 e IL-10) no baço e linfonodo de drenagem dos animais que apresentaram sinais clínicos de infecção (249), demonstrando que existem diferenças em relação ao tipo de resposta imune induzida de acordo com a via e o número de parasitos inoculados.

Tanto na leishmaniose cutânea como na malária, a resposta inflamatória excessiva pode ocasionar complicações levando, inclusive, a morte. Por esse motivo, é necessário que haja um equilíbrio entre as respostas pró- e anti-inflamatória para que a parasitemia seja controlada sem causar danos ao hospedeiro (320). Nos grupos coinfectados pudemos observar que os níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 eram menores do que aqueles encontrados no soro dos animais do grupo infectado apenas com *P. yoelii* 17XNL, sugerindo uma modulação da resposta ao plasmódio em função da coinfeção com *Leishmania*. A IL-10 é uma citocina regulatória que protege os camundongos das patologias imunomediadas na fase aguda da malária (109, 313). No grupo coinfectado com *L. amazonensis*, foi observado uma redução estatisticamente significativa nos níveis de IL-10 nos dias 5 e 10 após infecção com *P. yoelii*. Essa redução nos níveis dessa citocina pode estar relacionada às mortes observadas apenas no grupo coinfectado com *L. amazonensis*, já que no grupo coinfectado com *L. braziliensis* a redução dos níveis de IL-10 nos dias 5 e 10 não foi tão acentuada.

A malária, assim como outras doenças parasitárias, é capaz de causar uma alteração severa no timo (329, 330). Durante a infecção, o órgão passa por uma intensa atrofia com alteração da sua arquitetura, o que pode influenciar a maturação das células T. Já foi demonstrado que camundongos infectados com *P. berghei* ou *P. chabaudi* apresentam atrofia tímica importante, associada a depleção celular e a desorganização histológica (331-334). A atrofia tímica causada por doenças infecciosas pode ocorrer pela combinação dos seguintes fatores: desregulação da proliferação, aumento da morte e migração de timócitos para os tecidos periféricos (330). Aumento da apoptose e da migração de timócitos já foram descritos em diversas doenças (329), inclusive, na malária (333). Na infecção com *P. yoelii* 17XNL foi observada uma profunda atrofia tímica acompanhada da redução no percentual de células duplo positivas (CD4⁺CD8⁺) e do aumento no percentual de células simples positivas (CD4⁺ e CD8⁺) e de células duplo negativas (CD4⁻CD8⁻). Apesar da atrofia marcante durante a malária, o timo foi capaz de recuperar seu tamanho normal e sua celularidade após a eliminação das formas sanguíneas de *P. yoelii* em concordância com o que foi observado nas infecções com a cepa

não-letal de *P. chabaudi* (331). As infecções com *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* não causaram involução do timo, provavelmente em função do caráter localizado das lesões com pouco ou nenhum impacto sobre o sistema imune sistêmico. É importante ressaltar que o timo dos animais coinfectedos apresentou uma recuperação mais rápida do que o timo dos animais infectados apenas com *P. yoelii* 17XNL, o que pode estar relacionado ao menor grau de inflamação observado na coinfeção.

A redução no percentual de timócitos duplo positivos também é um achado comum no curso das doenças infecciosas e pode ser explicado pela saída prematura dessas células para o sangue e para órgãos linfóides periféricos (330). Tanto os animais infectados apenas com *P. yoelii* 17XNL quanto os coinfectedos apresentaram uma redução no percentual de células duplo positivas CD4⁺CD8⁺ no baço em comparação com os grupos infectados com *Leishmania* e com o grupo controle, indicando que a redução no percentual de células duplo positivas no timo pode não estar relacionado com a migração para o baço. Ao compararem as alterações tímicas de camundongos infectados com as cepas letal (17XL) e não-letal (17XNL) de *P. yoelii*, Khanam e colaboradores perceberam que alterações mais marcantes e reversíveis eram observadas nas infecções não-letais. Assim como no nosso trabalho, esses autores verificaram uma redução no percentual de células duplo positivas no timo dos animais infectados com *P. yoelii* 17XNL (335). O principal mecanismo identificado para a depleção dessa subpopulação celular foi o aumento da apoptose, principalmente no período em que ocorre o pico da parasitemia (335), o que nos leva a deduzir que o mesmo pode estar acontecendo no nosso experimento.

A ativação das células T CD4 é necessária para que ocorra a produção de anticorpos e para que mecanismos independentes de anticorpos relacionados com a eliminação das formas sanguíneas dos plasmódios possam ocorrer (336, 337). No nosso modelo, observamos um aumento transitório no percentual dessas células no baço dos animais coinfectedos no dia 10 seguido de uma queda brusca no dia 17 em comparação ao grupo controle. No grupo coinfectedo com *L. amazonensis* o percentual de células CD4⁺ se equipara ao percentual do grupo controle apenas no dia 25 enquanto na coinfeção com *L.*

braziliensis esses valores eram mais baixos do que os encontrados no grupo controle e no grupo infectado apenas com *Leishmania*. Ao mesmo tempo foi notada uma redução do percentual de células CD8⁺ no baço dos camundongos dos grupos infectado e coinfestado com *P. yoelii* 17XNL. Diferentes estudos já demonstraram a diminuição no percentual de células T CD4⁺ e CD8⁺ no baço de camundongos infectados com plasmódios murinos e relacionam essa redução com o aumento da apoptose de esplenócitos (86, 338, 339). Uma possível explicação para esse fenômeno é que antígenos liberados pelo parasito possam induzir a apoptose dessas células (340). O aumento da apoptose de linfócitos é um fenômeno encontrado em infecções com outros parasitos como, por exemplo, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *T. gondii* (341), e pode ser considerado um mecanismo de escape do patógeno ou de regulação da resposta imune pelo hospedeiro (341-343).

Outro aspecto importante é que o percentual de células duplo negativas no baço dos camundongos infectados com *P. yoelii* 17XNL aumenta, mas nos grupos coinfestados com *Leishmania* esse fenômeno acontece de forma mais gradual e em menor intensidade. As células duplo negativas encontradas no baço podem ser tanto NKT como células T $\gamma\delta$. Ambas são componentes do sistema imune inato e diversos trabalhos vêm demonstrando sua importância na eliminação dos parasitos durante a fase eritrocítica da malária (344, 345). As células NKT correspondem a 5% de todos os linfócitos que são encontrados no baço. Essas células possuem tanto marcadores de superfície de células T como de células NK. Portanto, as células NKT podem expressar CD4, CD8, nenhum dos dois (duplo negativa) e NK1.1 (346). Já foi verificado anteriormente que a infecção com *P. yoelii* cepa 265BY é capaz de induzir uma reposta de células NKT heterogênea e órgão específica (347). Durante a infecção, as células NKT hepáticas são principalmente CD1d dependentes, CD4⁺ ou duplo negativas enquanto as células NKT esplênicas são cd1d independentes, TCR^{high} e CD4^{high} (347). Também foi demonstrado que células NKT CD49b⁺ CD3⁺ estão presentes no fígado de camundongos infectados com *P. yoelii* 17XNL e que as células NKT CD1d restritas secretam IFN- γ e são fundamentais para controlar uma segunda infecção (348). Já as células T $\gamma\delta$ são as primeiras a se formarem na ontogenia dos linfócitos T. Elas

são capazes de responder rapidamente através da produção de citocinas e podem ser divididas em dois grupos: células produtoras de interferon (CD27^{high}) e células produtoras de IL-17 (CD27^{low}) (349). Na malária, as células T $\gamma\delta$ são ativadas nas fases pré-eritrocítica e eritrocítica. Já foi verificado que essas células são capazes de produzir INF- γ *in vitro* após o estímulo com eritrócitos infectados com *P. falciparum* (91-93). Em camundongos BALB/c, o número de células T $\gamma\delta$ aumenta consideravelmente no baço durante a infecção com a cepa não-letal de *P. yoelii* (17XNL) (350). O mesmo aumento não é observado em infecções com a cepa letal de *P. yoelii* (17XL), sugerindo que as células T $\gamma\delta$ podem ter um papel protetor na malária (350). Em outro trabalho, também com a cepa não-letal de *P. yoelii*, foi observado um aumento no percentual de células T $\gamma\delta$ no baço, fígado e sangue periférico, com pico no dia 21 (94). Quando as células T $\gamma\delta$ eram depletadas com anticorpos monoclonais, os animais levavam mais tempo para eliminar os parasitos (94). No nosso trabalho, pudemos perceber um aumento no percentual de células CD3⁺CD4⁻CD8⁻ no timo e no baço de camundongos BALB/c infectados com *P. yoelii* 17XNL. Todavia, no grupo coinfestado com *Leishmania* o aparecimento dessas células aconteceu mais tardiamente. Como essas células DN podem ser tanto NKT como células T $\gamma\delta$ e ambas estão envolvidas na resposta imune à malária, é possível que as diferenças nos níveis de citocinas séricas encontradas nos grupos mono- e coinfestados estejam relacionados a mudanças na dinâmica dessa subpopulação celular.

De uma maneira geral, nossos resultados sugerem que a infecção concomitante com *P. yoelii* 17XNL com *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* pode alterar o curso das duas doenças. Na malária, o desfecho depende da espécie de *Leishmania* coinfestante enquanto na leishmaniose ocorre um atraso transitório no desenvolvimento das lesões cutâneas apenas no período de infecção pelo plasmódio. Essas alterações parecem estar relacionadas a mudanças na resposta imune como observado em relação aos níveis de citocinas séricas e à dinâmica das células T durante a infecção. Se considerarmos a grande área geográfica onde malária e leishmaniose cutânea são co-endêmicas, é possível imaginar que infecções recorrentes ou mesmo concomitantes possam ocorrer nas populações humanas. Conforme

demonstrado nesse trabalho e reforçado por inúmeros relatos na literatura, a exposição a diferentes parasitos pode causar alterações importantes na resposta imune, modificando o curso das doenças. O aumento da parasitemia, período patente e mortalidade, como observado na coinfeção experimental com *L. amazonensis* e *P. yoelii*, por exemplo, pode contribuir para o aumento da transmissão da malária e dificultar o controle e o tratamento da doença. Neste sentido, o tema das coinfeções precisa ser aprofundado em estudos com populações humanas a fim de avaliar o real impacto de doenças concomitantes em políticas públicas de saúde.

6 CONCLUSÕES

6.1 Conclusões gerais

Baseado nos resultados deste trabalho, verifica-se que as coinfeções por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* e *P. yoelii* 17XNL causam alterações no curso das duas doenças. No caso da malária, o desfecho depende da espécie de *Leishmania* envolvida. A partir da análise da coinfeção com *L. braziliensis* é possível perceber um efeito benéfico à malária (redução dos níveis de parasitemia) enquanto a coinfeção com *L. amazonensis* tem efeito prejudicial (aumento da taxa de mortalidade). Na leishmaniose, a coinfeção com *P. yoelii* 17XNL exerce um efeito benéfico transitório que é mais expressivo durante a fase aguda da malária (menor tamanho das lesões e menos ulceração). Essas alterações parecem estar relacionadas com mudanças na resposta imune durante as coinfeções, como observado em relação aos níveis de citocinas séricas e à dinâmica das subpopulações de células T em diferentes órgãos linfóides.

6.2 Conclusões pontuais

- A coinfeção de camundongos BALB/c com *L. braziliensis* provoca uma redução da parasitemia média de *P. yoelii* 17XNL;
- A coinfeção de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* provoca aumento da parasitemia média de *P. yoelii* 17XNL e da mortalidade;
- Na coinfeção de camundongos BALB/c por *Leishmania* e *P. yoelii* 17XNL os níveis das citocinas séricas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 estão aumentados, porém são menores do que os níveis encontrados nos animais infectados apenas com *P. yoelii* 17XNL, sugerindo um efeito modulador das coinfeções em relação a produção de citocinas;

- A infecção com *P. yoelii* 17XNL causa uma intensa atrofia tímica com redução da massa relativa e da celularidade, contudo o timo dos animais coinfectados com *Leishmania* e *P. yoelii* 17XNL apresenta uma recuperação mais rápida do que os animais infectados apenas com *P. yoelii*;
- A infecção com *P. yoelii* 17XNL reduz o percentual de células duplo positivas no timo, mas as mesmas não são encontradas nos órgãos linfóides periféricos, indicando que a migração dessas células não é o principal mecanismo responsável pela sua depleção no timo;
- A infecção com *P. yoelii* 17XNL aumenta o percentual de células duplo negativas (CD4⁻CD8⁻) no timo e no baço, indicando que essas células podem estar envolvidas na resposta imune a malária durante a fase aguda da doença;
- A infecção com *P. yoelii* 17XNL reduz transitoriamente o percentual de células T CD4⁺ e CD8⁺ no baço, porém a recuperação ocorre mais rapidamente nos camundongos coinfectados do que nos animais infectados apenas com *P. yoelii* 17XNL;
- A infecção com *P. yoelii* 17XNL causa uma diminuição no percentual de células duplo positivas (CD4⁺CD8⁺) no baço;
- O percentual de células duplo negativas (CD4⁻CD8⁻) aumenta nos baços dos camundongos infectados com *P. yoelii* 17XNL, porém este aumento é mais gradual e menos expressivo no baço de camundongos dos grupos coinfectados;
- As infecções com *L. brazilensis* e *L. amazonensis* não causam alterações na concentração de citocinas séricas e nem na dinâmica de células T no timo, baço e linfonodos, provavelmente em função do caráter localizado da doença no modelo experimental utilizado.

7 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. World malaria report. Geneva, Switzerland: World Health Organization. p. volumes.
2. Millar SB, Cox-Singh J. Human infections with *Plasmodium knowlesi* zoonotic malaria. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015;21(7):640-8.
3. Cramer JP. *Plasmodium knowlesi* malaria: Overview Focussing on Travel-Associated Infections. *Current infectious disease reports*. 2015;17(3):469.
4. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(4):564-94.
5. Rich SM, Licht MC, Hudson RR, Ayala FJ. Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(8):4425-30.
6. Escalante AA, Ayala FJ. Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(13):5793-7.
7. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala FJ, Arnathau C, et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1458-63.
8. Boundenga L, Ollomo B, Rougeron V, Mouele LY, Mve-Ondo B, Delicat-Loembet LM, et al. Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon. *Malaria journal*. 2015;14:111.
9. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010;467(7314):420-5.
10. Krief S, Escalante AA, Pacheco MA, Mugisha L, Andre C, Halbwax M, et al. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. *PLoS pathogens*. 2010;6(2):e1000765.
11. Duval L, Fourment M, Nerrienet E, Rousset D, Sadeuh SA, Goodman SM, et al. African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin

and diversification of the *Laverania* subgenus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(23):10561-6.

12. Mangano VD, Modiano D. An evolutionary perspective of how infection drives human genome diversity: the case of malaria. *Current opinion in immunology*. 2014;30:39-47.

13. Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a Journey in Time: In Search of the Lost Myths and Forgotten Stories. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2010;340(6).

14. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & vectors*. 2010;3(1):5.

15. Wangdi K, Gatton ML, Kelly GC, Clements AC. Cross-border malaria: a major obstacle for malaria elimination. *Advances in parasitology*. 2015;89:79-107.

16. Jitthai N. Migration and malaria. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2013;44 Suppl 1:166-200; discussion 306-7.

17. Confalonieri UE, Margonari C, Quintao AF. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta tropica*. 2014;129:33-41.

18. Kouadio IK, Aljunid S, Kamigaki T, Hammad K, Oshitani H. Infectious diseases following natural disasters: prevention and control measures. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012;10(1):95-104.

19. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malaria journal*. 2014;13:144.

20. World Health Organization. Global malaria mapper 2016 [cited 2016 09 de fevereiro de 2016]. Available from: <http://www.worldmalaria-report.org/node/67>.

21. Ministério da Saúde. Resumo epidemiológico nacional mensal 2016 [cited 2016 20 de janeiro de 2016]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>.

22. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(6):701-18.

23. de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suarez-Mutis MC, Santelli AC, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):618-33.
24. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria journal*. 2010;9:115.
25. de Alvarenga DA, de Pina-Costa A, de Sousa TN, Pissinatti A, Zalis MG, Suarez-Mutis MC, et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malaria journal*. 2015;14:81.
26. Laporta GZ, Burattini MN, Levy D, Fukuya LA, de Oliveira TM, Maselli LM, et al. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? *Malaria journal*. 2015;14:181.
27. Maselli LM, Levy D, Laporta GZ, Monteiro AM, Fukuya LA, Ferreira-da-Cruz MF, et al. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* subclinical infection in non-endemic region: implications for blood transfusion and malaria epidemiology. *Malaria journal*. 2014;13:224.
28. Costa Ade P, Bressan Cda S, Pedro RS, Valls-de-Souza R, Silva S, Souza PR, et al. [Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010;43(5):571-4.
29. Lorenz C, Virginio F, Aguiar BS, Suesdek L, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malaria journal*. 2015;14(1):408.
30. Ministério da Saúde. Mapa de risco Brasil2014 [cited 2016 09 de fevereiro de 2016.]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>.
31. Njabo KY, Cornel AJ, Bonneaud C, Toffelmier E, Sehgal RN, Valkiunas G, et al. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. *Molecular ecology*. 2011;20(5):1049-61.
32. Schall JJ. Virulence of a malaria parasite, *Plasmodium mexicanum*, for its sand fly vectors, *Lutzomyia vexator* and *Lutzomyia stewarti* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. 2011;48(6):1183-8.
33. Schall JJ. The ecology of lizard malaria. *Parasitology today*. 1990;6(8):264-9.

34. Vanderberg JP. Imaging mosquito transmission of Plasmodium sporozoites into the mammalian host: immunological implications. *Parasitology international*. 2014;63(1):150-64.
35. Choumet V, Attout T, Chartier L, Khun H, Sautereau J, Robbe-Vincent A, et al. Visualizing non infectious and infectious Anopheles gambiae blood feedings in naive and saliva-immunized mice. *PloS one*. 2012;7(12):e50464.
36. Sinnis P, Zavala F. The skin: where malaria infection and the host immune response begin. *Seminars in immunopathology*. 2012;34(6):787-92.
37. Kebaier C, Vanderberg JP. Re-ingestion of Plasmodium berghei sporozoites after delivery into the host by mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1200-4.
38. Beier MS, Davis JR, Pumpuni CB, Noden BH, Beier JC. Ingestion of Plasmodium falciparum sporozoites during transmission by anopheline mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1992;47(2):195-200.
39. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell host & microbe*. 2008;3(2):88-96.
40. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*. 2006;12(2):220-4.
41. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(43):18640-5.
42. Voza T, Miller JL, Kappe SH, Sinnis P. Extrahepatic exoerythrocytic forms of rodent malaria parasites at the site of inoculation: clearance after immunization, susceptibility to primaquine, and contribution to blood-stage infection. *Infection and immunity*. 2012;80(6):2158-64.
43. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends in parasitology*. 2015;31(8):357-62.
44. Frevert U, Engelmann S, Zougbede S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, et al. Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. *PLoS biology*. 2005;3(6):e192.

45. Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(5):905-15.
46. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001;291(5501):141-4.
47. Risco-Castillo V, Topcu S, Marinach C, Manzoni G, Bigorgne AE, Briquet S, et al. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell host & microbe*. 2015.
48. Langhorne J, Duffy PE. Expanding the antimalarial toolkit: Targeting host-parasite interactions. *The Journal of experimental medicine*. 2016.
49. Lindner SE, Miller JL, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cellular microbiology*. 2012;14(3):316-24.
50. Stanway RR, Mueller N, Zobiak B, Graewe S, Froehlke U, Zessin PJ, et al. Organelle segregation into Plasmodium liver stage merozoites. *Cellular microbiology*. 2011;13(11):1768-82.
51. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313(5791):1287-90.
52. Cogswell FB. The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clinical microbiology reviews*. 1992;5(1):26-35.
53. Markus MB. Do hypnozoites cause relapse in malaria? *Trends in parasitology*. 2015;31(6):239-45.
54. Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U. Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS pathogens*. 2007;3(11):e171.
55. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJ, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS microbiology reviews*. 2016.
56. Weiss GE, Crabb BS, Gilson PR. Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. *Trends in parasitology*. 2016.
57. Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Molecular and biochemical parasitology*. 2010;172(2):57-65.

58. Bruce MC, Alano P, Duthie S, Carter R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology*. 1990;100 Pt 2:191-200.
59. Josling GA, Llinas M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nature reviews Microbiology*. 2015;13(9):573-87.
60. Guttery DS, Roques M, Holder AA, Tewari R. Commit and Transmit: Molecular Players in *Plasmodium* Sexual Development and Zygote Differentiation. *Trends in parasitology*. 2015;31(12):676-85.
61. Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current opinion in genetics & development*. 2006;16(4):384-91.
62. Angrisano F, Tan YH, Sturm A, McFadden GI, Baum J. Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut--placing the *Plasmodium* ookinete centre stage. *International journal for parasitology*. 2012;42(6):519-27.
63. Garcia-Basteiro AL, Bassat Q, Alonso PL. Approaching the target: the path towards an effective malaria vaccine. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2012;4(1):e2012015.
64. Galatas B, Bassat Q, Mayor A. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. *Trends in parasitology*. 2015.
65. Radtke AJ, Tse SW, Zavala F. From the draining lymph node to the liver: the induction and effector mechanisms of malaria-specific CD8+ T cells. *Seminars in immunopathology*. 2015;37(3):211-20.
66. Mac-Daniel L, Menard R. *Plasmodium* and mononuclear phagocytes. *Microbial pathogenesis*. 2015;78:43-51.
67. Cockburn IA, Zavala F. Dendritic cell function and antigen presentation in malaria. *Current opinion in immunology*. 2016;40:1-6.
68. Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, Fazekas de St Groth B. Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *Journal of immunology*. 2001;166(9):5430-8.
69. Bertolino P, McCaughan GW, Bowen DG. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunology and cell biology*. 2002;80(1):84-92.

70. Tay SS, Wong YC, Roediger B, Siervo F, Lu B, McDonald DM, et al. Intrahepatic activation of naive CD4+ T cells by liver-resident phagocytic cells. *Journal of immunology*. 2014;193(5):2087-95.
71. Crispe IN. Hepatocytes as Immunological Agents. *Journal of immunology*. 2016;196(1):17-21.
72. Khusmith S, Sedegah M, Hoffman SL. Complete protection against *Plasmodium yoelii* by adoptive transfer of a CD8+ cytotoxic T-cell clone recognizing sporozoite surface protein 2. *Infection and immunity*. 1994;62(7):2979-83.
73. Rodrigues MM, Cordey AS, Arreaza G, Corradin G, Romero P, Maryanski JL, et al. CD8+ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria. *International immunology*. 1991;3(6):579-85.
74. Mellouk S, Hoffman SL, Liu ZZ, de la Vega P, Billiar TR, Nussler AK. Nitric oxide-mediated antiplasmodial activity in human and murine hepatocytes induced by gamma interferon and the parasite itself: enhancement by exogenous tetrahydrobiopterin. *Infection and immunity*. 1994;62(9):4043-6.
75. Mellouk S, Green SJ, Nancy CA, Hoffman SL. IFN-gamma inhibits development of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic stages in hepatocytes by an L-arginine-dependent effector mechanism. *Journal of immunology*. 1991;146(11):3971-6.
76. Dups JN, Pepper M, Cockburn IA. Antibody and B cell responses to *Plasmodium* sporozoites. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:625.
77. Nardin EH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Collins WE, Harinasuta KT, Tapchaisri P, et al. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *The Journal of experimental medicine*. 1982;156(1):20-30.
78. Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *The Journal of experimental medicine*. 1980;151(6):1504-13.
79. Lagasse HA, Anidi IU, Craig JM, Limjunyawong N, Poupore AK, Mitzner W, et al. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2015.
80. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium*

falciparum asexual blood stages. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(2):409-18.

81. Ferrer M, Martin-Jaular L, De Niz M, Khan SM, Janse CJ, Calvo M, et al. Imaging of the spleen in malaria. *Parasitology international*. 2014;63(1):195-205.

82. Del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MV. The role of the spleen in malaria. *Cellular microbiology*. 2012;14(3):343-55.

83. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. *Trends in parasitology*. 2005;21(2):75-80.

84. Alves FA, Pelajo-Machado M, Totino PR, Souza MT, Goncalves EC, Schneider MP, et al. Splenic architecture disruption and parasite-induced splenocyte activation and anergy in *Plasmodium falciparum*-infected *Saimiri sciureus* monkeys. *Malaria journal*. 2015;14:128.

85. Bockstal V, Geurts N, Magez S. Acute Disruption of Bone Marrow B Lymphopoiesis and Apoptosis of Transitional and Marginal Zone B Cells in the Spleen following a Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* Infection in Mice. *Journal of parasitology research*. 2011;2011:534697.

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

87. Demar M, Legrand E, Hommel D, Esterre P, Carme B. *Plasmodium falciparum* malaria in splenectomized patients: two case reports in French Guiana and a literature review. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;71(3):290-3.

88. Boo YL, Lim HT, Chin PW, Lim SY, Hoo FK. A case of severe *Plasmodium knowlesi* in a splenectomized patient. *Parasitology international*. 2016;65(1):55-7.

89. Bach O, Baier M, Pullwitt A, Fosiko N, Chagaluka G, Kalima M, et al. *Falciparum* malaria after splenectomy: a prospective controlled study of 33 previously splenectomized Malawian adults. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;99(11):861-7.

90. McCall MB, Sauerwein RW. Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(6):1131-43.

91. Scholzen A, Sauerwein RW. Immune activation and induction of memory: lessons learned from controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 2016;143(2):224-35.
92. Elloso MM, van der Heyde HC, vande Waa JA, Manning DD, Weidanz WP. Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1994;153(3):1187-94.
93. Farouk SE, Mincheva-Nilsson L, Krensky AM, Dieli F, Troye-Blomberg M. Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *European journal of immunology*. 2004;34(8):2248-56.
94. Li C, Mannoor K, Inafuku M, Taniguchi T, Inamine Y, Miyazaki T, et al. Protective function of an unconventional gammadelta T cell subset against malaria infection in apoptosis inhibitor deficient mice. *Cellular immunology*. 2012;279(2):151-9.
95. Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, Santoni A. NK cells and interferons. *Cytokine & growth factor reviews*. 2015;26(2):113-20.
96. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(10):645-57.
97. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of immunology*. 2002;169(6):2956-63.
98. McCall MB, Roestenberg M, Ploemen I, Teirlinck A, Hopman J, de Mast Q, et al. Memory-like IFN-gamma response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *European journal of immunology*. 2010;40(12):3472-7.
99. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*. 2010;129(2):147-53.
100. Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *BioMed research international*. 2015;2015:521957.
101. Perez-Mazliah D, Langhorne J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. *Frontiers in immunology*. 2014;5:671.
102. Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Guarin P, et al. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Frontiers in immunology*. 2014;5:630.

103. Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta tropica*. 2012;123(1):53-7.
104. Mastelic B, do Rosario AP, Veldhoen M, Renauld JC, Jarra W, Sponaas AM, et al. IL-22 Protects Against Liver Pathology and Lethality of an Experimental Blood-Stage Malaria Infection. *Frontiers in immunology*. 2012;3:85.
105. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends in parasitology*. 2011;27(10):442-9.
106. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *International journal of biological sciences*. 2011;7(9):1427-42.
107. Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ. Malarial anemia: of mice and men. *Blood*. 2007;110(1):18-28.
108. Souza MC, Padua TA, Henriques MG. Endothelial-Leukocyte Interaction in Severe Malaria: Beyond the Brain. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:168937.
109. Freitas do Rosario AP, Langhorne J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. *International journal for parasitology*. 2012;42(6):549-55.
110. Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research*. 2015;4.
111. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, et al. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS pathogens*. 2009;5(4):e1000364.
112. Freitas do Rosario AP, Lamb T, Spence P, Stephens R, Lang A, Roers A, et al. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *Journal of immunology*. 2012;188(3):1178-90.
113. Goncalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infection and immunity*. 2010;78(11):4763-72.

114. Bueno LL, Morais CG, Araujo FF, Gomes JA, Correa-Oliveira R, Soares IS, et al. Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. PloS one. 2010;5(3):e9623.
115. Azcarate IG, Marin-Garcia P, Kamali AN, Perez-Benavente S, Puyet A, Diez A, et al. Differential immune response associated to malaria outcome is detectable in peripheral blood following Plasmodium yoelii infection in mice. PloS one. 2014;9(1):e85664.
116. Wu Y, Wang QH, Zheng L, Feng H, Liu J, Ma SH, et al. Plasmodium yoelii: distinct CD4(+)CD25(+) regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. Experimental parasitology. 2007;115(3):301-4.
117. Vigario AM, Gorgette O, Dujardin HC, Cruz T, Cazenave PA, Six A, et al. Regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. International journal for parasitology. 2007;37(8-9):963-73.
118. Cambos M, Belanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T. Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during Plasmodium chabaudi adami infection and do not contribute to immune evasion. International journal for parasitology. 2008;38(2):229-38.
119. Gregori S, Passerini L, Roncarolo MG. Clinical Outlook for Type-1 and FOXP3(+) T Regulatory Cell-Based Therapy. Frontiers in immunology. 2015;6:593.
120. Butler NS, Harris TH, Blader IJ. Regulation of immunopathogenesis during Plasmodium and Toxoplasma infections: more parallels than distinctions? Trends in parasitology. 2013;29(12):593-602.
121. Gorosito Serran M, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Gruppi A. The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. FEBS letters. 2015;589(22):3362-9.
122. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Annual review of immunology. 2012;30:221-41.
123. Liu Y, Chen Y, Li Z, Han Y, Sun Y, Wang Q, et al. Role of IL-10-producing regulatory B cells in control of cerebral malaria in Plasmodium berghei infected mice. European journal of immunology. 2013;43(11):2907-18.

124. Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nature medicine*. 2013;19(2):168-78.
125. Jimenez-Diaz MB, Viera S, Fernandez-Alvaro E, Angulo-Barturen I. Animal models of efficacy to accelerate drug discovery in malaria. *Parasitology*. 2014;141(1):93-103.
126. Siu E, Ploss A. Modeling malaria in humanized mice: opportunities and challenges. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1342:29-36.
127. Vincke IH, Lips M. [Not Available]. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale (1920)*. 1948;28(1):97-104.
128. Rodhain J. [Plasmodium vinckei n. sp.; second plasmodium parasite of wild rodents at Katange]. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale (1920)*. 1952;32(3):275-9.
129. Landau I. [DESCRIPTION OF PLASMODIUM CHABAUDI N. SP., PARASITE OF AFRICAN RODENTS]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*. 1965;260:3758-61.
130. Wery M. Studies on the sporogony of rodent malaria parasites. *Annales des Societes belges de medecine tropicale, de parasitologie, et de mycologie*. 1968;48(1):11-137.
131. Li C, Seixas E, Langhorne J. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Medical microbiology and immunology*. 2001;189(3):115-26.
132. Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends in parasitology*. 2012;28(2):73-82.
133. Sanni LA, Fonseca LF, Langhorne J. Mouse models for erythrocytic-stage malaria. *Methods in molecular medicine*. 2002;72:57-76.
134. Stevenson MM, Tam MF. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clinical and experimental immunology*. 1993;92(1):77-83.
135. Lopes LN, Folha Santos FA, Marques Oliveira LC, Ferreira Araujo MT, Sequeira CG, Libonati RM, et al. An analysis of the influence of sex hormones on Balb/c mice infected with *Plasmodium berghei*. *Microbial pathogenesis*. 2016;90:7-12.

136. Shan Y, Liu J, Jiang YJ, Shang H, Jiang D, Cao YM. Age-related susceptibility and resistance to nonlethal *Plasmodium yoelii* infection in C57BL/6 mice. *Folia parasitologica*. 2012;59(3):153-61.
137. Meadows DN, Bahous RH, Best AF, Rozen R. High Dietary Folate in Mice Alters Immune Response and Reduces Survival after Malarial Infection. *PloS one*. 2015;10(11):e0143738.
138. Mejia P, Trevino-Villarreal JH, Hine C, Harputlugil E, Lang S, Calay E, et al. Dietary restriction protects against experimental cerebral malaria via leptin modulation and T-cell mTORC1 suppression. *Nature communications*. 2015;6:6050.
139. He X, Yan J, Zhu X, Wang Q, Pang W, Qi Z, et al. Vitamin D inhibits the occurrence of experimental cerebral malaria in mice by suppressing the host inflammatory response. *Journal of immunology*. 2014;193(3):1314-23.
140. Tetsutani K, Ishiwata K, Ishida H, Tu L, Torii M, Hamano S, et al. Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice. *European journal of immunology*. 2009;39(10):2822-30.
141. Matar CG, Jacobs NT, Speck SH, Lamb TJ, Moormann AM. Does EBV alter the pathogenesis of malaria? *Parasite immunology*. 2015;37(9):433-45.
142. Mueller AK, Behrends J, Hagens K, Mahlo J, Schaible UE, Schneider BE. Natural transmission of *Plasmodium berghei* exacerbates chronic tuberculosis in an experimental co-infection model. *PloS one*. 2012;7(10):e48110.
143. Zuzarte-Luis V, Mota MM, Vigario AM. Malaria infections: what and how can mice teach us. *Journal of immunological methods*. 2014;410:113-22.
144. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votycka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3):e0004349.
145. World Health O. Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series. 2010(949):xii-xiii, 1-186, back cover.
146. Leishman WB. ON THE POSSIBILITY OF THE OCCURRENCE OF TRYPANOSOMIASIS IN INDIA. *British medical journal*. 1903;1(2213):1252-4.
147. Nazzaro G, Rovaris M, Veraldi S. Leishmaniasis: a disease with many names. *JAMA dermatology*. 2014;150(11):1204.

148. Ross R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. *British medical journal*. 1903;2(2239):1401.
149. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(2):265-94.
150. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Ministério da Saúde - Departamento de Vigilância Epidemiológica., editor. Brasil: Editora do Ministério da Saúde; 2007.
151. Ministério da Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. 1 ed. Brasil: Editora do Ministério da Saúde.,; 2006. 136 p.
152. Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:99.
153. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 2011;331(6018):775-8.
154. Scheffter SM, Ro YT, Chung IK, Patterson JL. The complete sequence of Leishmania RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology*. 1995;212(1):84-90.
155. Ito MM, Catanhede LM, Katsuragawa TH, Silva Junior CF, Camargo LM, Mattos Rde G, et al. Correlation between presence of Leishmania RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2015;81(5):533-40.
156. Catanhede LM, da Silva Junior CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolete R, Salcedo JM, et al. Further Evidence of an Association between the Presence of Leishmania RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(9):e0004079.
157. Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. 2012;3:251.
158. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(8):604-15.
159. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. 2015.

160. Karimkhani C, Wanga V, Coffeng LE, Naghavi P, Dellavalle RP, Naghavi M. Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious diseases*. 2016.
161. World Health Organization. Leishmaniasis- situation and trends 2016 [cited 2016 20 de abril]. Available from: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/.
162. World Health Organization. Leishmaniasis - burden and distribution 2016 [cited 2016 21 de abril]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.
163. de Brito ME, Andrade MS, Dantas-Torres F, Rodrigues EH, Cavalcanti Mde P, de Almeida AM, et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(4):425-9.
164. Jennings YL, de Souza AA, Ishikawa EA, Shaw J, Lainson R, Silveira F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Para state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* x *Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi*. *Parasite*. 2014;21:39.
165. Shaw JJ, De Faria DL, Basano SA, Corbett CE, Rodrigues CJ, Ishikawa EA, et al. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Monte Negro, Rondonia state, western Amazonia, Brazil. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2007;101(8):681-8.
166. Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2006;11(9):1388-98.
167. Vieira VR, Azevedo AC, Alves JR, Guimaraes AE, Aguiar GM. Ecological Aspects of Phlebotomine Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Areas of American Cutaneous Leishmaniasis, in the Municipality of Paraty, Rio de Janeiro, Brazil. I-Index of Abundance by Location and Type of Capture. *Journal of medical entomology*. 2015;52(5):886-95.
168. Saúde Md. Casos de leishmaniose tegumentar americana. Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2014. Brasil: Ministério da Saúde; 2016 [cited 2016 22 de abril]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>.

169. Roque AL, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International journal for parasitology Parasites and wildlife*. 2014;3(3):251-62.
170. Cassia-Pires R, Boite MC, D'Andrea PS, Herrera HM, Cupolillo E, Jansen AM, et al. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(12):e3389.
171. Oliveira GC, Paiz LM, Menozzi BD, Lima Mde S, de Moraes CC, Langoni H. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*. 2015;24(4):464-70.
172. Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, et al. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & vectors*. 2011;4:187.
173. Dominguez M, Moreno I, Aizpurua C, Torano A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2003;5(6):507-13.
174. Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;28:691-703.
175. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008;321(5891):970-4.
176. Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(1):58-85.
177. Cecilio P, Perez-Cabezas B, Santarem N, Maciel J, Rodrigues V, Cordeiro da Silva A. Deception and manipulation: the arms of *leishmania*, a successful parasite. *Frontiers in immunology*. 2014;5:480.
178. Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and immunity*. 2002;70(2):826-35.
179. Beattie L, Kaye PM. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? *Cellular microbiology*. 2011;13(11):1659-67.

