



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO MISTA POR *Leishmania amazonensis* e  
*Leishmania chagasi* EM MACRÓFAGOS**

**Orientando:** Luana Caroline Santos Pinheiro

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lucilene Amorim Silva

São Luís - MA

2021

LUANA CAROLINE SANTOS PINHEIRO

**RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO MISTA POR *Leishmania amazonensis* e  
*Leishmania chagasi* EM MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucilene Amorim Silva

São Luís - MA

2021

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

Pinheiro, Luana Caroline Santos.

RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO MISTA POR *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* EM MACRÓFAGOS / Luana Caroline Santos Pinheiro. - 2021.

85 f.

Orientador(a): Lucilene Amorim Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2021.

1. Infecção concomitante. 2. Leishmaniose. 3. Perfil imunológico. I. Silva, Lucilene Amorim. II. Título.

LUANA CAROLINE SANTOS PINHEIRO

**RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO MISTA POR *Leishmania amazonensis* e  
*Leishmania chagasi* EM MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucilene Amorim Silva  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joicy Cortez de Sá  
Universidade CEUMA - UniCEUMA

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Aramys Silva dos Reis  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Paulo Vitor Soeiro Pereira  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Dedico a minha família, pelo carinho e apoio.

## **Agradecimentos**

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

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

Aos meus irmãos Larissa Santos e Lucas Santos obrigada pela amizade e companheirismo, sempre me ajudando, me apoiando e torcendo por mim.

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

As minhas amigas Aryana Vasque, Elainny Glades, Nargylla Karoline, que desde a escola estão comigo, torcendo, vibrando e sempre prontas para ajudar. Sou muito feliz com vocês na minha vida, obrigada.

As minhas amigas Suelma Maciel, Lara Larissa, Jessica Freire, Yohana Jardim, que desde o início da graduação estão comigo, em todos os momentos, momentos alegres, divertidos, inusitados, tristes. Obrigada pelo companheirismo, pelos conselhos, pelo carinho, por me ajudarem nos meus dilemas e pela amizade que construímos.

A minha orientadora Lucilene Amorim Silva por me inspirar e sempre estimular a dar o meu melhor, por ter me estendido a mão, pelo carinho, pela palavra amiga, pelo cuidado, por ser pulso firme me ajudando a crescer e ser disciplinada, enquanto profissional, muito obrigada professora, o que sou hoje como pessoa e pesquisadora muito se deve a você.

Agradeço imensamente a professora Ana Paula minha primeira orientadora, com quem sempre aprendo muito, por quem tenho grande admiração por ser uma profissional competente e de forma docemente inspirar a sempre dar o meu melhor. Ao Professor Eder, por quem tenho um carinho enorme, que com seu entusiasmo e generosidade, me ajudou em

muitos momentos. Ao professor Paulo Vitor que é um exemplo de profissional e ajuda muito todos nós com sua sagacidade e grandes conselhos, obrigada.

A equipe LIAC (Laboratório de Imunologia aplicada ao Câncer) em nome de Sulayne, André, que sempre estão prontos para ajudar, tirando dúvidas, auxiliando para solucionar problemas e/ou conversado e tornando nosso dia- a -dia mais agradável e divertido, obrigada.

Aos meus “co-orientadores migs” Douglas e Jefferson que estão comigo desde o início, me ensinando, tirando minhas dúvidas, ficando comigo até tarde no laboratório, para terminar algum ensaio, me aconselhando, me ajudando a crescer como pesquisadora, sou imensamente grata, vocês são um exemplo para mim e se tornaram grandes amigos.

As “migs” Lillian, Andressa, Suelen, Carol, Régis, que me ajudaram com palavras de conforto, me dando ideias e alegrando meus dias, sou muito grata pela amizade e carinho. A minha duplinha Laís, uma grande amiga que o laboratório e o mestrado me deram, que me ajuda sempre e me conforta em momentos de crise, que quero levar para a vida.

A Dona Sônia, que com sua alegria, cuidado e amizade transformou o laboratório em um lugar mais harmônico e familiar, obrigada.

Aos meus queridos amigos Wallison, Suena, Hivana e Priscila, que o mestrado me deu, obrigada pelas palavras, conversas e pelo carinho, vocês deixaram o mestrado mais leve.

Obrigada ao Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia (LPI-UFMA). Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF-UFMA) em nome das professoras Flávia Nascimento e Rosane Guerra, pela inspiração, estímulo e referência.

Obrigada a Pós-graduação de Ciências da Saúde (PPGCS UFMA), a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, a Universidade Federal do Maranhão.

Muito obrigada a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, me estimulando a sempre dar o meu melhor.

## RESUMO

As leishmanioses são endêmicas em várias regiões do mundo, sendo consideradas um grande problema de saúde pública. Nesse contexto, a infecção mista por diferentes espécies de *Leishmania* em um mesmo indivíduo, especialmente em áreas de sobreposição de espécies de Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral, pode ser mais prevalente do que previamente relatado, podendo afetar o curso clínico, o diagnóstico e o tratamento da doença. Nesta pesquisa, foi realizada uma revisão de literatura sobre o panorama da infecção mista, apresentada como capítulo 1, que teve como objetivo identificar os trabalhos já realizados com essa temática. Foram identificados muitos relatos de casos e escassez de trabalhos experimentais. Mas os resultados dos estudos revelaram, que em um meio compartilhado, as espécies distintas podem apresentar comportamentos diferenciados e comprometer o curso da infecção. No capítulo 2, o trabalho realizado, que teve como objetivo, avaliar a resposta imune e o comportamento dos parasitos na infecção mista por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. Para isso, os macrófagos (RAW 264.7) foram infectados por *L. amazonensis* e *L. chagasi*, por 24 e 48 horas, seguido da avaliação da taxa de infecção, produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, produção de citocinas inflamatórias, além da análise morfológica dos vacúolos parasitóforos. Os resultados iniciais relacionados a taxa de infecção mostraram uma sobreposição da *L. chagasi* na infecção mista, sugerindo a ocorrência de uma proliferação desigual e uma competição. Em relação a produção de peróxido de hidrogênio, o grupo de infecção mista demonstrou uma produção semelhante a observada na infecção única por *L. chagasi*, podendo esta espécie estar influenciando a produção desse reativo na infecção mista. Já a produção de citocina TNF- $\alpha$ , na infecção mista foi semelhante à observada na infecção única por *L. amazonensis*, por isso acredita-se que a presença dessa espécie pode ser relevante para a produção dessa citocina, no meio compartilhado. A quimiocina MCP-1, foi um parâmetro que não apresentou diferença entre os grupos, mesmo estando ligada ao recrutamento de monócitos e ao aumento do número de macrófagos no decorrer da infecção única e mista. Avaliada a quantidade de vacúolo parasitóforo, foi observada no tempo de 48h uma quantidade menor dessas estruturas no grupo de infecção mista, resultado que pode estar relacionado a estratégia de compartilhamento de vacúolos pelos parasitos, já analisada em outros estudos com outras espécies. Em relação a área do vacúolo, foi notado um aumento da extensão apenas no grupo de infecção única por *L. chagasi*, no tempo de 48h. Tendo em vista os resultados, foi possível observar que em um ambiente compartilhado, a influência das espécies acontece de forma diferenciada, havendo alteração no comportamento dos vacúolos e atuação da citocina TNF- $\alpha$  podendo favorecer o estabelecimento do protozoário no hospedeiro e comprometer o curso clínico da infecção.