180. Carlsen ED, Liang Y, Shelite TR, Walker DH, Melby PC, Soong L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology*. 2015;182(2):109-18.
181. Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in parasitology*. 2009;25(11):505-10.
182. Lievin-Le Moal V, Loiseau PM. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. *The FEBS journal*. 2016;283(4):598-607.
183. Arango Duque G, Descoteaux A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current opinion in microbiology*. 2015;26:32-40.
184. Courret N, Frehel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 11):2303-16.
185. Forestier CL, Machu C, Loussert C, Pescher P, Spath GF. Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell host & microbe*. 2011;9(4):319-30.
186. Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*. 2015;10(1):111-29.
187. McConville MJ, Naderer T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annual review of microbiology*. 2011;65:543-61.
188. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in parasitology*. 2006;22(9):439-45.
189. Dostalova A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*. 2012;5:276.
190. Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(4):340-4.
191. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*. 2007;37(10):1097-106.

192. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite immunology*. 2014;36(8):367-76.
193. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(7):1283-99.
194. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
195. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends in parasitology*. 2016;32(5):392-401.
196. Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, Martins LS, Dos Santos LM, Vaz LG, et al. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite immunology*. 2014;36(1):13-31.
197. Falcao SA, Weinkopff T, Hurrell BP, Celes FS, Curvelo RP, Prates DB, et al. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(3):e0003601.
198. Hurrell BP, Schuster S, Grun E, Coutaz M, Williams RA, Held W, et al. Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. *PLoS pathogens*. 2015;11(5):e1004929.
199. Thalhofer CJ, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infection and immunity*. 2011;79(1):108-17.
200. McFarlane E, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infection and immunity*. 2008;76(2):532-41.
201. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Frontiers in immunology*. 2014;5:508.
202. Galani IE, Andreakos E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *Journal of leukocyte biology*. 2015;98(4):557-64.
203. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*. 2014;5:491.

204. Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Frontiers in immunology*. 2014;5:603.
205. Arena A, Capozza AB, Delfino D, Iannello D. Production of TNF alpha and interleukin 6 by differentiated U937 cells infected with *Leishmania major*. *The new microbiologica*. 1997;20(3):233-40.
206. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. 2007;26(4):519-31.
207. Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(6):1253-65.
208. Ritter U, Meissner A, Scheidig C, Korner H. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *European journal of immunology*. 2004;34(6):1542-50.
209. Feijo D, Tiburcio R, Ampuero M, Brodskyn C, Tavares N. Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. *Journal of immunology research*. 2016;2016:3967436.
210. Kautz-Neu K, Noordegraaf M, Dinges S, Bennett CL, John D, Clausen BE, et al. Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(5):885-91.
211. Marovich MA, McDowell MA, Thomas EK, Nutman TB. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *Journal of immunology*. 2000;164(11):5858-65.
212. Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *European journal of immunology*. 1998;28(4):1389-400.
213. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:83.
214. Olekhovitch R, Bousso P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. *Trends in parasitology*. 2015;31(12):653-64.

215. Hurdal R, Brombacher F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunology letters*. 2014;161(2):179-83.
216. da Silva Santos C, Brodskyn CI. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in public health*. 2014;2:165.
217. Loeuillet C, Banuls AL, Hide M. Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasites & vectors*. 2016;9(1):144.
218. Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of Leishmania (Viannia) braziliensis in mice. *Infection and immunity*. 2007;75(8):3823-32.
219. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Human immunology*. 2009;70(6):383-90.
220. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:485-517.
221. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *Journal of immunology*. 2009;182(5):3039-46.
222. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarencio J, et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *European journal of immunology*. 2010;40(10):2830-6.
223. Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(1):75-8.
224. Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following Leishmania major infection. *PLoS pathogens*. 2013;9(3):e1003243.
225. Raker VK, Domogalla MP, Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Frontiers in immunology*. 2015;6:569.
226. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(6):425-8.
227. Deniz G, van de Veen W, Akdis M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):527-35.

228. Lewkowicz N, Mycko MP, Przygodzka P, Cwiklinska H, Cichalewska M, Matysiak M, et al. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal immunology*. 2016;9(2):364-78.
229. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature*. 2012;484(7395):514-8.
230. Costa DL, Guimaraes LH, Cardoso TM, Queiroz A, Lago E, Roselino AM, et al. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. *Human immunology*. 2013;74(12):1491-500.
231. Carneiro FP, De Magalhaes AV, De Jesus Abreu Almeida Couto M, Bocca AL, Muniz-Junqueira MI, Ribeiro Sampaio RN. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite immunology*. 2009;31(10):646-51.
232. Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, et al. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infection and immunity*. 2009;77(4):1465-74.
233. Ehrlich A, Castilho TM, Goldsmith-Pestana K, Chae WJ, Bothwell AL, Sparwasser T, et al. The immunotherapeutic role of regulatory T cells in *Leishmania (Viannia) panamensis* infection. *Journal of immunology*. 2014;193(6):2961-70.
234. Rodriguez-Pinto D, Navas A, Blanco VM, Ramirez L, Garcerant D, Cruz A, et al. Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(4):e1627.
235. Belkaid Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert opinion on biological therapy*. 2003;3(6):875-85.
236. S CF, de Moura TR, Clarencio J, Brodskyn C, Barral A, de Oliveira CI. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. *International journal for parasitology*. 2012;42(8):771-80.
237. Buxbaum LU. Interleukin-10 from T cells, but not macrophages and granulocytes, is required for chronic disease in *Leishmania mexicana* infection. *Infection and immunity*. 2015;83(4):1366-71.
238. Costa DL, Cardoso TM, Queiroz A, Milanezi CM, Bacellar O, Carvalho EM, et al. Tr-1-like CD4+CD25-CD127-/lowFOXP3- cells are the main source of

interleukin 10 in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(5):708-18.

239. Novais FO, Scott P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Seminars in immunopathology*. 2015;37(3):251-9.

240. Faria DR, Souza PE, Duraes FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*. 2009;31(8):432-9.

241. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS pathogens*. 2013;9(7):e1003504.

242. Antonelli LR, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KC, Guimaraes LH, Bacellar O, et al. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infection and immunity*. 2006;74(11):6317-23.

243. Gollob KJ, Antonelli LR, Faria DR, Keesen TS, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *International immunopharmacology*. 2008;8(10):1338-43.

244. Mou Z, Liu D, Okwor I, Jia P, Orihara K, Uzonna JE. MHC class II restricted innate-like double negative T cells contribute to optimal primary and secondary immunity to *Leishmania major*. *PLoS pathogens*. 2014;10(9):e1004396.

245. Loria-Cervera EN, Andrade-Narvaez FJ. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2014;56(1):1-11.

246. Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(9):e0003889.

247. Sacks DL, Melby PC. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al]. 2015;108:19.2.1-24.

248. Oliveira Cld, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2004;1(1):81-6.

249. Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *International journal for parasitology*. 2003;33(12):1373-83.
250. Cortes DF, Carneiro MB, Santos LM, Souza TC, Maioli TU, Duz AL, et al. Low and high-dose intradermal infection with *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* in C57BL/6 mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010;105(6):736-45.
251. Baldwin TM, Elso C, Curtis J, Buckingham L, Handman E. The site of *Leishmania major* infection determines disease severity and immune responses. *Infection and immunity*. 2003;71(12):6830-4.
252. Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends in parasitology*. 2009;25(8):383-91.
253. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(10):1941-53.
254. Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiops*. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1984;78(1):25-34.
255. de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarencio J, Noronha A, Barral A, et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and immunity*. 2005;73(9):5827-34.
256. DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and immunity*. 1998;66(2):827-9.
257. Calabrese KS, da Costa SC. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 1:49-56.
258. Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and immunity*. 1993;61(7):2952-9.

259. Pereira BA, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Veterinary parasitology*. 2008;158(4):239-55.
260. Lemos de Souza V, Ascencao Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(15):1807-15.
261. Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;66(4):338-45.
262. Vanloubbeeck YF, Ramer AE, Jie F, Jones DE. CD4+ Th1 cells induced by dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* do not promote healing. *Infection and immunity*. 2004;72(8):4455-63.
263. Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infection and immunity*. 2002;70(4):2151-8.
264. Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of immunology*. 2000;165(1):364-72.
265. Gorsich EE, Ezenwa VO, Jolles AE. Nematode-coccidia parasite co-infections in African buffalo: Epidemiology and associations with host condition and pregnancy. *International journal for parasitology Parasites and wildlife*. 2014;3(2):124-34.
266. Susi H, Barres B, Vale PF, Laine AL. Co-infection alters population dynamics of infectious disease. *Nature communications*. 2015;6:5975.
267. Telfer S, Lambin X, Birtles R, Beldomenico P, Burthe S, Paterson S, et al. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science*. 2010;330(6001):243-6.
268. Vaumourin E, Vourc'h G, Gasqui P, Vayssier-Taussat M. The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasites & vectors*. 2015;8:545.
269. Birger RB, Kouyos RD, Cohen T, Griffiths EC, Huijben S, Mina MJ, et al. The potential impact of coinfection on antimicrobial chemotherapy and drug resistance. *Trends in microbiology*. 2015;23(9):537-44.

270. Griffiths EC, Pedersen AB, Fenton A, Petchey OL. Analysis of a summary network of co-infection in humans reveals that parasites interact most via shared resources. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2014;281(1782):20132286.
271. Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, Djuardi Y, Hamid F, Kaiser MM, et al. Polyparasitism and its impact on the immune system. *International journal for parasitology*. 2010;40(10):1171-6.
272. Takem EN, Roca A, Cunningham A. The association between malaria and non-typhoid *Salmonella* bacteraemia in children in sub-Saharan Africa: a literature review. *Malaria journal*. 2014;13:400.
273. Degarege A, Erko B. Epidemiology of Plasmodium and Helminth Coinfection and Possible Reasons for Heterogeneity. *BioMed research international*. 2016;2016:3083568.
274. Salazar-Castanon VH, Legorreta-Herrera M, Rodriguez-Sosa M. Helminth parasites alter protection against Plasmodium infection. *BioMed research international*. 2014;2014:913696.
275. Sokhna C, Le Hesran JY, Mbaye PA, Akiana J, Camara P, Diop M, et al. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Malaria journal*. 2004;3:43.
276. Getie S, Wondimeneh Y, Getnet G, Workineh M, Worku L, Kassu A, et al. Prevalence and clinical correlates of *Schistosoma mansoni* co-infection among malaria infected patients, Northwest Ethiopia. *BMC research notes*. 2015;8:480.
277. Mazigo HD, Kidenya BR, Ambrose EE, Zinga M, Waihenya R. Association of intestinal helminths and *P. falciparum* infections in co-infected school children in northwest Tanzania. *Tanzania journal of health research*. 2010;12(4):299-301.
278. Tay SC, Badu K, Mensah AA, Gbedema SY. The prevalence of malaria among HIV seropositive individuals and the impact of the co- infection on their hemoglobin levels. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2015;14:10.
279. Rattanapunya S, Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rueangweerayut R, Na-Bangchang K. Prevalence of malaria and HIV coinfection and influence of HIV infection on malaria disease severity in population residing in malaria endemic area along the Thai-Myanmar border. *Acta tropica*. 2015;145:55-60.

280. Serghides L, Finney CA, Ayi K, Loutfy M, Kain KC. Chronic HIV infection impairs nonopsonic phagocytosis of malaria parasites. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2015;68(2):128-32.
281. World Health Organization. Malaria in HIV/AIDS patients 2016 [cited 2016 01 de junho de 2016]. Available from: http://www.who.int/malaria/areas/high_risk_groups/hiv_aids_patients/en/.
282. Guerra JA, Coelho LI, Pereira FR, Siqueira AM, Ribeiro RL, Almeida TM, et al. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;85(3):524-7.
283. Guimaraes LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103(7):712-5.
284. Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *The British journal of dermatology*. 2009;160(2):311-8.
285. Azeredo-Coutinho RB, Pimentel MI, Zanini GM, Madeira MF, Cataldo JI, Schubach AO, et al. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *Acta tropica*. 2016;154:42-9.
286. O'Neal SE, Guimaraes LH, Machado PR, Alcantara L, Morgan DJ, Passos S, et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(1):142-8.
287. Newlove T, Guimaraes LH, Morgan DJ, Alcantara L, Glesby MJ, Carvalho EM, et al. Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(4):551-5.
288. Yoeli M. Non-pigmented malaria parasites in the bone marrow from a mixed infection of leishmania and plasmodium vivax. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1948;42(1):99.
289. van den Bogaart E, Berkhout MM, Nour AB, Mens PF, Talha AB, Adams ER, et al. Concomitant malaria among visceral leishmaniasis in-patients from Gedarif and Sennar States, Sudan: a retrospective case-control study. *BMC public health*. 2013;13:332.

290. van den Bogaart E, Berkhout MM, Adams ER, Mens PF, Sentongo E, Mbulamberi DB, et al. Prevalence, features and risk factors for malaria co-infections amongst visceral leishmaniasis patients from Amudat Hospital, Uganda. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(4):e1617.
291. Bin Mohanna MA. Leishmaniasis, malaria, and schistosomiasis concurrently in an 8-year-old boy. *Saudi medical journal*. 2015;36(4):494-6.
292. Ab Rahman AK, Abdullah FH. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and malaria coinfection in an immigrant in the state of Terengganu, Malaysia: A case report. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2011;44(1):72-6.
293. Sah SP, Sharma SK, Rani S. Kala azar associated with malaria. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2002;126(3):382-3.
294. van den Bogaart E, Talha AB, Straetemans M, Mens PF, Adams ER, Grobusch MP, et al. Cytokine profiles amongst Sudanese patients with visceral leishmaniasis and malaria co-infections. *BMC immunology*. 2014;15:16.
295. van den Bogaart E, de Bes HM, Balraadjsing PP, Mens PF, Adams ER, Grobusch MP, et al. *Leishmania donovani* infection drives the priming of human monocyte-derived dendritic cells during *Plasmodium falciparum* co-infections. *Parasite immunology*. 2015;37(9):453-69.
296. Coleman RE, Edman JD, Semprevivo LH. Interactions between *Plasmodium yoelii* and *Leishmania mexicana amazonensis* in *Leishmania* resistant C57B1/6 mice. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1988;39(6):540-4.
297. Coleman RE, Edman JD, Semprevivo LH. *Leishmania mexicana*: effect of concomitant malaria on cutaneous leishmaniasis. Development of lesions in a *Leishmania*-susceptible (BALB/c) strain of mouse. *Experimental parasitology*. 1988;65(2):269-76.
298. Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert reviews in molecular medicine*. 2006;8(6):1-22.
299. Matuschewski K. Murine infection models for vaccine development: the malaria example. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2013;9(3):450-6.
300. Coleman RE, Edman JD, Semprevivo LH. Interactions between malaria (*Plasmodium yoelii*) and leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*): effect of concomitant infection on host activity, host body temperature, and vector engorgement success. *Journal of medical entomology*. 1988;25(6):467-71.

301. Coleman RE, Edman JD, Semprevivo LH. Metastasis of *Leishmania mexicana* in a *Leishmania*-resistant mouse strain (C/57) following concomitant malarial infection. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1988;82(4):399-401.
302. Qi Z, Han X, Zhang Y, Wang J, Cao YM. *Listeria monocytogenes* inoculation protects mice against blood-stage *Plasmodium yoelii* infection. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2013;229(2):87-96.
303. Cunnington AJ, de Souza JB, Walther M, Riley EM. Malaria impairs resistance to *Salmonella* through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nature medicine*. 2012;18(1):120-7.
304. MacLennan CA. Host defense against malaria favors *Salmonella*. *Nature medicine*. 2012;18(1):21-2.
305. Santiago HC, Oliveira MA, Bambirra EA, Faria AM, Afonso LC, Vieira LQ, et al. Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Infection and immunity*. 1999;67(9):4939-44.
306. La Flamme AC, Scott P, Pearce EJ. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite immunology*. 2002;24(7):339-45.
307. Walk EL, McLaughlin S, Coad J, Weed SA. Use of high frequency ultrasound to monitor cervical lymph node alterations in mice. *PloS one*. 2014;9(6):e100185.
308. Dunn TB. Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. *Journal of the National Cancer Institute*. 1954;14(6):1281-433.
309. Saha K, Chattopadhyaya D, Kulpati DD. Concomitant kala-azar, malaria, and progressive unstable indeterminate leprosy in an 8-year-old child. *Journal of tropical pediatrics*. 1998;44(4):247-8.
310. Kolbaum J, Eschbach ML, Steeg C, Jacobs T, Fleischer B, Breloer M. Efficient control of *Plasmodium yoelii* infection in BALB/c and C57BL/6 mice with pre-existing *Strongyloides ratti* infection. *Parasite immunology*. 2012;34(7):388-93.
311. Niikura M, Kamiya S, Kita K, Kobayashi F. Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(10):6877-84.

312. Karadjian G, Berrebi D, Dogna N, Vallarino-Lhermitte N, Bain O, Landau I, et al. Co-infection restrains *Litomosoides sigmodontis* filarial load and plasmodial *P. yoelii* but not *P. chabaudi* parasitaemia in mice. *Parasite (Paris, France)*. 2014;21:16.
313. Kobayashi F, Morii T, Matsui T, Fujino T, Watanabe Y, Weidanz WP, et al. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parasitology research*. 1996;82(5):385-91.
314. Pereira CG, Silva AL, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza RA, Romao RP, et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary parasitology*. 2009;165(3-4):231-40.
315. Ribeiro-Gomes FL, Roma EH, Carneiro MB, Doria NA, Sacks DL, Peters NC. Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. *Infection and immunity*. 2014;82(7):2713-27.
316. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(2):969-77.
317. Carregaro V, Costa DL, Brodskyn C, Barral AM, Barral-Netto M, Cunha FQ, et al. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. *BMC microbiology*. 2013;13:102.
318. Chen G, Feng H, Liu J, Qi ZM, Wu Y, Guo SY, et al. Characterization of immune responses to single or mixed infections with *P. yoelii* 17XL and *P. chabaudi* AS in different strains of mice. *Parasitology international*. 2010;59(3):400-6.
319. Shear HL, Srinivasan R, Nolan T, Ng C. Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1989;143(6):2038-44.
320. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clinical and experimental immunology*. 2003;133(2):145-52.
321. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infection and immunity*. 2004;72(10):5630-7.

322. Raza A, Khan MS, Ghanchi NK, Raheem A, Beg MA. Tumour necrosis factor, interleukin-6 and interleukin-10 are possibly involved in Plasmodium vivax-associated thrombocytopenia in southern Pakistani population. *Malaria journal*. 2014;13:323.
323. Mshana RN, Boulandi J, Mshana NM, Mayombo J, Mendome G. Cytokines in the pathogenesis of malaria: levels of IL-1 beta, IL-4, IL-6, TNF-alpha and IFN-gamma in plasma of healthy individuals and malaria patients in a holoendemic area. *Journal of clinical & laboratory immunology*. 1991;34(3):131-9.
324. Kinra P, Dutta V. Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. *Tropical biomedicine*. 2013;30(4):645-53.
325. Ashok D, Acha-Orbea H. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine Leishmania infection. *Trends in parasitology*. 2014;30(10):499-507.
326. Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG. T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(5):1329-36.
327. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):211-22.
328. Doherty TM, Coffman RL. Leishmania major: effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. *Experimental parasitology*. 1996;84(2):124-35.
329. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS pathogens*. 2006;2(6):e62.
330. de Meis J, Aurelio Farias-de-Oliveira D, Nunes Panzenhagen PH, Maran N, Villa-Verde DM, Morrot A, et al. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. *Journal of parasitology research*. 2012;2012:574020.
331. Seixas E, Ostler D. Plasmodium chabaudi chabaudi (AS): differential cellular responses to infection in resistant and susceptible mice. *Experimental parasitology*. 2005;110(4):394-405.
332. Andrade CF, Gameiro J, Nagib PR, Carvalho BO, Talaisys RL, Costa FT, et al. Thymic alterations in Plasmodium berghei-infected mice. *Cellular immunology*. 2008;253(1-2):1-4.
333. Francelin C, Paulino LC, Gameiro J, Verinaud L. Effects of Plasmodium berghei on thymus: high levels of apoptosis and premature egress of

CD4(+)CD8(+) thymocytes in experimentally infected mice. *Immunobiology*. 2011;216(10):1148-54.

334. Lima AC, Francelin C, Ferrucci DL, Stach-Machado DR, Verinaud L. Thymic alterations induced by *Plasmodium berghei*: expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Cellular immunology*. 2012;279(1):53-9.

335. Khanam S, Sharma S, Pathak S. Lethal and nonlethal murine malarial infections differentially affect apoptosis, proliferation, and CD8 expression on thymic T cells. *Parasite immunology*. 2015;37(7):349-61.

336. Beeson JG, Osier FH, Engwerda CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends in parasitology*. 2008;24(12):578-84.

337. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite immunology*. 2006;28(1-2):51-60.

338. Sanchez-Torres L, Rodriguez-Ropon A, Aguilar-Medina M, Favila-Castillo L. Mouse splenic CD4+ and CD8+ T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. *Parasite immunology*. 2001;23(12):617-26.

339. Helmy H, Jonsson G, Troye-Blomberg M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infection and immunity*. 2000;68(3):1485-90.

340. Mukherjee P, Devi YS, Chauhan VS. Blood stage malaria antigens induce different activation-induced cell death programs in splenic CD4+T cells. *Parasite immunology*. 2008;30(10):497-514.

341. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaisi A, Akharid K, Silvestre R, et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(2):e2567.

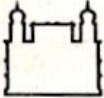

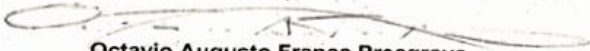
342. Graumann K, Hippe D, Gross U, Luder CG. Mammalian apoptotic signalling pathways: multiple targets of protozoan parasites to activate or deactivate host cell death. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2009;11(13):1079-87.

343. Cabral-Piccin MP, Guillermo LV, Vellozo NS, Filardy AA, Pereira-Marques ST, Rigoni TS, et al. Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell death & disease*. 2016;7:e2232.

344. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):169-80.
345. Urban BC, Ing R, Stevenson MM. Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system. *Current topics in microbiology and immunology*. 2005;297:25-70.
346. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(7):1628-42.
347. Soulard V, Roland J, Sellier C, Gruner AC, Leite-de-Moraes M, Franetich JF, et al. Primary infection of C57BL/6 mice with *Plasmodium yoelii* induces a heterogeneous response of NKT cells. *Infection and immunity*. 2007;75(5):2511-22.
348. Miller JL, Sack BK, Baldwin M, Vaughan AM, Kappe SH. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell reports*. 2014;7(2):436-47.
349. Zarin P, Chen EL, In TS, Anderson MK, Zuniga-Pflucker JC. Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cellular immunology*. 2015;296(1):70-5.
350. Kopacz J, Kumar N. gamma delta T-cells may interfere with a productive immune response in *Plasmodium yoelii* infections. *International journal for parasitology*. 1999;29(5):737-42.

8 Anexos

8.1 Anexo 1- Licença do comitê de ética no uso de animais (CEUA)

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência</p>	 <p>CEUA Fiocruz Comissão de Ética no Uso de Animais</p>
LICENÇA	
LW-17/11	
<p>Certificamos que o protocolo (P-87/10-5), intitulado "Co-infecção por malária e leishmaniose: avaliação das alterações na resposta imune e o impacto de uma infecção sobre a evolução clínica da outra.", sob a responsabilidade de DALMA MARIA BANIC, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p>	
<p>Esta licença tem validade até 09/06/2015 e inclui o uso total de :</p>	
<p><i>Mus musculus</i> - 2172 Fêmeas de BALB/c - BM, Idade: 6 Semana(s).</p>	
<p><i>Mus musculus</i> - 2172 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s).</p>	
<p><i>Mus musculus</i> - 2172 Fêmeas de BP2, Idade: 6 Semana(s).</p>	
<p>Rio de Janeiro, 9 de junho de 2011</p>	
<p> Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA</p>	
<p><small>Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ Telefona: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br</small></p>	



Malaria-Cutaneous Leishmaniasis Co-infection: Influence on Disease Outcomes and Immune Response

Raquel A. Pinna¹, Danielle S. dos Santos², Daiana S. P. da Silva¹,
 Joseli de Oliveira Ferreira³, Dea M. S. V. Verde², Paula M. De Luca^{3*} and
 Dalma M. Banic^{1*}

¹ Laboratory of Simuliids, Onchocerciasis and Sympatric Diseases: Mansonelliasis and Malaria, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ² Laboratory of Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ³ Laboratory of Immunoparasitology Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Emilio Luis Malchiodi,
 University of Buenos Aires, Argentina

Reviewed by:

Hira Nakhasi,
 United States Food and Drug
 Administration, USA
 Rodolfo Cordeiro Giunchetti,
 Universidade Federal de Minas
 Gerais, Brazil

*Correspondence:

Paula M. De Luca
 pmdeluca@ioc.fiocruz.br
 Dalma M. Banic
 banic@ioc.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
 Microbial Immunology,
 a section of the journal
 Frontiers in Microbiology

Received: 25 March 2016

Accepted: 07 June 2016

Published: xx June 2016

Citation:

Pinna RA, dos Santos DS, da Silva
 DSP, de Oliveira Ferreira J, Verde
 DMSV, De Luca PM and Banic DM
 (2016) Malaria-Cutaneous
 Leishmaniasis Co-infection: Influence
 on Disease Outcomes and Immune
 Response. *Front. Microbiol.* 7:982.
 doi: 10.3389/fmicb.2016.00982

Malaria and Cutaneous Leishmaniasis (CL) are co-endemic throughout large regions in tropical countries and co-infection may impact the evolution of host-parasite interactions. In the present study, we evaluate Malaria/Leishmaniasis disease outcome, Th1/Th2 cytokine levels and the CD4 and CD8 T-cell profiles in a co-infection murine model (BALB/c) of *Plasmodium yoelii* 17XNL (Py) and *Leishmania amazonensis* (La) or *L. braziliensis* (Lb). Malaria parasitaemia was assessed through blood strains stained with Giemsa. *Leishmania* lesions were monitored with a digital caliper and parasite loads determined by limiting-dilution assay. Serum levels of IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17 were determined using multiplexed bead assay and expression of CD3, CD4, and CD8 T-cells markers were determined by Flow Cytometry in the thymus, spleens and lymph nodes. Parasitaemia in Lb+Py co-infected group was lower than in Py single-infected group, suggesting a protective effect of Lb co-infection in Malaria progression. In contrast, La+Py co-infection increased parasitaemia, patent infection and induced mortality in non-lethal Malaria infection. Regarding Leishmaniasis, Lb+Py co-infected group presented smaller lesions and less ulceration than Lb single-infected animals. In contrast, La+Py co-infected group presented only a transitory delay on the development of lesions when compared to La single-infected mice. Decreased levels of IFN- γ , TNF, IL-6, and IL-10 were observed in the serum of co-infected groups, demonstrating a modulation of Malaria immune response by *Leishmania* co-infections. We observed an intense thymic atrophy in Py single-infected and co-infected groups, which recovered earlier in co-infected animals. The CD4 and CD8 T cell profiles in thymus, spleens and lymph nodes did not differ between Py single and co-infected groups, except for a decrease in CD4+CD8+ T cells which also increased faster in co-infected mice. Our results suggest that Py and *Leishmania* co-infection may change disease outcome. Interestingly Malaria outcome can be altered according to the *Leishmania* specie involved. Alternatively Malaria infection reduced the severity or delayed the onset of leishmanial lesions. These alterations in Malaria and CL development seem to be closely related with changes in the immune response as demonstrated by alteration in serum cytokine levels and thymus/spleens T cell phenotypes dynamics during infection.

Keywords: co-infection, Malaria, Leishmaniasis, immunology, cytokine, *Plasmodium yoelii*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*

115 INTRODUCTION

116
117 Malaria and Cutaneous Leishmaniasis (CL) are two of the
118 world's most important vector-borne parasitic diseases (World
119 Health Organization, 2010, 2015; Alvar et al., 2012). Malaria,
120 an infectious disease caused by *Plasmodium* genus parasites,
121 is an important cause of global mortality and morbidity. Half
122 of the world population is at risk of contracting Malaria,
123 with approximately 214 million cases and 438 000 deaths in
124 2015, amongst the 3.2 billion people living at risk of infection
125 (World Health Organization, 2015). Humans can be infected
126 by five *Plasmodium* species: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*,
127 *P. malariae*, and *P. knowlesi*. Although *P. falciparum* accounts
128 for the great majority of morbidity and mortality, *P. vivax*
129 has a wider geographic distribution and causes considerable
130 symptomatic disease (Battle et al., 2014). Malaria infection has
131 a variable clinical phenotype, ranging from a mild febrile illness
132 to severe disease and death, but infection can also occur in
133 the absence of clinical symptoms. These variations in disease
134 pattern are attributable to many factors, including the genetic
135 background of the host and pathogen, the complex relationship
136 between the parasite and host immune response, the dynamics
137 of parasite transmission and/or the biological interactions of
138 the parasites within the host (Good and Doolan, 2010; van
139 den Bogaart et al., 2012). Leishmaniasis is a complex disease
140 caused by different species of intracellular protozoan parasites
141 from the genus *Leishmania*, which also induces significant
142 morbidity and mortality throughout the world. According to
143 the World Health Organization (2014) 350 million people in
144 98 countries are at risk of infection. There are an estimated
145 annual 1.3 million new cases worldwide, of which 300,000 cases
146 are of Visceral Leishmaniasis (VL) and another 1 million of
147 CL. Seventy (70) to 75% of the CL cases occur in Afghanistan,
148 Algeria, Brazil, Colombia, Costa Rica, Ethiopia, Iran, Peru,
149 Sudan, and Syria (World Health Organization, 2016). CL is
150 caused by *L. major*, *L. tropica*, and *L. aethiopica* in the Old
151 World, whereas in the New World it is most frequently caused
152 by *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*,
153 and *L. guyanensis* (World Health Organization, 2010; Hartley
154 et al., 2014). Symptoms range from the more prevalent single self-
155 healing cutaneous lesions to uncontrolled parasite replication,
156 producing non-healing cutaneous, mucosal or even visceral
157 disease as well as chronic metastatic dissemination throughout
158 the skin. This spectrum of manifestations is multifactorial and
159 depends on complex interactions among parasite, host, and
160 environmental factors, including the *Leishmania* specie, genetic
161 background and immunological status of the host (Hartley et al.,
162 2014).

163 The overlapping geographic distribution of Malaria and
164 Leishmaniasis, especially in the tropical and subtropical countries
165 demonstrate clearly that the potential for interaction among
166 these parasites may occur and play a role in determining disease
167 outcome (Hotez et al., 2006; van den Bogaart et al., 2012; van
168 den Bogaart et al., 2014). Despite this natural coexistence, data
169 from concomitant infections are so far not available in the
170 literature (Ab Rahman and Abdullah, 2011; van den Bogaart
171 et al., 2012, 2014). Therefore, the impact of the dual infections

172 on the human population health remains unassessed particularly
173 in what concerns CL.

174 In the eighties, two studies in the murine model evaluated
175 the effect of non-lethal *P. yoelii* and *L. amazonensis* concomitant
176 infections in the course of each disease (Coleman et al., 1988a,b).
177 These studies demonstrated that severity and susceptibility to
178 both diseases were enhanced during co-infection. Since these
179 parasites do not compete for the same host cells, neither
180 anatomical sites nor resources, the interaction among them is
181 most likely indirect and related mostly to the host's immune
182 responses induced by each pathogen. However, in both studies
183 (Coleman et al., 1988a,b) the immunological mechanisms
184 involved were not investigated. Alternatively, several studies have
185 shown that outcome of Malaria and CL is determined, in part,
186 by the balance of pro- and anti-inflammatory immune responses
187 (Louis et al., 1998; Li et al., 2001; Silveira et al., 2009; Taylor-
188 Robinson, 2010; Medina et al., 2011; Freitas do Rosario and
189 Langhorne, 2012; Kedzierski and Evans, 2014).

190 The immune response against the blood stages of Malaria
191 parasites operate in concert and sequentially to control and
192 clear the parasitaemia by an early and strong pro inflammatory,
193 type 1 response (Th1), limiting parasite growth, followed by
194 a shift to anti-inflammatory, type 2 immune (Th2) response.
195 The balance between cytokines produced by pro inflammatory
196 and anti-inflammatory responses during different phases of the
197 blood stage infection determines the outcome of the disease
198 (Li et al., 2001). In contrast to the strong type 1 immune
199 response at the beginning of the Malaria infection, CL caused
200 by *L. amazonensis* generally results in type 2 cellular immune
201 response polarization (Silveira et al., 2009; Gollob et al., 2014).
202 On the other hand, in CL caused by *L. braziliensis*, there is
203 evidence that increased production of inflammatory cytokines
204 (IFN- γ and TNF- α) and absence of IL-10 is associated with
205 tissue destruction and the development of mucosal lesions (Dutra
206 et al., 2011; Gollob et al., 2014; Oliveira et al., 2014). In this
207 context, the current study was designed to evaluate the outcome
208 of Malaria-CL infections, the CD4 and CD8 T-cell profiles as well
209 as the Th1/Th2 cytokine levels in a co-infection murine model
210 (BALB/c) of *P. yoelii* 17XNL (non-lethal) and *L. amazonensis* or
211 *L. braziliensis*. Furthermore, as far as we know, this is the first
212 report utilizing *L. braziliensis* and *P. yoelii* 17XNL non-lethal
213 strain as a co-infection model.

215 MATERIALS AND METHODS

217 Animals, Parasites, and Infections

218 Female BALB/c mice (5–6 weeks old) were obtained from
219 the Center for Laboratory Animal Breeding of the Oswaldo
220 Cruz Foundation (FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).
221 Mice were maintained under specific pathogen-free conditions
222 in Experimental Animal Center of Leônidas Deane building
223 (FIOCRUZ). This research protocol was approved by the Ethical
224 Committee for Animal Use of FIOCRUZ/MS (license LW-17/11).
225

226 *P. yoelii* 17XNL (non-lethal strain) was provided by Dr Fábio
227 T.M. Costa at Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes,
228 Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil. Parasite

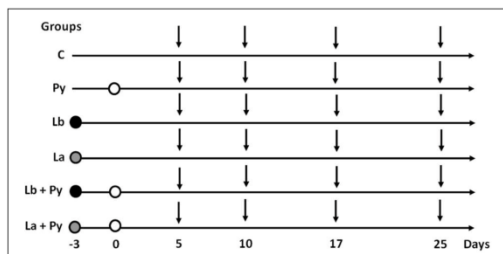
229 stabilates were stored at -196°C . To obtain the experimental
 230 inoculum of *P. yoelii* 17XNL, parasitized red blood cells (pRBCs)
 231 were defrosted and passed through three homologous donor
 232 mice.

233 Promastigotes of *L. braziliensis* (MCAN/BR/98/R69) and
 234 *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), provided by Laboratório de
 235 Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ,
 236 RJ, Brazil, were cultured in Schneider's medium supplemented
 237 with antibiotics (200 IU penicillin and 200 g streptomycin/ml)
 238 and 10% inactivated fetal calf serum (all from Sigma–Aldrich, St
 239 Louis, MO, USA). For *L. braziliensis* 2% of sterile human urine
 240 was also added to the cultures (Howard et al., 1991).

241 Eight to nine-week-old mice (~22g each) were divided
 242 randomly into six groups, **Figure 1**. Group C: comprised
 243 uninfected mice; Group Py: mice were injected intraperitoneally
 244 (i.p.) with 10^6 *P. yoelii* 17XNL pRBCs (0.2 mL); Groups Lb and
 245 La: mice were inoculated intradermally in both ears with either
 246 10^5 or 10^4 stationary phase promastigotes of *L. braziliensis* or
 247 *L. amazonensis*, respectively, as previously described (Belkaid
 248 et al., 2000); Groups Lb+Py and La+Py: mice were co-
 249 infected with both *P. yoelii* 17XNL and either *L. braziliensis* or
 250 *L. amazonensis*. Each group had 25 to 35 mice and experiments
 251 were repeated at least three times. First, mice were infected with
 252 *Leishmania* sp. and 3 days later with *P. yoelii* 17XNL, as shown in
 253 **Figure 1**. At 5, 10, 17, and 25 days post-*P. yoelii* 17XNL infection,
 254 six animals from each group were bled, for serum cytokine
 255 assay, and euthanized, for thymus, spleen, ears and lymph nodes
 256 removal. Mortality of mice was monitored daily, post-*P. yoelii*
 257 17XNL infection.