**Palavra-chave:** leishmaniose, Infecção concomitante, perfil imunológico

## ABSTRACT

Leishmaniasis is endemic in several regions of the world, being considered a major public health problem. In this context, mixed infection by different *Leishmania* species in the same individual, especially in areas of overlapping LTA and LV species, may be more prevalent than previously reported, affecting the clinical course, diagnosis and treatment of the disease. In this research, a review was carried out on the panorama of mixed infection, presented as chapter 1, which aimed to identify the work already carried out on this topic. Many case reports and a scarcity of experimental works were identified. But the results of the studies revealed that in a shared environment, different species can show different behaviors and compromise the course of the infection. In chapter 2, the work carried out, which aimed to evaluate the immune response and behavior of parasites in mixed infection by *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. For this, the macrophages were infected by *L. amazonensis* and *L. chagasi*, at times of 24 and 48 hours, then the infection rate, production of nitric oxide, hydrogen peroxide, production of inflammatory cytokines, in addition to the morphometric analysis were evaluated. of the parasitophorous vacuoles. The initial results related to the infection rate showed an overlap of *L. chagasi* in the mixed infection, suggesting the occurrence of an uneven proliferation and competition. Regarding the production of hydrogen peroxide, the mixed infection group showed a production similar to that seen in the single infection by *L. chagasi*, and this species may be influencing the production of this reactive in the mixed infection. The production of cytokine TNF- $\alpha$  in the mixed infection was similar to that observed in the single infection by *L. amazonensis*, so it is believed that the presence of this species may be relevant for the production of this cytokine in the shared environment. The MCP-1 chemokine was a parameter that showed no difference between the groups, even though it is an important chemokine linked to the recruitment of monocytes and the increase in the number of macrophages during the single and mixed infection. After evaluating the amount of parasitophorous vacuoles, a smaller amount of these structures in the mixed infection group was observed within 48 hours, a result that may be related to the strategy of sharing vacuoles by the parasites, which has already been analyzed in other studies with other species. Regarding the area of the vacuole, an increase in extension was noted only in the group with single infection by *L. chagasi*, within 48 hours. In view of the results, it was possible to observe that in a shared environment, the influence of species occurs differently, with changes in the behavior of vacuoles and the action of the cytokine TNF- $\alpha$ , which may favor the establishment of the protozoan in the host and compromise the clinical course of infection

**Keyword:** Leishmaniasis, Concomitant infection, immunological profile

## LISTA DE SIGLAS

ADO	Adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Proteína ativadora 1
B.O.D.	Demanda bioquímica de oxigênio ( <i>Biochemical Oxygen Demand</i> )
C3b	Componente do complemento
CBA	Ensaio Citométrico de Esferas Ordenadas ( <i>Cytometric Bead Array</i> )
CD4 <sup>+</sup>	Linfócito T auxiliar
CD8 <sup>+</sup>	Linfócito T citotóxico
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CP	Carga parasitária
CR3	Receptor complemento três
DHR	Dihydrorhodamine 123 ( <i>Dihydrorhodamine 123</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FasL	Receptor Fas-Ligante
fPPG	Proteofosfoglicano filamentosos
FSB	Soro Fetal Bovino
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
GP63	Glicoproteína 63
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPG	Liposfoglicano
LC	Leishmaniose Cutânea
LPS	Lipopolissacarídeos
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócitos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear- $\kappa$ B
NK	Célula Assassina Natural ( <i>Natural killer</i> )
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintase do tipo 2
°C	Graus Celsius
PBS	Tampão fosfato-salino ( <i>Phate Buffered Salin</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato ( <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> )
PSG	Gel Secretado de Promastigota ( <i>Promastigote Secretory Gel</i> )
ROS	Espécies reativas ao oxigênio ( <i>Reactive oxygen species</i> )
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute ( <i>Roswell Park memorial</i> )

*institute medium)*

SAPK/JNK	Proteína quinase ativada por estresse
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SOD	Enzima superóxido dismutase
STAT-1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador- $\beta$
Th1	Linfócito T auxiliar perfil 1
Th2	Linfócito T auxiliar perfil 2
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
U	Mol

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar	18
Figura 2. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Visceral	19
Figura 3. Imagens do Vetor e Parasito da Leishmaniose	21
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania sp</i>	22
Figura 5. Representação esquemática da <i>Leishmania sp</i>	23
Figura 6. Resposta dos neutrófilos na leishmaniose	24
Figura 7. Macrófagos no controle da replicação de <i>Leishmania ssp</i>	25
Figura 8. Vacúolos Parasitóforos	28
Figura 9. Fluxograma da seleção dos artigos incluídos na revisão	38
Figura 10. Fluxograma analítico do trabalho.	56
Figura 11. Disposição dos grupos	57
Figura 12. Taxa de Infecção	60
Figura 13. Macrófagos RAW 264.7 infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> (GFP) e <i>Leishmania chagasi</i>	61
Figura 14. Produção de Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	62
Figura 15. Quantificação de citocina TNF- $\alpha$	62
Figura 16. Quantificação de citocina MCP-1	63
Figura 17. Quantidades de Vacúolos	63
Figura 18. Área do Vacúolo	64

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b>	Lista dos trabalhos já desenvolvidos sobre infecção mista.	<b>39</b>
-----------------	--	-----------

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
2.1 Epidemiologia .....	18
2.2 Formas clínicas da Leishmaniose.....	20
2.3. Ciclo e transmissão .....	22
2.4. Resposta imune as Leishmanioses .....	24
2.5 Infecções mistas .....	30
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>33</b>
<b>3.ARTIGO DE REVISÃO .....</b>	<b>34</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	36
3.2 METODOLOGIA .....	38
3.3 RESULTADOS.....	39
3.4 DISCUSSÃO .....	36
3.5 CONCLUSÃO .....	52
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>58</b>
<b>4.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
5.1. Objetivo geral.....	61
5.2. Objetivo específico .....	61
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>62</b>
6.1 Culturas de células RAW 264.7 .....	62
6.2. Parasito.....	62
6.3 Delineamento Experimental.....	62
6.4 Infecção dos Macrófagos .....	63
6.5. Avaliação da taxa de infecção de macrófagos M0.....	63
6.6. Dosagem de NO .....	64
6.7. Dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	64
6.8. Morfometria .....	64
6.9 Dosagem de citocinas.....	65
6.10 Análise Estatística .....	65
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
7.1 Taxa de Infecção de macrófagos M0 .....	66
7.2 Macrófagos RAW 264.7 infectados por <i>L. amazonensis</i> (GFP) e <i>L. chagasi</i> .....	67
7.3 Quantificação de NO e Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em macrófagos.....	68
7.4 Quantificação de citocinas .....	68

7.5. Quantidades de Vacúolo .....	69
7.6 Área de Vacúolos .....	69
<b>8. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>9.CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A leishmaniose é uma doença endêmica em várias regiões do Brasil. Sua amplitude no país se dá, pelo avanço urbano sobre as áreas de florestas e habitat natural do vetor. É causada por parasitos do gênero *Leishmania* e sua transmissão ocorre através de um inseto, denominado flebotomíneo, pertencente, por exemplo, ao gênero *Lutzomyia*. Essa infecção tem grande impacto na saúde pública, com mais de 88 espécies causando as formas clínicas Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral (LV) (GUIMARÃES-E-SILVA *et. al.*, 2017; BRASIL, 2018; WHO, 2019).

A variedade de espécies que causam essa doença, implica em grandes desafios como: as apresentações de clínicas atípicas, resistências aos medicamentos e as novas competências dos vetores, impactando e dificultando o controle da infecção (SHIRIAN *et. al.*, 2014; CHIOCCOLA, 2015; SILVA *et. al.*, 2018).

Esses comportamentos desafiadores, podem estar associados a uma infecção simultânea de um hospedeiro por dois ou mais patógenos (NOWAK, 1995, CHAGAS *et al.*, 2018). E essa característica de infecção na leishmaniose pode estar ocorrendo com mais frequência do que previamente relatado.

A epidemiologia das infecções na sua forma única, já é bem conhecida, entretanto casos de infecções por mais de uma espécie de *Leishmania* apresentam baixas notificações, e é possível que esta dificuldade esteja associada a ausência, muitas vezes, da identificação das espécies nos diagnósticos para casos dessa natureza (KHANJANI, 2018; CHAGAS, 2018).

Estudos e investigações que proporcionem uma melhor compreensão do comportamento das espécies de *Leishmania*, se faz necessário, objetivando um melhor controle da doença. Portanto, esse trabalho apresenta uma revisão sistemática, acerca da infecção mista causada por duas ou mais espécies do gênero *Leishmania* (capítulo 1). E uma investigação experimental *in vitro* sobre o comportamento dos parasitos e sobre a resposta imune de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* (capítulo 2).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Epidemiologia

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas presentes em todo mundo, com grande número de casos, causando desde lesões cutâneas até infecções viscerais mais graves. Algumas infecções quando não tratadas podem levar a óbito, a exemplo, a Leishmaniose Visceral (LV). E em outros casos podem ser auto cicatrizantes, como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (WHO, 2019).

O aumento dos casos de leishmaniose está muito ligado a mudanças ambientais, como desmatamento, construção de barragens e urbanização. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que cerca de 700.000 a 1 milhão de novos casos e 26.000 a 65.000 mortes ocorram anualmente (WHO, 2019).

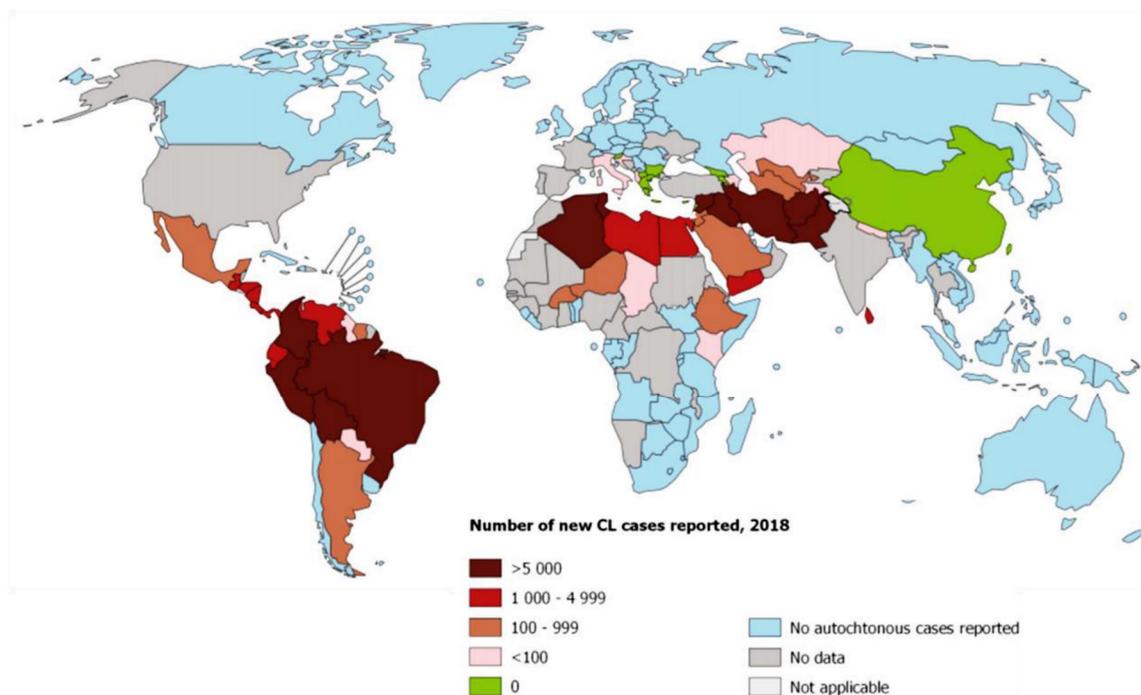
A ausência de recursos, de acesso à saúde, a desnutrição, a falta de gerenciamento de resíduos e o aumento das viagens, são outros fatores relacionados ao favorecimento da expansão da doença, que tem levado ao crescimento do número de casos de leishmaniose em regiões não endêmicas (FIELD V. *et al.*, 2010; WHO, 2017). Valendo ressaltar que o sistema biológico da infecção envolve o parasito, o inseto vetor e diferentes hospedeiros vertebrados, o que dificulta ainda mais o controle da doença (LESSA, *et al.* 2019).