258 Determination of Parasite Load, 259 Leishmania Lesion Size, and Ulceration

260 Malaria parasitaemia was monitored every 2 days starting at
 261 day 3 post-infection. Blood smears were prepared from tail
 262 vein, methanol-fixed, stained with Giemsa and microscopically
 263
 264
 265



266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
FIGURE 1 | Experimental design. Mice were infected with *Leishmania*
 278 *braziliensis*, (black circles) or *L. amazonensis* (gray circles) 3 days before
 279 *Plasmodium yoelii* infection (white circles). On days 5, 10, 17, and 25 post
 280 *P. yoelii* infection (vertical arrows), six mice from Py, Lb, La, Lb+Py, and La+Py
 281 groups and four mice from control (C) group were euthanized to evaluate
 282 parasite loads in the ears and draining lymph nodes (Lb/La and
 283 Lb+Py/La+Py groups), cytokine serum levels (all groups), thymus relative
 284 weight (all groups), absolute numbers of thymocytes (all groups) and
 285 phenotyping of T cells in the thymus, spleen and lymph nodes (all groups).

286 examined to determine parasitaemia in 1,000 erythrocytes. The
 287 percentage of infected erythrocytes was calculated as follows:
 288 Parasitaemia (%) = (number of infected erythrocytes x 100)/total
 289 number of erythrocytes counted (1000).

290 The diameter of dermal *Leishmania* sp. lesions were measured
 291 weekly with a digital caliper. We also monitored the time elapsed
 292 until ulcer formation in nodules. Parasite numbers in the ears and
 293 draining lymph nodes were determined as previously described
 294 (Belkaid et al., 2000) and scored as the highest dilution containing
 295 viable parasites after incubation for 6 days at 26°C .

296 Cytokines Quantitation in the Serum

297 The serum levels of cytokines (interferon - IFN- γ , tumor necrose
 298 factor - TNF, interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17)
 299 were determined using the BD Cytometric Bead Array Kit Mouse
 300 Th1/Th2/Th17 Cytokines (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
 301 according to the manufacturer's instructions. Briefly, 25 μL of
 302 mouse serum was incubated for 2 h at room temperature with
 303 25 μL of cytokine capture bead and 25 μL of phycoerythrin
 304 (PE) detection reagent. Then, samples were washed with 1 mL
 305 of buffer by centrifugation ($200 \times g$, 5 min). The supernatants
 306 were carefully aspirated and discarded from each assay tube.
 307 Finally, beads were resuspended in 300 μL of buffer for analysis
 308 on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose,
 309 CA, USA). The serum cytokine concentrations (pg/mL) were
 310 determined using a standard curve from recombinant cytokines
 311 provided by the kit.

312 Determination of Thymus Relative 313 Weight

314 For determination of thymus relative weight, body and thymus
 315 of each mouse were weighted. Thymic index (TI) was calculated
 316 according to the following formula: TI = thymus weight (mg) /
 317 body weight (g).

318 T Cell Phenotyping by Flow Cytometry

319 Thymus, spleens, mesenteric nodes, subcutaneous nodes
 320 (cervical, axillary, brachial, and inguinal) and submandibular
 321 nodes (draining ears lesions) were dissected and mechanically
 322 disaggregated. Single-cell suspensions from control, infected and
 323 co-infected mice were obtained in RPMI-1640 supplemented
 324 with 10% fetal calf serum (Gibco-Invitrogen, USA). Cell numbers
 325 and viability were determined by Trypan blue exclusion using
 326 Neubauer chamber.

327 For T lymphocytes phenotypic characterization, 10^6 cells
 328 were stained with FITC labeled anti-mouse CD4, APC labeled
 329 anti-mouse CD8 and PE labeled anti-mouse CD3 monoclonal
 330 antibodies. After incubation for 30 min, followed by 2 washes
 331 with staining buffer (PBS, 0,1% BSA, 0,01% sodium azide, all
 332 from Sigma–Aldrich), cells were fixed with 1% paraformaldehyde
 333 solution (Sigma–Aldrich), washed and resuspended in staining
 334 buffer until acquisition. A minimum of 30,000 events per sample
 335 were acquired inside the lymphocytes gate, based on size and
 336 granularity properties using a FACSCantoIITM flow cytometer
 337 (BD Bioscience, USA) and analyzed using FlowJo 7.5.5 software
 338 (Tree Star Inc. Ashland, OR, USA).

Statistical Analysis

Sample size was determined *a priori* using the software G*Power version 3.1.9.2, based on the Mann–Whitney test, a significance level of 0.05, and a minimum power of 80%. Results were evaluated by a non-parametric test, the Mann–Whitney test, using GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data are expressed as means \pm SEM and considered to be statistically significant when $P < 0.05$. Survival curves were analyzed by Mantel Cox and Gehan–Breslow–Wilcoxon tests and *Leishmania* lesions ulcerations were analyzed by Chi-square test using the same software.

RESULTS

L. braziliensis and *L. amazonensis* co-infection exerts opposite effects on *P. yoelii* 17XNL Infection

Blood stage *P. yoelii* 17XNL parasites induced Malaria infection in all BALB/c mice from single-infected (Py) and *L. braziliensis* or *L. amazonensis* co-infected groups (Lb+Py and La+Py). Parasitaemia peak occurred between 10 and 17 days after infection and no parasite was detected after 23 days post-infection in blood smears of Py single-infected mice. The overall mean parasitaemia observed in Lb+Py co-infected group was lower than that observed in *P. yoelii* single-infected group (Py). Statistically significant differences observed in some days are suggestive for a protective effect of *L. braziliensis* co-infection in Malaria progression (Figure 2A). In contrast, co-infection with *L. amazonensis* appears to have a negative influence in acute Malaria (Figure 2C), and mortality in La+Py co-infected group enhanced in comparison to Py single infected group (Figure 2D). La+Py group exhibited higher parasitaemia on day 5 and a longer course of *P. yoelii* Malaria patency with mice remaining parasitemic 8 days longer than mice in Py single-infected group (Figure 2C). The higher rate of parasitemia in La+Py coinfected mice seems to be associated with decreased survival. Four weeks after *P. yoelii* 17XNL infection, 30% of the co-infected La+Py mice were dead, compared to 100% of survival in the group infected only with *P. yoelii* 17XNL. Py single-infected groups showed no mortality during the whole experiment (Figures 2B,D).

Co-infection is Able to Reduce Severity of *L. braziliensis* Lesions

BALB/c mice were intradermally infected with 10^5 stationary phase promastigotes of *L. braziliensis*. Lb+Py co-infected group showed an overall tendency to present smaller lesion sizes than Lb single infected group (Figure 3A). In both groups, lesions reached maximum size 5 weeks post-infection and started to heal afterward. To evaluate disease severity we followed the onset of open ulcers in *Leishmania*-infected and co-infected groups (Figure 3B). Ulcers started to appear 21 days post-infection in Lb group and after 28 days in Lb+Py. At week

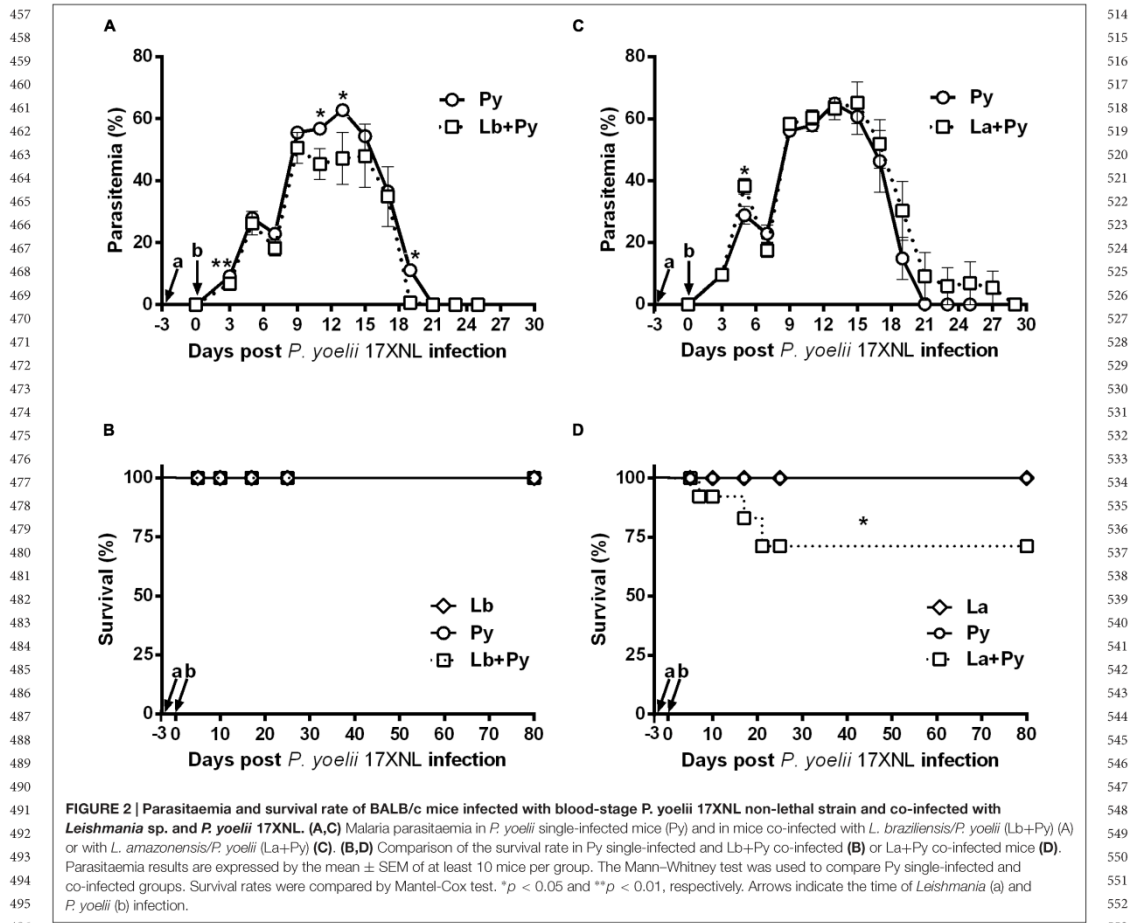
11 after infection (77 days) Lb single-infected group presented a higher number of ulcerated nodules (83.3%) than Lb+Py (40.9%). At week 17 and 18 post infection, there was a complete resolution of lesions in Lb+Py and Lb groups, respectively (data not shown). Limiting-dilution assays performed in the ears and in draining lymph nodes showed an earlier detection of parasites in the ears of Lb single-infected animals than in co-infected group (14 and 21 days post-infection, respectively) with no difference in parasite loads between groups. On the other hand, in the draining lymph nodes parasites were detected 28 days after infection in both groups, and parasite loads were lower in Lb+Py co-infected group ($p = 0.006$, Figures 3C,D).

Co-infection Reduce Severity of *L. amazonensis* Lesions Only during Acute Phase Malaria

Infection of BALB/c mice with 10^4 stationary phase promastigotes of *L. amazonensis* induced chronic lesions that did not heal over time in La and La+Py groups (Figure 4A). During murine Malaria (from day 0 to day 25) lesions in La+Py co-infected group were significantly smaller than in La single infected group. Although lesions of La group presented greater sizes than La+Py until 28 days of infection, after that time and until the end of the experiment both groups present similar lesion sizes. Ulcerated nodules were detected first in La group (21 days post-infection) while in La+Py group visual detection occurred 1 week later (28 days post-infection) (Figure 4B). However, after 63 days of infection all animals from both groups presented ulcerated nodules. Limiting dilution analysis performed at the site of infection and in draining lymph nodes showed higher parasite loads in La+Py group than La single-infected group (Figures 4C,D).

Co-infection Modulate Serum Cytokine Levels Induced by *P. yoelii* 17XNL

Cytokine levels were measured in serum samples obtained from 4 to 6 animals of each experimental group. As expected, increased levels of the proinflammatory cytokine IFN- γ , were observed in all groups infected with *P. yoelii* 17XNL (Py, Lb+Py, and La+Py) in the first week of infection (day 5). The levels of TNF, IL-6 and IL-10 also increased in the serum of the same three groups during blood stage Malaria. Cytokine levels in co-infected groups (Lb+Py and La+Py) were clearly lower than those observed in Malaria single infected group (Py) suggesting a modulatory effect of co-infection (Figure 5). We were not able to detect any of the analyzed cytokines in serum samples from control and Lb or La single infected animals, except for IL-10 in La infected group, only at day 25th post infection. Although we could observe a tendency for an increased production of TNF, IL-6 and IL-10 in the first 10 days of Malaria infection for Lb+Py co-infected group when compared to La+Py co-infected animals, statistic difference was observed only for IL-6 at day 10 post Py infection ($P = 0.045$). We were not able to detect the cytokines IL-2, IL-4, and IL-17 in serum



samples from all experimental groups, at any time of the study.

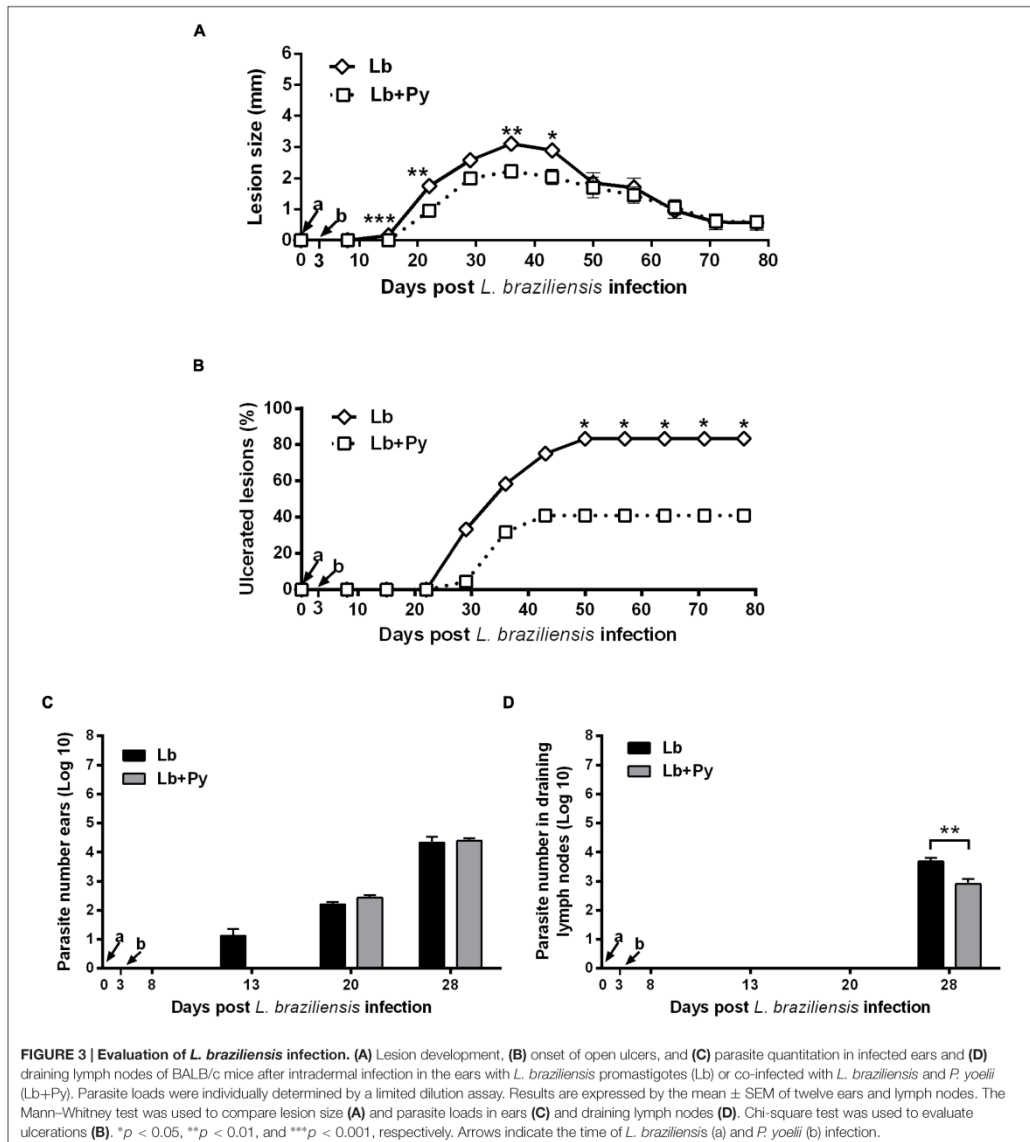
Recovery of Thymic Atrophy Occurs Earlier in Co-infected Animals

In the course of Malaria infection, we observed a significant reduction of the thymus relative weight in comparison to the uninfected control group. Thymic atrophy was first observed 10 days post *P. yoelii* infection (dpi) and persisted until day 25th of infection in Py single-infected group. In co-infected groups (Lb+Py and La+Py) thymus relative weight came back to normal values at 25 day post-infection and no significant difference could be observed in comparison to the control group. During the entire experiment, *Leishmania* single-infected groups showed no differences in thymus relative

weight when compared do the uninfected control group (Figure 6).