No Brasil, a infecção é bem prevalente, principalmente na região nordeste. A doença está presente em 23 estados e nas 5 Regiões brasileiras, com 64,8% dos casos acometendo indivíduos do sexo masculino, 40,9% ocorrendo em crianças de 0-9 anos e 7,8% a 8,8% de letalidade, demonstrando como a morbidade da infecção é alta no país (WHO, 2018).

A LTA, é a forma mais comum de leishmaniose e estima-se que 431 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas. Nas Américas, no período de 2001 a 2017, um total de 940.396 casos novos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram reportados por 17 dos 18 países endêmicos, com uma média anual de 55.317, sendo o Brasil responsável por 72,6% desses casos (Organização Pan-Americana de Saúde, 2019). A Argélia, foi o país com o maior número, totalizando sozinho 146.556, que corresponde a 74% dos casos. Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iémen, Iraque, Marrocos, Peru, República Árabe da Síria, República Islâmica do Irã, Sudão e Tunísia apresentam 90% dos casos de LC em todo o mundo (WHO, 2018) (Figura 1).

A epidemiologia da LC na região das Américas é complexa, com variação intra e interespecífica nos ciclos de transmissão, com número variado de hospedeiros, vetores e com

múltiplas espécies circulantes de *Leishmania* na mesma área geográfica, influenciando as manifestações clínicas e a resposta à terapia (COSTA, 2018).



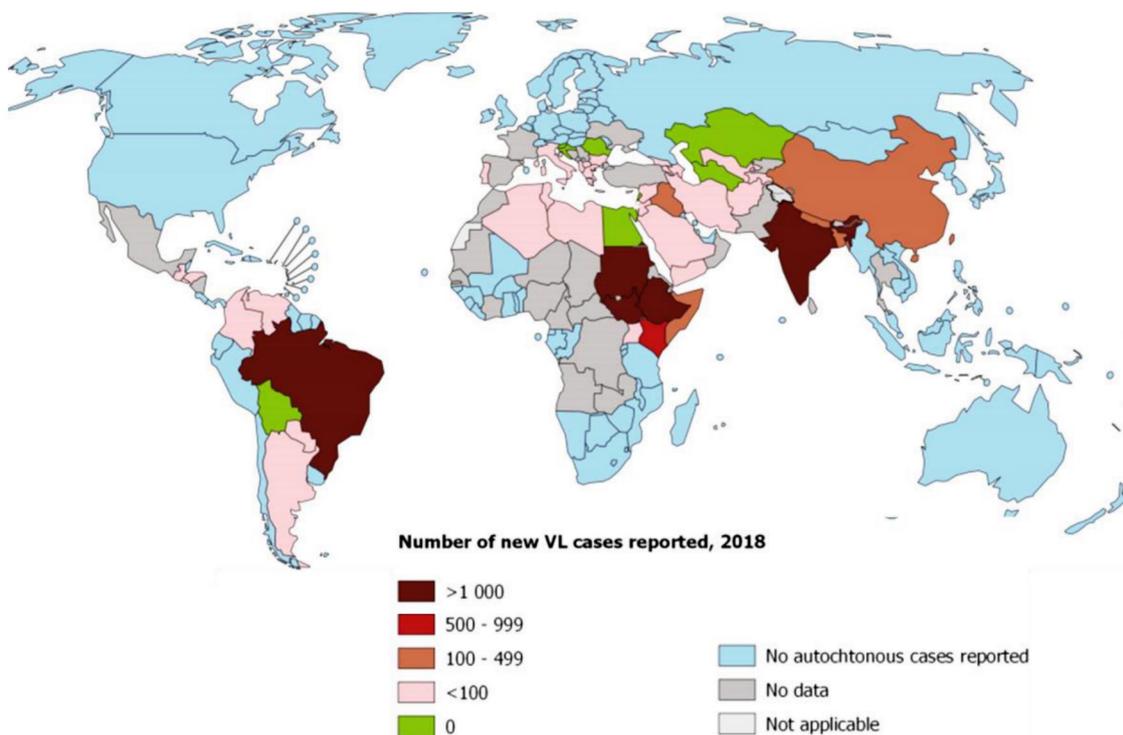
**Figura 1. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Cutânea:** Mapa Mundi representando os países em cores de acordo com o número de casos clínicos Fonte: (Adaptado) WHO, 2018

A LV é caracterizada pela evolução crônica e envolvimento sistêmico, que chega a ser potencialmente fatal para o homem, quando não tratada adequadamente (GONTIJO e MELO, 2004). Com grande distribuição, a ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor suscetível e de um hospedeiro/reservatório igualmente suscetível (GONTIJO e MELO, 2004). Na área urbana, o cão é a principal fonte de infecção e no meio silvestre, as raposas e os gambás são alguns exemplos de reservatórios (BRASIL, 2018; LESSA, *et. al.*, 2019).

No Brasil, a LV é considerada uma doença em expansão, pois até o ano de 1980 sua ocorrência era exclusivamente em municípios da região Nordeste, mas atualmente todas as regiões do país confirmam casos anualmente. No período de 2003 a 2018, foram confirmados mais de 51 mil casos em humanos, com incidência média de 1,7 (variando de 1,4 a 2,1) casos/100 mil habitantes e letalidade de 7,2% (Figura 2) (OMS, 2018; BRASIL, 2018).

No Maranhão, estado com grande endemia para as duas formas clínicas da doença, é observado uma quantidade expressiva de casos na região oeste, com o clima e a vegetação

contribuindo para a diversidade de espécies de vetores e reservatórios. Nos últimos anos, houve uma diminuição da LTA em alguns municípios, porém ocorreu o aparecimento de novos casos em áreas antes não encontradas. Assim como a LV que vem crescendo na forma de coinfeção com o HIV, com muitos casos acometendo indivíduos da zona rural (RABELO *et al.*, 2010; RABELO *et al.* 2015; GUIMARÃES-E-SILVA *et al.* 2017; ALENCAR E FIGUEIREDO, 2018).



**Figura 2. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Visceral:** Mapa Mundi representando os países em cores de acordo com o número de casos clínicos (Adaptado). Fonte: WHO, 2018

## 2.2 Formas clínicas da Leishmaniose

Em relação as manifestações clínicas, a diversidade está relacionada as distintas características biológicas das espécies que compõem o gênero *Leishmania*, em conjunto com as características do hospedeiro. Valendo ressaltar que existem ainda formas subclínicas da doença, que na ausência de sinais clínicos, podem ser erroneamente diagnosticados (MIR F. *et al.*, 2012; LEE,2016).

A LTA, é causada pelas espécies *Leishmania (Vianna.) braziliensis*, *Leishmania (Vianna.) guyanensis*, *Leishmania. (Vianna.) lainsoni*, *Leishmania. (Leishmania.) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania.) mexicana*. E o desenvolvimento dos sintomas clínicos inicia a partir do surgimento de lesões em forma de pápula no local da hematofagia

pelo vetor, aparecendo em partes expostas do corpo, podendo apresentar mais de uma lesão, com desenvolvimento ou não de úlceras na pele (VERMAET, 2012; KHANJANI, 2018). A cutânea difusa, está associada na maioria das vezes à infecção por *L. mexicana* e *L. amazonensis*. E as lesões na mucosa geralmente ocorrem com ampla distribuição de nódulos, pápulas, máculas e infiltração difusa na superfície da pele, da face e dos membros (VERMAET, 2012). A imunossupressão associada à leishmaniose cutânea difusa causada por outras espécies de *Leishmania*, pode ocorrer em pacientes coinfectados com HIV. A mucocutânea é causada principalmente pela *L. brasiliensis*, com incidência de 1 a 10% dos pacientes infectados. Inicialmente a manifestação dessa forma clínica ocorre com uma lesão e posterior aparecimento de sintomas como eritemas e ulcerações nas narinas, seguido de uma grave inflamação, que pode se espalhar para a faringe e laringe (KHANJANI, 2018).

Provavelmente, a diversidade de manifestações clínicas na LTA e suas formas de progressão, estão relacionadas ao número de espécies e aos perfis de resposta diferenciados que elas podem desenvolver (KHANJANI, 2018).

Já a LV, nas Américas, é causada por *Leishmania L. (L.) donovani*, *L. (L.) chagasi* e tem como hospedeiros os cães, animais silvestres e os seres humanos. É caracterizada em sua forma típica por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, associada a achados laboratoriais incluindo pancitopenia, leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, com intenso e difundido parasitismo em órgãos como fígado, baço e medula óssea (WHO, 2018).

O aumento exponencial de 150 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco, indica a expansão da área de abrangência da doença (LV e LTA), que quando foi associada ao aumento significativo no número de casos, passou a ser considerada pela Organização Mundial da Saúde, uma das prioridades dentre as doenças tropicais. Embora existam métodos de diagnóstico e tratamento específicos, grande parte da população não tem acesso a estes procedimentos, elevando os índices de mortalidade (REIS, 2019).

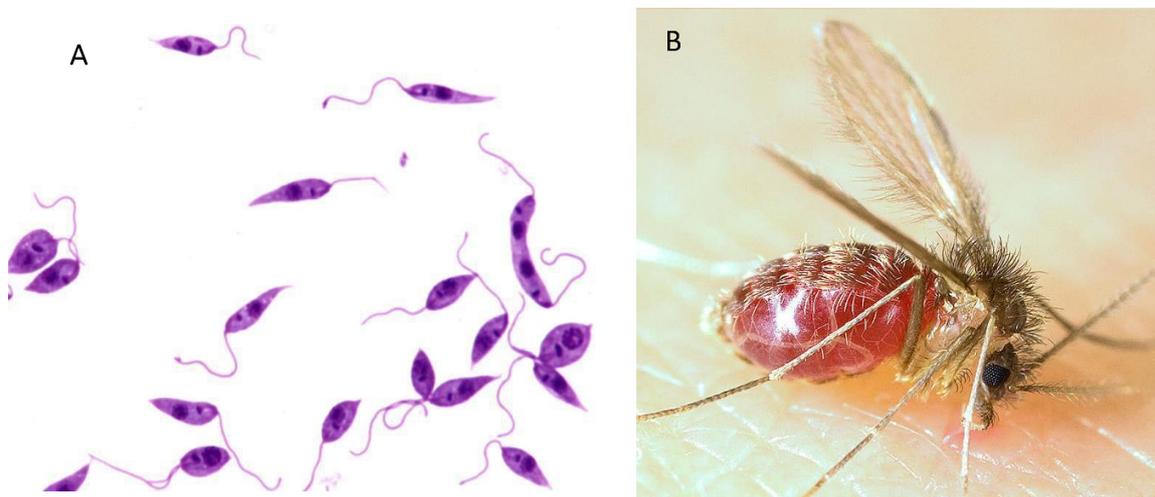
Além do controle epidemiológico da infecção, os desafios da vigilância tem sido garantir o diagnóstico eficaz e a realização de manejo terapêutico adequado, para reduzir sequelas provocadas pela doença e os óbitos relacionados ao tratamento. O tratamento é realizado utilizando os fármacos de primeira escolha, os antimoniais pentavalentes que, no Brasil, são representados pelo Antimoniato de N-metilglucamina ou Glucantime, feito em doses diárias, intramusculares ou venosas, por 20 a 30 dias. E o de segunda escolha, a

anfotericina B e a pentamidina. Em 2016, a OMS ampliou os critérios de uso de anfotericina B lipossomal, incluindo pacientes maiores de 50 anos, além de incorporar a técnica intralesional, que consiste na administração do medicamento antimoniatado de meglumina direto na lesão, reduzindo o risco de toxicidade (AULTON E TAYLOR, 2016; OMS/OPAS, 2019).