Flow cytometry analysis showed that the thymus of Py and co-infected groups underwent a decrease in CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) T cell subset and an increase in CD4⁺ single-positive (SP), CD8⁺SP and CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN) T cell populations (Figure 7). A significant increase in CD4⁺SP thymocytes occurred at 17 dpi and persisted up to 25 dpi in Py single-infected animals. In Lb+Py group, CD4⁺SP thymocytes increased 10 days post infection, and returned to control values by day 25th post infection. In La+Py this transitory increase was observed later at 17 dpi. The dynamics of CD8⁺SP thymocytes in single infected and co-infected groups exhibited the same profile of CD4+SP. When we evaluate this results together, it is possible to notice that in Lb+Py co-infection, the increase in CD4+SP and CD8+SP occurred sooner than in La+Py group (10

571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627



628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684

and 17 dpi, respectively). Double-negative thymocytes increased in Py single-infection at 17 and 25 dpi. The same increase occurred in co-infected groups only at day 17 post infection. In parallel, CD4⁺CD8⁺ DP cells significantly decreased in the thymus of Py single infected animals at 17 dpi and remained lower at 25 dpi. This decrease was observed earlier in Lb+Py

group (10 dpi) but, at day 25th post infection, DP cells increased in this group and were higher than in control and single infected groups. Interestingly, in Lb+Py co-infected group, the increase in DP thymocytes occurred earlier (10 dpi) and was followed by a rapid decrease at day 17th post infection, coming back to control values 25 dpi. Overall, thymus recovery seems to

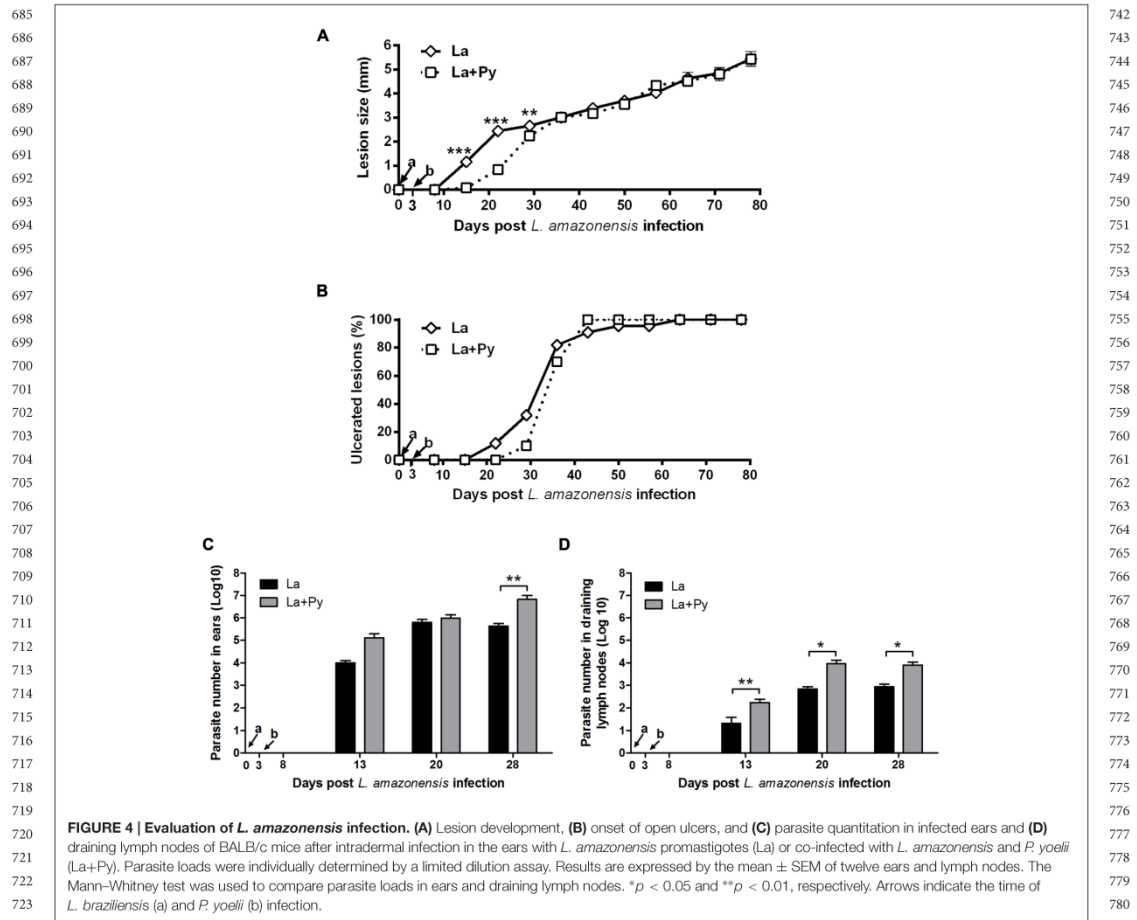


FIGURE 4 | Evaluation of *L. amazonensis* infection. (A) Lesion development, **(B)** onset of open ulcers, and **(C)** parasite quantitation in infected ears and **(D)** draining lymph nodes of BALB/c mice after intradermal infection in the ears with *L. amazonensis* promastigotes (La) or co-infected with *L. amazonensis* and *P. yoelii* (La+Py). Parasite loads were individually determined by a limited dilution assay. Results are expressed by the mean \pm SEM of twelve ears and lymph nodes. The Mann-Whitney test was used to compare parasite loads in ears and draining lymph nodes. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, respectively. Arrows indicate the time of *L. braziliensis* (a) and *P. yoelii* (b) infection.

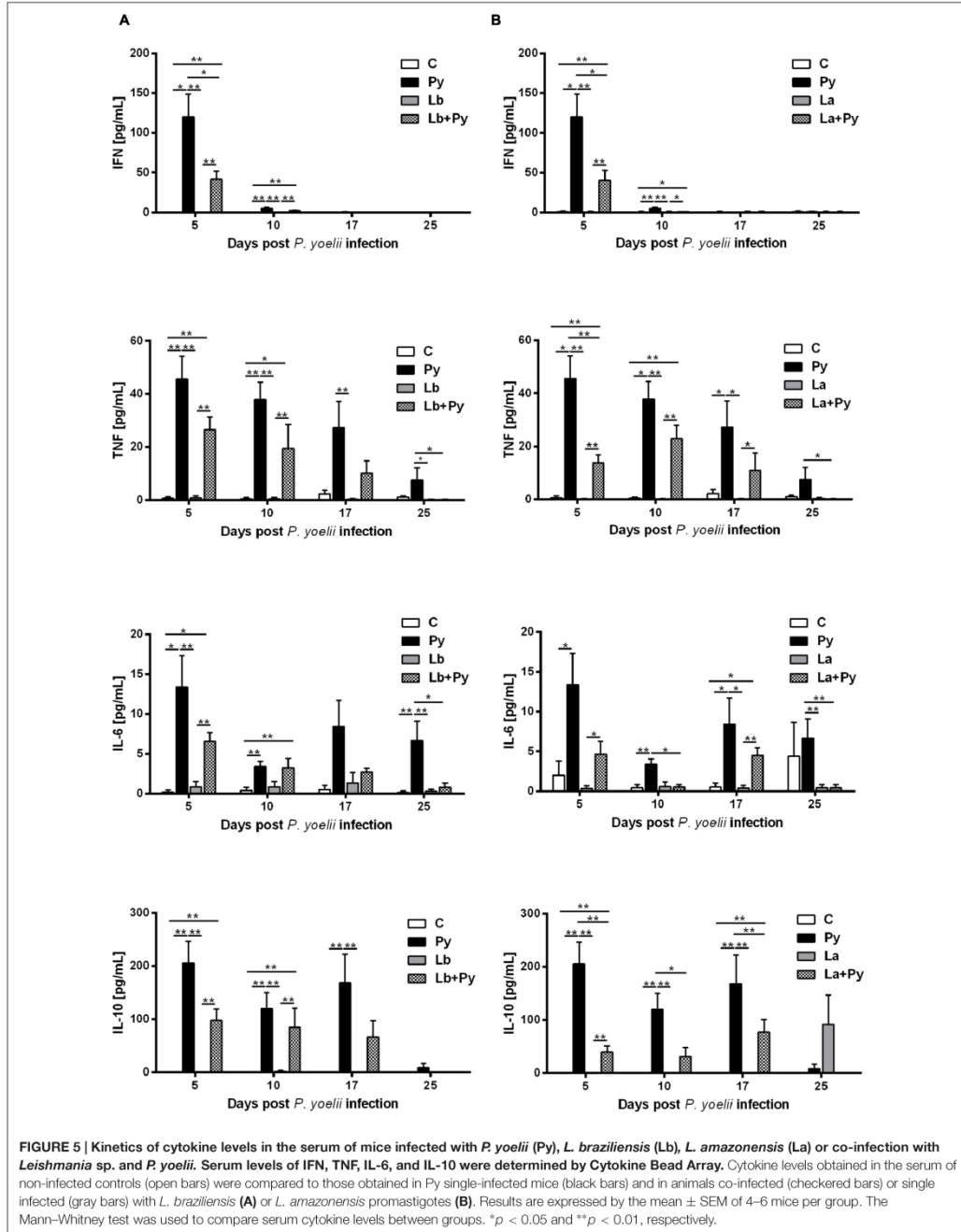
occur faster in Malaria/*Leishmania* co-infection than in Py single infection.

***Leishmania* Co-infection Delay the Enhancement of Double Negative Cells Induced by *P. yoelii* 17XNL Infection in the Spleen**

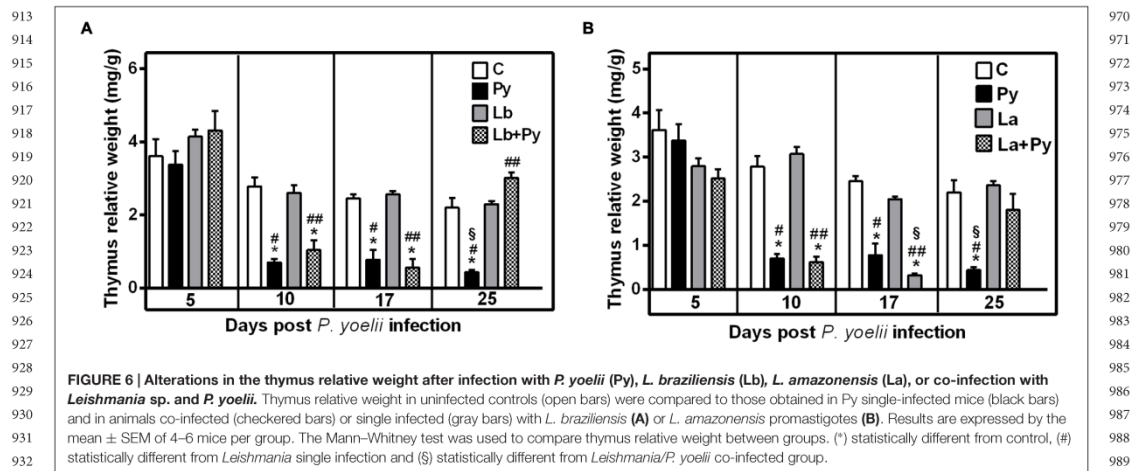
We also evaluated the T cell phenotypes present in the spleens, mesenteric, subcutaneous and submandibular nodes (the last ones as the draining nodes from ears lesions) in single infected and co-infected animals. No alterations were observed in the T cell phenotypes present in subcutaneous and submandibular nodes among the studied groups, while in mesenteric nodes and spleens we were able to observe similar patterns of alterations that were more evident in the spleens (Figure 8). After a

transitory increase at 10 dpi in Py single infected and in co-infected groups, CD4⁺ T cells dropped in Py single infected group at 17 dpi and remained below controls at 25 dpi. In Lb+Py co-infected group a significant decrease was observed only at 25 dpi. Py single infected animals also presented a significant drop in the percentages of CD8⁺T cells. In co-infected groups, the percentages of CD8⁺T cells were below controls at 10, 17, and 25 dpi. Low percentages of DP splenocytes were observed in Py single infected and co-infected groups, which were different from controls only when animals started to recover from malarial infection (17 and 25 dpi). On the other hand, *P. yoelii* infection increased the percentage of DN splenocytes during the entire experiment, and *Leishmania* co-infection was able to delay this enhancement. The percentages of CD4, CD8, DP, and DN splenocytes in *Leishmania* single infected groups (both Lb and La) remained similar to uninfected controls at all time points.

799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855



856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912



DISCUSSION

Malaria and CL are neglected diseases spread over many tropical and subtropical regions of the World showing extensive overlapping geographic distribution. In addition, the increase in travel, migration and war refugees from endemic regions are factors that also contribute to the risk of simultaneous infections by *Plasmodium* spp. and *Leishmania* spp. parasites. Some cases of human Malaria and VL co-infection were described in the past and recently in different parts of the world (Yoeli, 1948; Ab Rahman and Abdullah, 2011; van den Bogaart et al., 2012; van den Bogaart et al., 2014; Bin Mohanna, 2015), demonstrating that co-infection may occur more frequently than we would expect. An increasing amount of evidence shows that co-infections may affect the natural outcome and progression of diseases due to the modulation of immune response (La Flamme et al., 2002; Kolbaum et al., 2012; Qi et al., 2013; van den Bogaart et al., 2014). In the present study, we established a co-infection model of American CL and a non-lethal murine Malaria and demonstrated that co-infection is able to affect the pathogenesis and outcome of both diseases.

Pilot studies were carried out in our Laboratory in which mice were co-infected at different times and orders. It was observed that the outcome of malaria or *Leishmania* infections were the same in any time and order of infections tested. For operational reasons we selected day 3 for Py infection. In addition, our results regarding the outcome of both diseases are similar to those published by Coleman et al. (1998a,b) in *P. yoelii* and *L. amazonensis* coinfection experiments.

Rodent Malaria parasites provide great models to investigate pathogenesis and immune mechanisms during infection (Li et al., 2001; Zuzarte-Luis et al., 2014). The non-lethal strain 17XNL of *P. yoelii* generally causes a transient disease with moderate parasitaemia, weight loss, splenomegaly, hypothermia, and anemia (Coleman et al., 1988b; Kobayashi et al., 1996;

Niikura et al., 2008; Kolbaum et al., 2012; Karadjian et al., 2014). In our study, BALB/c mice infected with blood-stage *P. yoelii* 17XNL develop a self-limiting infection with mild parasitaemia that resolve in 4 weeks. Prior infection with *L. braziliensis* reduced parasitaemia, while animals previously infected with *L. amazonensis* showed a tendency to have higher parasitaemia than Py single infected group. Mortality during acute Malaria increased with *L. amazonensis* co-infection, demonstrating that the existence of intrinsic differences between this two *Leishmania* species during co-infection, may affect animal survival.

The course of experimental CL is dependent on a combination of factors: *Leishmania* and host species, parasite strain, site, and size of the inoculum among other aspects (Pereira and Alves, 2008; Pereira et al., 2009; Ribeiro-Gomes et al., 2014). The murine model of subcutaneous infection with *L. major* generated a great amount of data concerning the immune response in CL. It was in this model that could be demonstrated the importance of a type 1 (proinflammatory) specific immune response for healing the infection in genetically resistant strains of mice (such as C57BL/6), as well as the dominance of a type 2 immune response (with a strong production of IL-4 and IL-10) in susceptible BALB/c mice. On the other hand, all strains of mice that have been tested so far using the subcutaneous route of infection are susceptible to *L. amazonensis*, and non-permissive hosts for *L. braziliensis*.

The intradermal rout of infection with low doses of parasites in the ears, first developed for *L. major* infection (Belkaid et al., 2000), proven also to be an important experimental model for *L. braziliensis* studies. After intradermal infection in the ears with *L. braziliensis* promastigotes BALB/c are able to develop ulcerated lesions that heal spontaneously, similar to the most common clinical manifestation of American Tegumentary Leishmaniasis caused by *L. braziliensis*: the localized cutaneous form (de Moura et al., 2005; Falcão et al., 2012; Carregaro et al., 2013). In the present work, mice infected intradermally with *L. braziliensis*

1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083

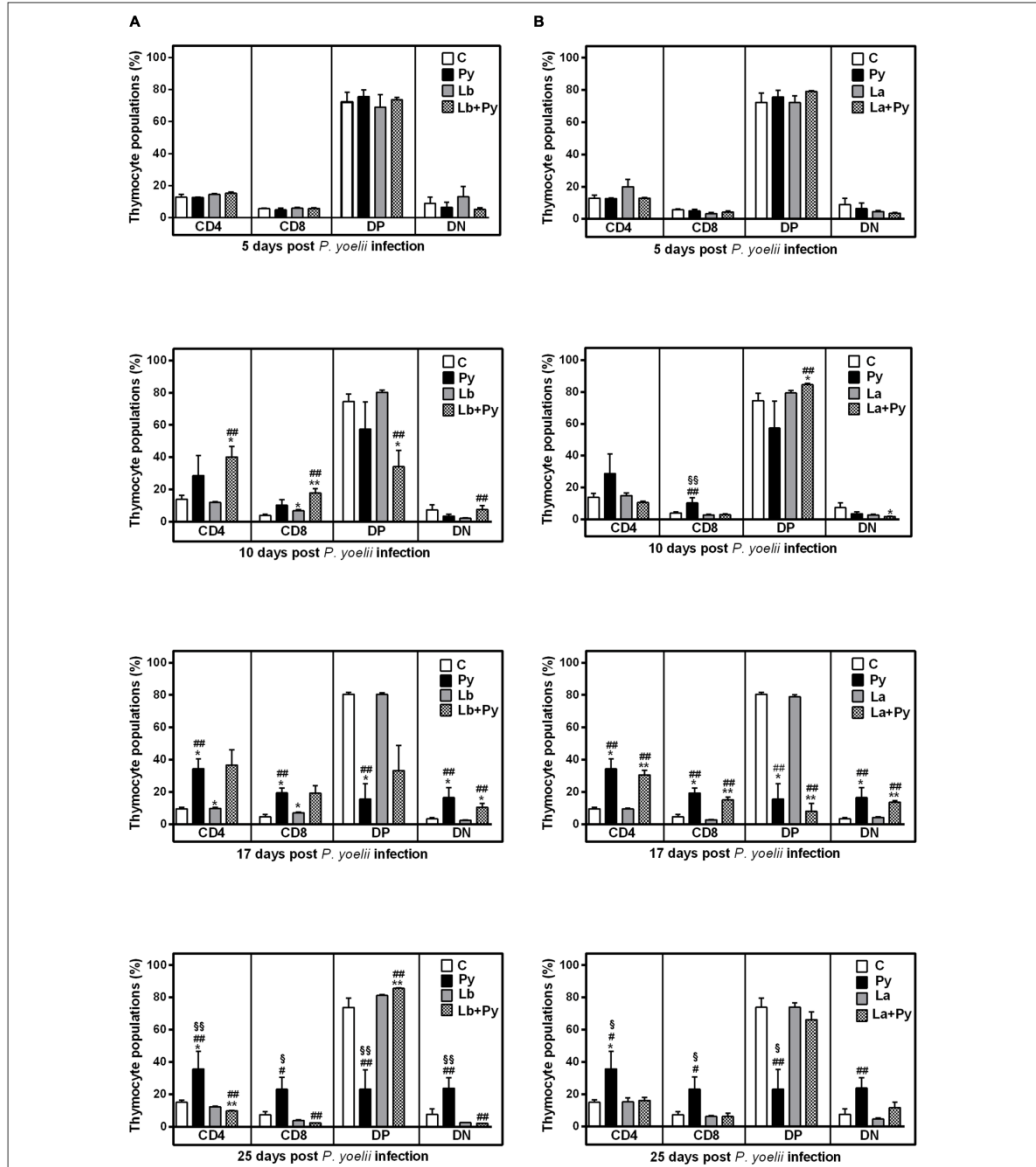


FIGURE 7 | Alterations in thymic T-cell subsets after infection with *P. yoelii* (Py), *L. braziliensis* (Lb), *L. amazonensis* (La), or co-infection with *Leishmania* sp. and *P. yoelii*. The phenotype of T subsets in the thymus were determined by flow cytometry at days 5, 10, 17, and 25 post *P. yoelii* infection. The percentages of CD4+, CD8+, CD4-CD8- double negatives (DN), and CD4+CD8+ double positive cells (DP) obtained in uninfected controls (open bars) were compared to those obtained in Py single-infected mice (black bars) and in animals co-infected (checkered bars) or single infected (gray bars) with *L. braziliensis*. (A) or *L. amazonensis* promastigotes (B). Results are expressed by the mean \pm SEM of 4–6 mice per group. The Mann-Whitney test was used to compare groups. (*) statistically different from control, (#) statistically different from *Leishmania* sp. and (\$) statistically different from *Leishmania* sp./*P. yoelii* co-infected group.