### 2.3. Ciclo e transmissão

Outro ponto importante quando se fala no controle da infecção é a transmissão. As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), transmitida através do repasto sanguíneo de insetos fêmea, denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros (Figura 3) (WHO, 2019).

Nas Américas a principal espécie transmissora é *Lutzomyia longipalpis*, entretanto, as espécies *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei*, têm se mostrado importantes vetores. No Brasil, a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão, pois é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: nordeste, norte, sudeste e centro-oeste (REBÊLO JMM *et. al.*, 2010; GUIMARÃES-E-SILVA *et. al.*, 2017; BRASIL, 2018)

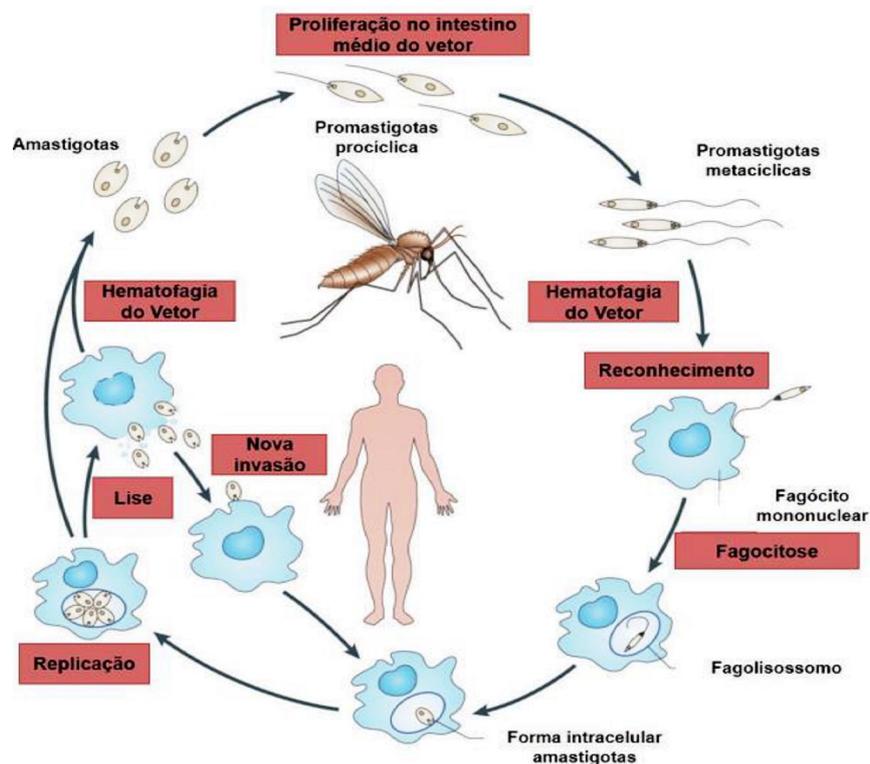


**Figura 3. Imagens do Vetor e Parasito da Leishmaniose.** *Leishmania spp* (A); *Lutzomyia longipalpis* (B).  
Fonte: School of Tropical Medicine, PLoS Pathogens Issue Image 2009; Look For Diagnosis.

O ciclo se inicia (fase extracelular), quando a fêmea do flebotomíneo realiza a hematofagia no hospedeiro infectado e ingere monócitos com as formas amastigotas. Em seu

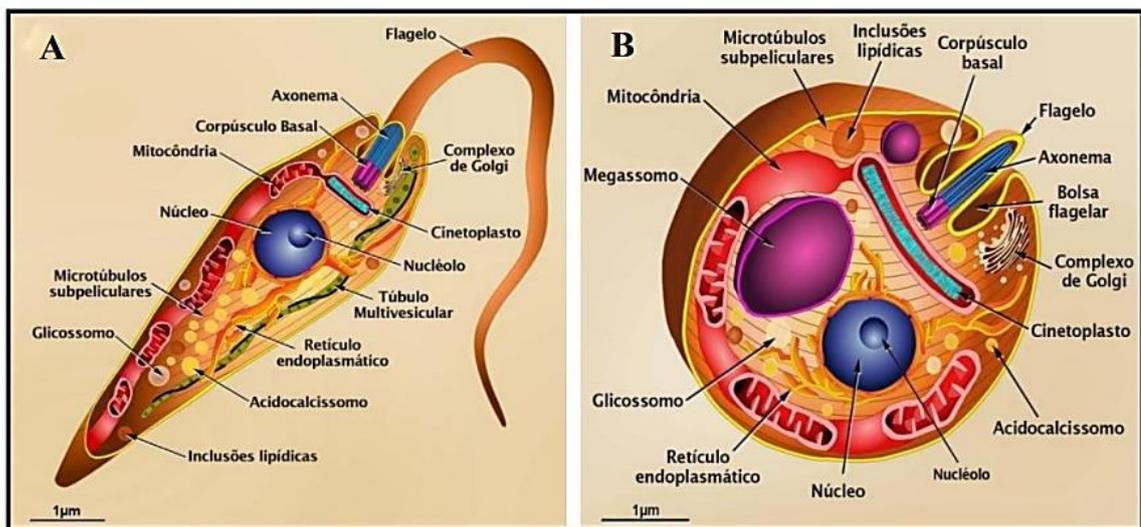
trato digestivo ocorre a liberação do parasito que se aloja em partes do intestino médio (Figura 4) (SILVA, 2018).

No intestino, acontece um processo denominado metaciclologênese, onde as formas atingem um estado infeccioso (SILVA *et. al.*, 2018). Ocorrem alterações nos constituintes da membrana (exemplo molécula lipofosfoglicano (LPG)) da promastigota e na ação da glicoproteína (GP63), havendo uma transformação da leishmania em vários estágios não infecciosos (promastigotas procíclica, nectomonada, leptomonada e haptomonada) até ela atingir a forma promastigota metacíclica (forma infectante), com o papel de replicar e colonizar o flebotomíneo. Também ocorre a formação de um tampão biológico de parasitos, que bloqueia o intestino anterior e modifica o comportamento alimentar do vetor. Para fazer isso, eles secretam proteofosfoglicano filamentososo (fPPG), que se mistura com a saliva (gel secretório promastigote (PSG)), forçando o flebotomíneo a regurgitar parasitos durante a hematofagia (GIRAUD, 2019).



**Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.** O vetor ingere as formas amastigotas do hospedeiro infectado, onde as leishmanias se diferenciam em promastigotas procíclicas. Elas se multiplicam e passam pela metociclologênese, se transformam em promastigotas metacíclicas e são inoculadas no hospedeiro humano no momento da hematofagia. As leishmanias metacíclicas são reconhecidas pela célula do sistema fagocitário mononuclear, que fagocitam o parasito. No interior da célula é formado o fagolisossomo, onde as leishmanias se diferenciam em amastigota (forma intracelular replicante) e se multiplicam ao passo que rompem a célula infectada, infectando novas células recomeçando o ciclo novamente. Fonte: adaptado de KAYE & SCOTT,

As formas de *Leishmania* metacíclicas e as procíclicas são encontradas em culturas de células livres, no qual as procíclicas se proliferam e se diferenciam em metacíclicas, sendo estas mais abundantes na fase estacionária da cultura. Durante esse processo, uma variedade de genes apresenta diferentes expressões de padrões, que acabam codificando fatores virulentos (RAMOS *et al.*, 2011; ANVERSA, 2018). O parasito assume duas formas, a forma promastigota (com flagelo) presente no ciclo extracelular e a forma amastigota (flagelo modificado) presente no ciclo intracelular no interior dos macrófagos (Figura 5). As formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas durante o repasto e após um período de quatro a oito horas, são internalizadas por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro.



**Figura 5. Representação esquemática da *Leishmania* spp. Nas fases extracelular e intracelular(A) forma promastigota, (B) forma amastigota de *Leishmania* spp. Adaptado de Teixeira et al., 2013.**

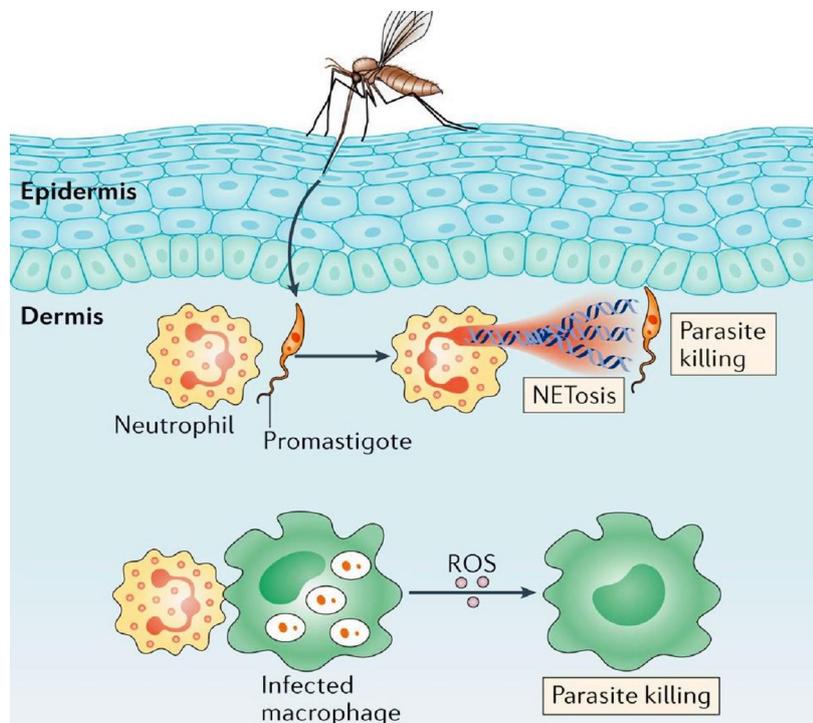
Quando entram em contato com o organismo do hospedeiro, podem ser fagocitadas ou podem burlar a resposta microbicida do macrófago se multiplicando até ocupar grande parte do citoplasma, rompendo a membrana dessa célula e invadindo outros macrófagos e outras células do sistema imune (KAYE & SCOTT, 2011; ANVERSA, 2018).

#### 2.4. Resposta imune as Leishmanioses

Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que estão presentes, principalmente, nas células da imunidade inata, podendo destacar os do tipo Toll (toll-like receptor, TLRs), que possuem uma gama de receptores (do TLR-1 ao 10), dão início a resposta imune no hospedeiro. Esse reconhecimento tem o papel fundamental no início da resposta imune aos antígenos microbianos diversos,

gerando um controle e promovendo a proteção do organismo (MIYAKE, 2007; OUALHA *et. al.*, 2019).

A resposta imune contra a leishmaniose é mediada por célula. Após o repasto sanguíneo, o vetor inocula o parasito na pele e posteriormente são fagocitados pelas células. As formas promastigotas metacíclicas são reconhecidas pelos neutrófilos ou polimorfonucleares (PNMs), que são as primeiras células a chegarem no sítio da infecção. Com função protetora, elas realizam a fagocitose, liberam os grânulos eo DNA em redes extracelulares (NETs) (Figura 6), além de secretarem o TNF- $\alpha$ , citocina importante no cone da infecção, induzindo inclusive a destruição do parasito em macrófagos (CARNEIRO *et. al.*, 2018).