1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140

1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197

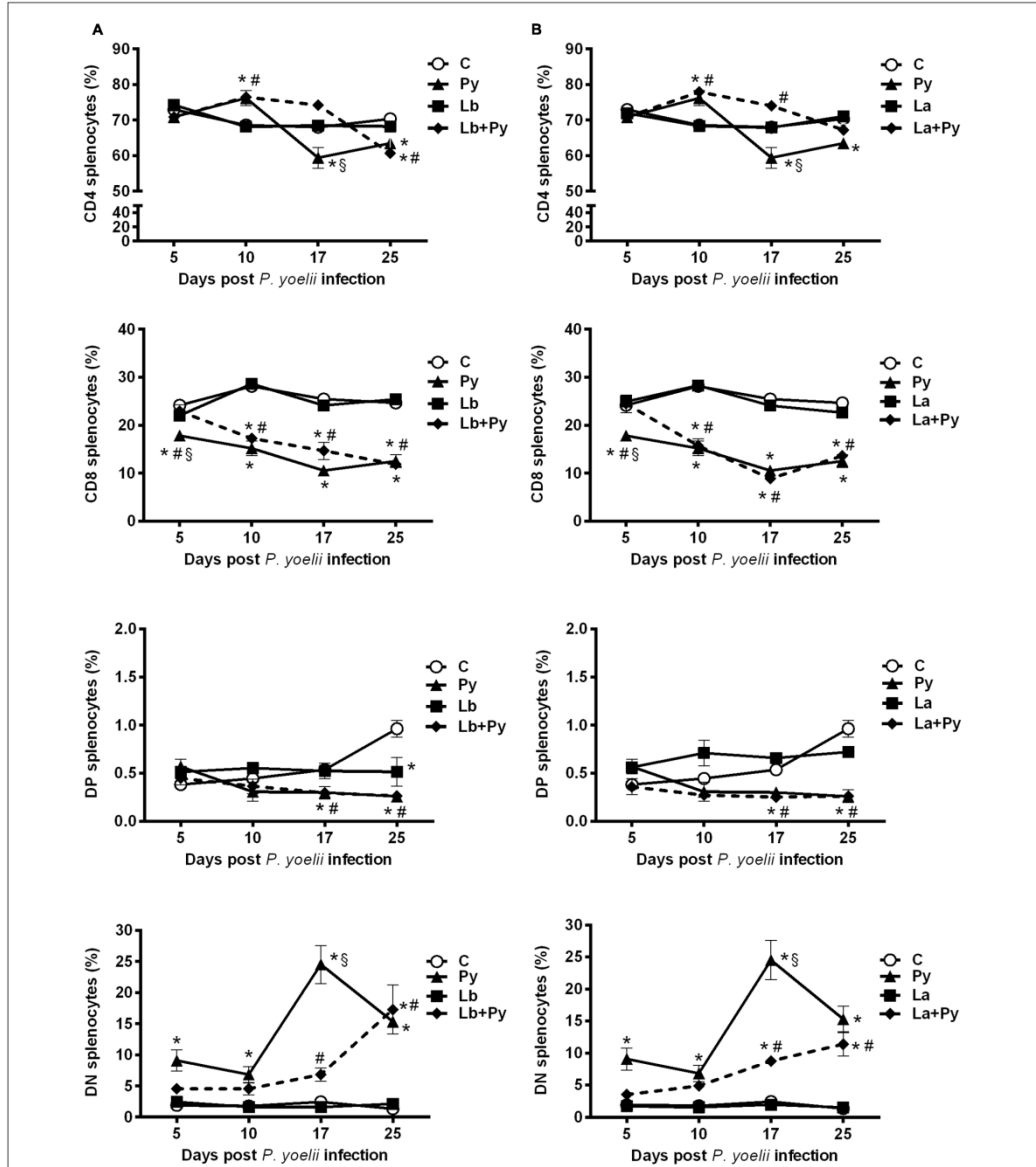


FIGURE 8 | Alterations in spleen T-cell subsets after infection with *P. yoelii* (Py), *L. braziliensis* (Lb), *L. amazonensis* (La), or co-infection with *Leishmania* sp. and *P. yoelii*. The phenotype of T subsets in the spleen were determined by flow cytometry at days 5, 10, 17, and 25 post *P. yoelii* infection. The percentages of CD4+, CD8+, CD4-CD8- double negatives (DN), and CD4+CD8+ double positive cells (DP) obtained in uninfected controls (open circles) were compared to those obtained in Py single-infected mice (black triangles) and in animals co-infected (black diamonds with dashed line) or single infected (black squares) with *L. braziliensis*. (A) or *L. amazonensis* promastigotes (B). Results are expressed by the mean \pm SEM of 4-6 mice per group. The Mann-Whitney test was used to compare groups. (*) statistically different from control, (#) statistically different from *Leishmania* sp. and (§) statistically different from *Leishmania* sp./*P. yoelii* co-infected group.

1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254

1255 developed a localized lesion that increased in size, became
 1256 ulcerated and self-resolved by week 16 post infection, as expected
 1257 (data not shown). Co-infected mice exhibited similar pattern
 1258 in lesions development, but those were smaller and presented
 1259 less ulcerations. *L. amazonensis* infection, on the other hand
 1260 induced progressive non-healing lesions, and at the end of the
 1261 study (11 weeks after *L. amazonensis* infection) 100% of the
 1262 animals presented ulcerated lesions. Interestingly, during acute
 1263 Py infection (in the 1st 4 weeks post *L. amazonensis* infection), co-
 1264 infected group presented a transitory delay on the development
 1265 of lesions as well as smaller lesions when compared to La
 1266 single-infected mice. As mentioned before, the differences in
 1267 susceptibility to *Leishmania* species in murine models, as well as
 1268 in humans, have multifactorial causes, one of them being the type
 1269 of immune response generated after infection. For this reason,
 1270 the differences observed in the disease outcome of *L. braziliensis*
 1271 and *L. amazonensis* infection during Malaria co-infection must be
 1272 evaluated in the context of the intense systemic immune response
 1273 elicited by *P. yoelii* 17XNL in the 1st weeks of *Leishmania*
 1274 infection.

1275 It is well described that Malaria erythrocytic stage triggers a
 1276 strong IFN- γ response in both rodent and human Malaria (Shear
 1277 et al., 1989; Chen et al., 2010; Perez-Mazliah and Langhorne,
 1278 2014). The first wave of proinflammatory cytokines is sustained
 1279 by the innate immune system, when parasitaemia is still low,
 1280 and is characterized by the release of IFN- γ , TNF- α , IL-2, and
 1281 IL-12. The inflammatory environment sustains CD4⁺ T cell
 1282 polarization to a Th1 phenotype that provides more IFN- γ for
 1283 macrophages activation and control of parasitaemia (Artavanis-
 1284 Tsakonas and Riley, 2002; Artavanis-Tsakonas et al., 2003). In
 1285 our experiments, we were able to detect an early and pronounced
 1286 increase of IFN- γ levels in the serum of *P. yoelii* 17XNL single
 1287 infected and co-infected groups, mainly in the beginning of the
 1288 infection, as extensively described in literature (Shear et al.,
 1289 1989; Kobayashi et al., 1996; Shan et al., 2012; Karadjian et al.,
 1290 2014). While the enhanced levels of IFN- γ in the serum was
 1291 only transitory (5 and 10 days after *P. yoelii* 17XNL) the
 1292 levels of TNF and IL-6 also increased in animals infected with
 1293 *P. yoelii* 17XNL, but remained elevated for a longer period of
 1294 time (during patent parasitaemia) in the serum. Co-infected
 1295 groups presented smaller lesions than *Leishmania* single infected
 1296 groups and this effect occurred simultaneously with the increased
 1297 cytokines levels in the serum, during Malaria erythrocytic phase.
 1298 The strong proinflammatory environment caused by *P. yoelii*
 1299 17XNL infection could explain the delay on lesions development
 1300 in co-infected groups, given the fact that IFN- γ and TNF play
 1301 an essential role in controlling *Leishmania* replication inside
 1302 macrophages (Ashok and Acha-Orbea, 2014). Obviously a clearly
 1303 scenario can be achieved if we evaluate the *Leishmania*-specific
 1304 immune response developed in *Leishmania* single infected and
 1305 *Leishmania* / *P. yoelii* 17XNL co-infected groups. This matter is
 1306 currently under investigation.

1307 In CL as well as in Malaria, excessive inflammatory response
 1308 can lead to pathology or even death. Therefore, the balance
 1309 between pro and anti-inflammatory cytokines is important to
 1310 control pathology and parasitaemia (Artavanis-Tsakonas et al.,
 1311 2003; Antonelli et al., 2005; Oliveira et al., 2014). Overall we could

1312 observe a tendency for reduced levels of IFN- γ , TNF, IL-6, and IL-
 1313 10 in the serum of co-infected groups, when compared to *P. yoelii*
 1314 17XNL single infected group, suggesting a modulation of *P. yoelii*
 1315 17XNL induced immune response by *Leishmania* co-infection.
 1316 On the other hand, *L. braziliensis* and *L. amazonensis* co-infection
 1317 exerts opposite effects on *P. yoelii* 17XNL infection (Figures 2
 1318 and 3). IL-10 is a key regulatory cytokine to protect mice against
 1319 pathology during acute Malaria (Kobayashi et al., 1996; Freitas
 1320 do Rosario and Langhorne, 2012). Interestingly the reduction
 1321 in the serum levels of IL-10 reached statistically significance
 1322 only in *L. amazonensis* co-infected group at days 5 and 10 post
 1323 *P. yoelii* 17XNL infection. This significant reduction in serum IL-
 1324 10 levels could be linked to the persistent parasitaemia and deaths
 1325 observed in *L. amazonensis* co-infected group (Figure 2).

1326 Similar to several other parasitic diseases, experimental
 1327 Malaria infections can cause severe thymic alterations (Savino,
 1328 2006; De Meis et al., 2012). During infection the organ undergoes
 1329 a strong atrophy with disruption of its architecture that may
 1330 influence T cell maturation. It has been already demonstrated
 1331 that mice infected with *P. chabaudi* or *P. berghei*, two other
 1332 rodent Malaria species, exhibit an important thymic atrophy with
 1333 cellular depletion and histological disorganization (Seixas and
 1334 Ostler, 2005; Andrade et al., 2008; Francelin et al., 2011; Lima
 1335 et al., 2012). Thymic atrophy caused by infectious diseases may
 1336 occur in combination with one or more of the following events:
 1337 impairment of thymocyte proliferation, increase in thymocyte
 1338 death and increase in thymocyte migration to peripheral
 1339 lymphoid tissue (De Meis et al., 2012). Increase in apoptosis and
 1340 thymocyte migration has been described in a variety of diseases
 1341 (Savino, 2006), including Malaria (Francelin et al., 2011).

1342 Accordingly, in *P. yoelii* 17XNL infection we observed a
 1343 profound thymic atrophy with a reduction in the percentage
 1344 of double positive cells (CD4⁺CD8⁺) and an increase in the
 1345 percentage of single positive (CD4⁺ and CD8⁺) and double
 1346 negative cells (CD4⁻CD8⁻). We also observed a high degree
 1347 of apoptosis and necrosis in the thymocytes of *P. yoelii* single
 1348 infected and co-infected groups, with no difference between
 1349 groups (data not shown). Besides the intense atrophy during
 1350 acute Malaria, thymus was capable to recover its normal size
 1351 and cellularity after *P. yoelii* elimination, in accordance with
 1352 observations with *P. chabaudi* non-lethal infection (Seixas and
 1353 Ostler, 2005). Infections with both *Leishmania* species were not
 1354 able to cause thymus involution in mice, probably due to the
 1355 localized nature of the cutaneous lesions they cause, with no or
 1356 little impact in the systemic immune environment. Remarkably,
 1357 thymus recovery occurred faster in co-infected animals, what we
 1358 believe is a reflection of the minor inflammatory environment
 1359 observed in co-infected animals.

1360 The reduction in double positive thymocytes has also been
 1361 described as common feature in infectious diseases, and can
 1362 be explained by a premature escape of immature cells to
 1363 blood and peripheral lymphoid organs (De Meis et al., 2012).
 1364 *P. yoelii* 17XNL single infected and in co-infected groups
 1365 showed decreased percentages of double positive CD4⁺CD8⁺
 1366 splenocytes when compared to *Leishmania* single infected
 1367 animals and uninfected controls, suggesting that the reduced
 1368 percentages of double positive cells in the thymus of those groups

1369 were not due to increased migration to the peripheral lymphoid
1370 organs.

1371 Among the mechanisms described to clear blood-stage
1372 Malaria parasites are mature isotypes antibodies and antibody-
1373 independent T cell mechanisms (Marsh and Kinyanjui, 2006;
1374 Beeson et al., 2008), but all of them require the activation of CD4
1375 T cells. In our model, CD4 T cells presented a transitory increase
1376 at 10dpi but presented a significant drop on their percentages
1377 after 17 dpi when compared to controls. In *L. amazonensis* co-
1378 infected group they equalized controls only at 25 dpi, while in
1379 *L. braziliensis* co-infection they were lower than controls and
1380 *Leishmania* single infected group. The nature of these cells (e.g.,
1381 if they are regulatory T cells or effector T cells), as well as
1382 the cytokines they produce after stimulation with *Leishmania*
1383 antigens or *P. yoelii* infected erythrocytes are under investigation.

1384 Interestingly the percentages of double negatives CD4
1385 and CD8 splenocytes increased in *P. yoelii* 17XNL infected
1386 groups, and *Leishmania* co-infection were able to delay this
1387 enhancement. We are also performing multiparametric flow
1388 cytometry experiments to better understand the phenotype of this
1389 CD3+CD4-CD8-cells, since they can be NKT cells or $\gamma\delta$ T cells.
1390 Both cell types are components of the innate immune system and
1391 have been proposed to play significant roles in the clearance of
1392 blood-stage malarial parasites (Stevenson and Riley, 2004; Urban
1393 et al., 2005).

1394 NKT cells are innate-like lymphocytes that account for
1395 approximately 5% of T lymphocytes in the spleen. They possess
1396 both T cell and NK cell surface markers since they can express
1397 CD4 or CD8 co receptors on their surface, or neither one of
1398 them (double-negative phenotype) as well as the NK1.1 surface
1399 molecule (Balato et al., 2009). Primary *P. yoelii* infection with
1400 non-lethal strain 265BY is able to induce an organ-specific
1401 and heterogeneous NKT cells response (Souillard et al., 2007).
1402 Hepatic NKT cells consisted mainly of CD1d-dependent CD4+
1403 and double negative NKT cells, whereas splenic NKT cells
1404 presented a CD1d-independent TCRhigh CD4high phenotype
1405 during infection (Souillard et al., 2007). It was also demonstrated
1406 that CD49b+ CD3+ natural killer T (NKT) cells increased in
1407 the liver after a primary infection with *P. yoelii* non-lethal strain
1408 (17XNL), and that CD1d-restricted NKT cells, which secrete
1409 IFN γ , are critical to reduce liver-stage burden in a secondary
1410 infection (Miller et al., 2014). Lack of type 1 IFN- α receptor
1411 signaling compromise the enhancement of NKT cells in the liver,
1412 showing a link between type I IFN signaling, cell recruitment, and
1413 subsequent parasite elimination.

1414 Gamma delta T cells are the first to be generated in
1415 the ontogeny. They are able to respond quickly through the
1416 production of cytokines and can be divided into two types:
1417 interferon-producing cells (CD27hi) and IL-17-producing cells
1418 (CD27lo) (Zarin et al., 2015). In Malaria they are activated during
1419 pre-erythrocytic (liver) and erythrocyte stages and can produce
1420 INF- γ *in vitro* after stimulation with *P. falciparum* infected
1421 erythrocytes (Elloso et al., 1994; Farouk et al., 2004; Scholzen
1422 and Sauerwein, 2016). In BALB/c mice, the number of $\gamma\delta$ T cells
1423 increases considerably in the spleen during infection with *P. yoelii*
1424 non-lethal strain (17XNL) (Kopacz and Kumar, 1999), while this
1425 increase did not occur to the same extent in mice infected with

1426 the lethal strain of *P. yoelii* (17XL) suggesting that $\gamma\delta$ T cells play a
1427 protective role in Malaria (Kopacz and Kumar, 1999). In another
1428 work with *P. yoelii* non-lethal strain was observed an increase
1429 in the percentage of $\gamma\delta$ T cells in the spleen, liver and peripheral
1430 blood, peaking at day 21 of infection (Li et al., 2012). When the
1431 mice were depleted from $\gamma\delta$ T cells with monoclonal antibodies
1432 parasite elimination was delayed (Li et al., 2012).

1433 Our results demonstrating an increase in CD3+CD4-CD8-
1434 cells during erythrocyte stage in *P. yoelii* 17XNL non-lethal strain
1435 infected animals both in the thymus (Figure 7) and in the spleen
1436 (Figure 8) does not discard the possibility that those can be either
1437 NK T or $\gamma\delta$ T cells, and the delay of this enhancement to occur in
1438 *Leishmania* co-infected groups when compared to *P. yoelii* single
1439 infected animals could have a correlation with the differences in
1440 cytokines production observed between *P. yoelii* 17XNL single
1441 infected and co-infected groups.

1442 Taken together, our results suggest that coexisting infection
1443 with *P. yoelii* 17XNL and *L. braziliensis* or *L. amazonensis*
1444 may change diseases outcomes, and that Malaria outcome can
1445 be altered according to the *Leishmania* co-infection specie
1446 evaluated. On the other hand Malaria infection produced
1447 a transient delay on leishmanial lesions development. These
1448 alterations on Malaria and CL progress seem to be closely related
1449 to changes in the immune response as verified by alteration in
1450 serum cytokine levels and thymus dynamics during infection.

1451 In areas where Malaria and CL are co-endemic, human
1452 populations are continuously exposed to Malaria and
1453 Leishmaniasis vectors bites and consequently are at risk of
1454 suffering repeated infections. These recurrent infections in
1455 endemic areas might cause permanent immunomodulatory
1456 effects, which can probably interfere in the outcome of both
1457 diseases. Moreover, the increase in Malaria parasitaemia, patency
1458 and mortality, observed in *L. amazonensis/P. yoelii* coinfection,
1459 might contribute to the severity of disease as well as to the
1460 maintenance of the malaria transmission in co-endemic areas.
1461 Considering the importance and the geographical distribution
1462 of Malaria and CL in tropical regions of the world, further
1463 investigation on immunomodulatory mechanisms during co-
1464 infection are necessary to understand how co-infection can affect
1465 not only the natural history and progression of diseases but also
1466 the treatment and prevention of both.

1467 AUTHOR CONTRIBUTIONS

1471 Conceived and designed the experiments: DB, PL, JF, and RP.
1472 Performed the experiments: RP, PL, DS, DV, DS, and DB.
1473 Analyzed the data: RP, PL, DV, DS, and DB. Contributed
1474 reagents/materials/analysis tools: DB, JL, and DV. Wrote the
1475 paper: RP, PL, and DB.

1476 FUNDING

1477 This work was supported by the IOC/FIOCRUZ. The publication
1478 of this article was funded by the IOC/FIOCRUZ and PAEF-
1481 FIOTEC (IOC-008-FIO-15-47 and IOC-008-FIO-15-66). RP, DS,
1482

1483 and DS are recipient of CAPES Doctoral Fellowships. DV and JF
1484 are recipient of CNPq Productivity Fellowships.

1487 ACKNOWLEDGMENTS

1488 We'd like to express our gratefulness to Professor Dr. Fabio T.
1489 M. Costa from Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes

1492 REFERENCES

1493 Ab Rahman, A. K., and Abdullah, F. H. (2011). Visceral Leishmaniasis (kala-
1495 azar) and Malaria co-infection in an immigrant in the state of Terengganu,
1496 Malaysia: a case report. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 44, 72–76. doi:
1497 10.1016/j.jmii.2011.01.014

1498 Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012).
1499 Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*
1500 7:e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671

1501 Andrade, C. F., Gameiro, J., Nagib, P. R., Carvalho, B. O., Talaisys, R. L., Costa,
1502 F. T., et al. (2008). Thymic alterations in *Plasmodium berghei*-infected mice.
1503 *Cell Immunol.* 253, 1–4. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.06.001

1504 Antonelli, L. R. V., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., Carvalho, E. M.,
1505 and Gollob, K. J. (2005). Activated inflammatory T cells correlate with lesion
1506 size in human Cutaneous Leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 101, 226–230. doi:
1507 10.1016/j.imlet.2005.06.004

1508 Artavanis-Tsakonas, K., and Riley, E. M. (2002). Innate immune response to
1509 Malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live
1510 *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 169, 2956–2963. doi:
1511 10.4049/jimmunol.169.6.2956

1512 Artavanis-Tsakonas, K., Tongren, J. E., and Riley, E. M. (2003). The war between
1513 the Malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation
1514 and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 145–152. doi: 10.1046/j.1365-
1515 2249.2003.02174.x

1516 Ashok, D., and Acha-Orbea, H. (2014). Timing is everything: dendritic cell
1517 subsets in murine *Leishmania* infection. *Trends Parasitol.* 30, 499–507. doi:
1518 10.1016/j.pt.2014.08.001

1519 Balato, A., Unutmaz, D., and Gaspari, A. A. (2009). Natural killer T cells: an
1520 unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions.
1521 *J. Invest. Dermatol.* 129, 1628–1642. doi: 10.1038/jid.2009.30

1522 Battle, K. E., Karhunen, M. S., Bhatt, S., Gething, P. W., Howes, R. E., Golding, N.,
1523 et al. (2014). Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar. J.*
1524 13:144. doi: 10.1186/1475-2875-13-144

1525 Beeson, J. G., Osier, F. H., and Engwerda, C. R. (2008). Recent insights into humoral
1526 and cellular immune responses against Malaria. *Trends Parasitol.* 24, 578–584.
1527 doi: 10.1016/j.pt.2008.08.008

1528 Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., and Sacks, D. (2000).
1529 A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent”
1530 phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation
1531 and immunity. *J. Immunol.* 165, 969–977. doi: 10.4049/jimmunol.165.2.969

1532 Bin Mohanna, M. A. (2015). Leishmaniasis, Malaria, and schistosomiasis
1533 concurrently in an 8-year-old boy. *Saudi Med. J.* 36, 494–496. doi:
1534 10.15537/smj.2015.4.10757

1535 Carregaro, V., Costa, D. L., Brodskyn, C., Barral, A. M., Barral-Netto, M., Cunha,
1536 F. Q., et al. (2013). Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania*
1537 *braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment
1538 into BALB/c mice ear. *BMC Microbiol.* 13:102. doi: 10.1186/1471-2180-13-102

1539 Chen, G., Feng, H., Liu, J., Qi, Z. M., Wu, Y., Guo, S. Y., et al. (2010).
1540 Characterization of immune responses to single or mixed infections with
1541 *P. yoelii* 17XL and *P. chabaudi* AS in different strains of mice. *Parasitol. Int.*
1542 59, 400–406. doi: 10.1016/j.parint.2010.05.005

1543 Coleman, R. E., Edman, J. D., and Semprevivo, L. H. (1988a). Interactions between
1544 *Plasmodium yoelii* and *Leishmania mexicana* amazonensis in *Leishmania*
1545 resistant C57B1/6 mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 540–544.

1546 Coleman, R. E., Edman, J. D., and Semprevivo, L. H. (1988b). *Leishmania*
1547 *mexicana*: effect of concomitant Malaria on Cutaneous Leishmaniasis.

1548 from Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, SP/Brazil
1549 for providing us the *P. yoelii* 17XNL non-lethal strain utilized
1550 in this work. The authors also thank the Center for Laboratory
1551 Animal Breeding of the Oswaldo Cruz Foundation (CECAL)
1552 and the Center of Animal Experimentation of Leônidas
1553 Deane building for providing and keeping animals used in
1554 this study. We also thank the Flow Cytometry Core from
1555 IOC/FIOCRUZ.

1556 Development of lesions in a *Leishmania*-susceptible (BALB/c) strain of mouse.
1557 *Exp. Parasitol.* 65, 269–276. doi: 10.1016/0014-4894(88)90131-2

1558 De Meis, J., Aurelio Farias-De-Oliveira, D., Nunes Panzenhagen, P. H., Maran, N.,
1559 Villa-Verde, D. M., Morrot, A., et al. (2012). Thymus atrophy and double-
1560 positive escape are common features in infectious diseases. *J. Parasitol. Res.*
1561 2012:574020. doi: 10.1155/2012/574020

1562 de Moura, T. R., Novais, F. O., Oliveira, F., Clarencio, J., Noronha, A., Barral, A.,
1563 et al. (2005). Toward a novel experimental model of infection to study American
1564 Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect. Immun.* 73,
1565 5827–5834. doi: 10.1128/IAI.73.9.5827-5834.2005

1566 Dutra, W. O., De Faria, D. R., Lima Machado, P. R., Guimaraes, L. H., Schriefer, A.,
1567 Carvalho, E., et al. (2011). Immunoregulatory and effector activities in
1568 human cutaneous and mucosal leishmaniasis: understanding mechanisms of
1569 pathology. *Drug Dev. Res.* 72, 430–436. doi: 10.1002/ddr.20449

1570 Elloso, M. M., Van Der Heyde, H. C., Vande Waa, J. A., Manning, D. D., and
1571 Weidanz, W. P. (1994). Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human
1572 gamma delta T cells. *J. Immunol.* 153, 1187–1194.

1573 Falcão, S. C., De Moura, T. R., Clarencio, J., Brodskyn, C., Barral, A., and De
1574 Oliveira, C. I. (2012). The presence of Tregs does not preclude immunity
1575 to reinfection with *Leishmania braziliensis*. *Int. J. Parasitol.* 42, 771–780. doi:
1576 10.1016/j.ijpara.2012.05.006

1577 Farouk, S. E., Mincheva-Nilsson, L., Krensky, A. M., Dieli, F., and Troye-
1578 Blomberg, M. (2004). Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual
1579 blood stages of *Plasmodium falciparum* by a granule exocytosis-dependent
1580 cytotoxic pathway that requires granulysin. *Eur. J. Immunol.* 34, 2248–2256.
1581 doi: 10.1002/eji.200424861

1582 Francelin, C., Paulino, L. C., Gameiro, J., and Verinaud, L. (2011). Effects of
1583 *Plasmodium berghei* on thymus: high levels of apoptosis and premature
1584 egress of CD4(+)CD8(+) thymocytes in experimentally infected mice.
1585 *Immunobiology* 216, 1148–1154. doi: 10.1016/j.imbio.2011.03.009

1586 Freitas do Rosario, A. P., and Langhorne, J. (2012). T cell-derived IL-10 and its
1587 impact on the regulation of host responses during Malaria. *Int. J. Parasitol.* 42,
1588 549–555. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.03.010

1589 Gollob, K. J., Viana, A. G., and Dutra, W. O. (2014). Immunoregulation in
1590 human American Leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite*
1591 *Immunol.* 36, 367–376. doi: 10.1111/pim.12100

1592 Good, M. F., and Doolan, D. L. (2010). Malaria vaccine design: immunological
1593 considerations. *Immunity* 33, 555–566. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.005

1594 Hartley, M. A., Drexler, S., Ronet, C., Beverley, S. M., and Fasel, N. (2014). The
1595 immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic
1596 Leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 30, 412–422. doi: 10.1016/j.pt.2014.05.006

1597 Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich Sachs, S., and
1598 Sachs, J. D. (2006). Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical
1599 diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and Malaria. *PLoS Med.*
1600 3:e102. doi: 10.1371/journal.pmed.0030102

1601 Karadjian, G., Berrebi, D., Dogna, N., Vallarino-Lhermitte, N., Bain, O., Landau, I.,
1602 et al. (2014). Co-infection restrains *Litomosoides sigmodontis* filarial load and
1603 plasmodial *P. yoelii* but not *P. chabaudi* parasitaemia in mice. *Parasite* 21:16.
1604 doi: 10.1051/parasite/2014017

1605 Kedzierski, L., and Evans, K. J. (2014). Immune responses during
1606 cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Parasitology* 141, 1544–1562. doi:
1607 10.1017/S003118201400095x

1608 Kobayashi, F., Morii, T., Matsui, T., Fujino, T., Watanabe, Y., Weidanz, W. P.,
1609 et al. (1996). Production of interleukin 10 during Malaria caused by lethal and
1610 nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parasitol. Res.* 82, 385–391. doi:
1611 10.1007/s004360050133

- 1597 Kolbaum, J., Eschbach, M. L., Steeg, C., Jacobs, T., Fleischer, B., and Breloer, M. (2012). Efficient control of *Plasmodium yoelii* infection in BALB/c and C57BL/6 mice with pre-existing *Strongyloides ratti* infection. *Parasite Immunol.* 34, 388–393. doi: 10.1111/j.1365-3024.2012.01369.x
- 1598
- 1599 Kopacz, J., and Kumar, N. (1999). gamma delta T-cells may interfere with a productive immune response in *Plasmodium yoelii* infections. *Int. J. Parasitol.* 29, 737–742. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00026-0
- 1600
- 1601 La Flamme, A. C., Scott, P., and Pearce, E. J. (2002). Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite Immunol.* 24, 339–345. doi: 10.1046/j.1365-3024.2002.00473.x
- 1602
- 1603 Li, C., Mannoor, K., Inafuku, M., Taniguchi, T., Inamine, Y., Miyazaki, T., et al. (2012). Protective function of an unconventional gammadelta T cell subset against Malaria infection in apoptosis inhibitor deficient mice. *Cell Immunol.* 279, 151–159. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.09.012
- 1604
- 1605 Li, C., Seixas, E., and Langhorne, J. (2001). Rodent Malaria: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med. Microbiol. Immunol.* 189, 115–126. doi: 10.1007/s430-001-8017-8
- 1606
- 1607 Lima, A. C., Francelin, C., Ferrucci, D. L., Stach-Machado, D. R., and Verinaud, L. (2012). Thymic alterations induced by *Plasmodium berghei*: expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Cell Immunol.* 279, 53–59. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.09.006
- 1608
- 1609 Louis, J. A., Conceicao-Silva, F., Himmelrich, H., Tacchini-Cottier, F., and Launois, P. (1998). Anti-leishmania effector functions of CD4+ Th1 cells and early events instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 452, 53–60. doi: 10.1007/978-1-4615-5355-7_7
- 1610
- 1611 Marsh, K., and Kinyanjui, S. (2006). Immune effector mechanisms in Malaria. *Parasite Immunol.* 28, 51–60. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x
- 1612
- 1613 Medina, T. S., Costa, S. P., Oliveira, M. D., Ventura, A. M., Souza, J. M., Gomes, T. F., et al. (2011). Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in *Plasmodium vivax* Malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar. J.* 10, 264. doi: 10.1186/1475-2875-10-264
- 1614
- 1615 Miller, J. L., Sack, B. K., Baldwin, M., Vaughan, A. M., and Kappe, S. H. (2014). Interferon-mediated innate immune responses against Malaria parasite liver stages. *Cell Rep.* 7, 436–447. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.018
- 1616
- 1617 Niikura, M., Kamiya, S., Kita, K., and Kobayashi, F. (2008). Co-infection with nonlethal murine Malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. *J. Immunol.* 180, 6877–6884. doi: 10.4049/jimmunol.180.10.6877
- 1618
- 1619 Oliveira, W. N., Ribeiro, L. E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E. M., and Bacellar, O. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary Leishmaniasis. *Cytokine* 66, 127–132. doi: 10.1016/j.cyto.2013.12.016
- 1620
- 1621 Pereira, B. A., and Alves, C. R. (2008). Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet. Parasitol.* 158, 239–255. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.015
- 1622
- 1623 Pereira, C. G., Silva, A. L., De Castilhos, P., Mastrantonio, E. C., Souza, R. A., Romao, R. P., et al. (2009). Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet. Parasitol.* 165, 231–240. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.07.019
- 1624
- 1625 Perez-Mazliah, D., and Langhorne, J. (2014). CD4 T-cell subsets in Malaria: TH1/TH2 revisited. *Front. Immunol.* 5:671. doi: 10.3389/fimmu.2014.00671
- 1626
- 1627 Qi, Z., Han, X., Zhang, Y., Wang, J., and Cao, Y. M. (2013). *Listeria monocytogenes* inoculation protects mice against blood-stage *Plasmodium yoelii* infection. *Tohoku J. Exp. Med.* 229, 87–96. doi: 10.1620/tjem.229.87
- 1628
- 1629 Ribeiro-Gomes, F. L., Roma, E. H., Carneiro, M. B., Doria, N. A., Sacks, D. L., and Peters, N. C. (2014). Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 82, 2713–2727. doi: 10.1128/IAI.01600-13
- 1630
- 1631 Savino, W. (2006). The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2:e62. doi: 10.1371/journal.ppat.0020062
- 1632
- 1633 Scholzen, A., and Sauerwein, R. W. (2016). Immune activation and induction of memory: lessons learned from controlled human Malaria infection with *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 143, 224–235. doi: 10.1017/S0031182015000761
- 1634
- 1635 Seixas, E., and Ostler, D. (2005). *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): differential cellular responses to infection in resistant and susceptible mice. *Exp. Parasitol.* 110, 394–405. doi: 10.1016/j.exppara.2005.03.024
- 1636
- 1637 Shan, Y., Liu, J., Jiang, Y. J., Shang, H., Jiang, D., and Cao, Y. M. (2012). Age-related susceptibility and resistance to nonlethal *Plasmodium yoelii* infection in C57BL/6 mice. *Folia Parasitol. (Praha)* 59, 153–161. doi: 10.14411/fp.2012.021
- 1638
- 1639 Shear, H. L., Srinivasan, R., Nolan, T., and Ng, C. (1989). Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal Malaria in susceptible and resistant murine hosts. *J. Immunol.* 143, 2038–2044.
- 1640
- 1641 Silveira, F. T., Lainson, R., De Castro Gomes, C. M., Laurenti, M. D., and Corbett, C. E. (2009). Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31, 423–431. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x
- 1642
- 1643 Soulard, V., Roland, J., Sellier, C., Gruner, A. C., Leite-De-Moraes, M., Franetich, J. F., et al. (2007). Primary infection of C57BL/6 mice with *Plasmodium yoelii* induces a heterogeneous response of NKT cells. *Infect. Immun.* 75, 2511–2522. doi: 10.1128/IAI.01818-06
- 1644
- 1645 Stevenson, M. M., and Riley, E. M. (2004). Innate immunity to Malaria. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 169–180. doi: 10.1038/nri1311
- 1646
- 1647 Taylor-Robinson, A. W. (2010). Regulation of immunity to *Plasmodium*: implications from mouse models for blood stage Malaria vaccine design. *Exp. Parasitol.* 126, 406–414. doi: 10.1016/j.exppara.2010.01.028
- 1648
- 1649 Urban, B. C., Ing, R., and Stevenson, M. M. (2005). Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 297, 25–70.
- 1650
- 1651 van den Bogaart, E., Berkhout, M. M., Adams, E. R., Mens, P. F., Sentongo, E., Mbulamberi, D. B., et al. (2012). Prevalence, features and risk factors for Malaria co-infections amongst Visceral Leishmaniasis patients from Amudat Hospital, Uganda. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1617. doi: 10.1371/journal.pntd.001617
- 1652
- 1653 van den Bogaart, E., Talha, A. B., Straetmans, M., Mens, P. F., Adams, E. R., Grobusch, M. P., et al. (2014). Cytokine profiles amongst Sudanese patients with Visceral Leishmaniasis and Malaria co-infections. *BMC Immunol.* 15:16. doi: 10.1186/1471-2172-15-16
- 1654
- 1655 World Health Organization (2010). Control of the leishmaniases. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 949, xii–xiii, 1–186.
- 1656
- 1657 World Health Organization (2015). *World Malaria Report*. Geneva: World Health Organization.
- 1658
- 1659 World Health Organization (2016). *Global Health Observatory (GHO) Data [Online]*. Available: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/Leishmaniasis/en/ [accessed March 15, 2016]
- 1660
- 1661 Yoeli, M. (1948). Non-pigmented Malaria parasites in the bone marrow from a mixed infection of *Leishmania* and *Plasmodium vivax*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 42:99. doi: 10.1016/0035-9203(48)90355-1
- 1662
- 1663 Zarin, P., Chen, E. L., In, T. S., Anderson, M. K., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2015). Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cell Immunol.* 296, 70–75. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.03.007
- 1664
- 1665 Zuzarte-Luis, V., Mota, M. M., and Vigario, A. M. (2014). Malaria infections: what and how can mice teach us. *J. Immunol. Methods* 410, 113–122. doi: 10.1016/j.jim.2014.05.001

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Pinna, dos Santos, da Silva, de Oliveira Ferreira, Verde, De Luca and Banic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.