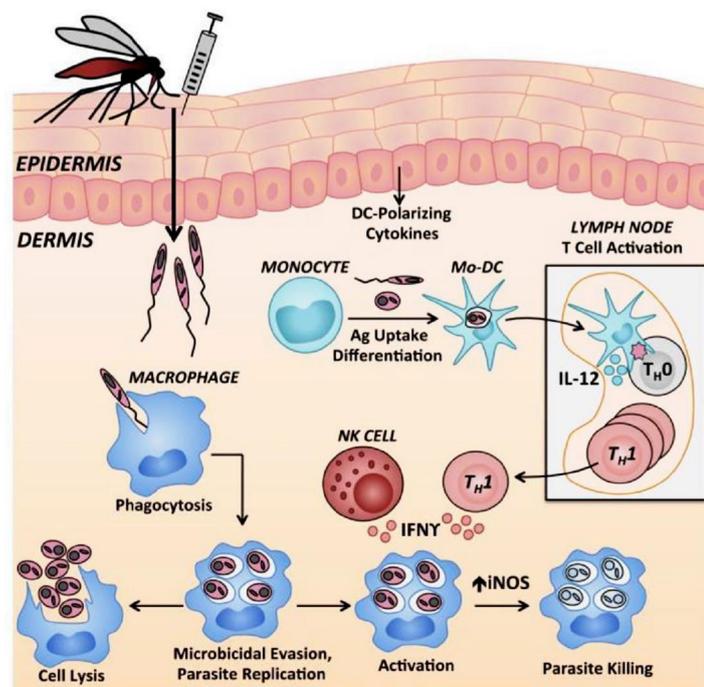


**Figura 6. Resposta dos neutrófilos na leishmaniose:** Logo após a infecção, os neutrófilos podem liberar armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e neutralizar e matar as promastigotas. Assim como ativar macrófagos infectados e induzir o controle do parasito de uma maneira dependente de espécies reativas de oxigênio (ROS). Fonte: SCOT *et al.* 2016.

O processo de fagocitose pelos neutrófilos é eficiente após a opsonização dos microrganismos com proteínas do sistema complemento (SC), tais como as moléculas C3b e C3bi. Os microrganismos opsonizados por C3 são reconhecidos por receptores de moléculas heterodímeras (CR1 e CR3), que estão na superfície do neutrófilo. Após a fagocitose ocorre a ativação de diferentes mecanismos microbicidas dos neutrófilos, já citados, além da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KEESEN *et. al.*, 2011; SCOTT; NOVAIS, 2016).

O SC é ativado pela via alternativa e pela via clássica, para que haja o aumento na fagocitose. Inicialmente são estimuladas as cascatas proteolíticas com liberação de C3a, havendo a formação do complexo de ataque a membrana (MAC), responsável pela morte da leishmania. Valendo ressaltar que algumas promastigotas são resistentes à ação lítica do complemento, apresentando uma barreira de proteção contra a ação desse sistema. Em seguida ocorre uma interação entre os receptores ligantes do parasito e os da membrana, iniciando a fagocitose pelo macrófago, onde formas promastigotas se transformam em amastigotas. No interior dos macrófagos, os parasitos habitam o fagolisossomo, estrutura originada da fusão do fagossomo e lisossomo, que promove um ambiente sob ação de enzimas, pH e temperatura, importantes para o controle do parasito e resposta imune (KUMAR; ENGWERDA, 2014; CARNEIRO *et. al.*, 2018).

Na LTA, a resposta imune está relacionada a atuação da célula T CD4 e dos perfis Th1 (inflamatório) e Th2 (regulatório). Uma resposta Th1 é mediada, principalmente, por TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , fator estimulador de colônias de GM-CSF e interleucinas 12, 2 (IL-12, IL-2), com participação de células NK e células dendríticas (DC) (Figura 7), estando associada com a resolução e resistência à doença (CHISTIAKO, 2018). E a resposta do tipo Th2 é mediada pelas interleucinas 4 (IL-4), 10 (IL-10), fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) conferindo susceptibilidade e progressão da doença no hospedeiro (SCORZA, 2017).



**Figura 7. Macrófagos no controle da replicação de *Leishmania ssp.*** Macrófagos inflamatórios, são a células hospedeiras primárias e elas podem facilitar a sobrevivência e ou a replicação intracelular da leishmania e a produção de citocinas pode modular esse processo. A ação de sinais de ativação de IFN $\gamma$  de células tipo 1 ou de células NK, podem promover a regulação positiva de iNOS e combinada com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contribuir para a morte do parasito intracelular. FONTE: SCORZA, 2017.

A atuação desses perfis influencia a diversidade clínica observada na LTA. As lesões localizadas autocicatrizantes têm perfil predominantemente Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), enquanto a resposta mediada por Th2 ((IL-4, IL-10), caracteriza-se por lesões difusas e não cicatrizantes. Já a lesão mucocutânea apresenta uma resposta mista, mas com uma predominância Th1, que pode explicar o comportamento inflamatório agressivo e a cronicidade dessa forma clínica (COELHO *et. al.*, 2018).

Na LV, a ativação de macrófagos via IFN- $\gamma$ , resulta na síntese de reativos de nitrogênio e oxigênio (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tóxicos para os parasitos (BARCELLAR E CARVALHO, 2005; LIMA, 2013). A citocina IFN $\gamma$ , produzida principalmente por células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 e por células NK, estimulada por IL-12, promove a ativação dos macrófagos através da expressão da enzima NOS2 e conseqüentemente produção de NO e radicais superóxidos. O NO através da catalização da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase do tipo 2 (NOS2) ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MICHEL & FERON, 1997; QADOUMI *et al.*, 2002) e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da catalização do anion superóxido pela enzima NADPH oxidase, que pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), se converte rapidamente em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em radicais hidroxilas e anion hidroxilas, levando a morte do parasito. Citocinas regulatórias (IL-10 e IL-4) diminuem a expressão de IFN- $\gamma$  e conseqüentemente a produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comprometendo a eliminação dos parasitos intracelulares, gerando as formas graves da infecção (CONCEIÇÃO *et. al.*, 2014; COELHO *et. al.*, 2018).

As manifestações clínicas estão relacionadas ao perfil de susceptibilidade à infecção. Quando a resposta inflamatória começa a se intensificar o sistema imune do hospedeiro estimula a produção de citocinas regulatórias, iniciando a resposta do tipo Th2. Nesse caso, ocorre a proliferação de linfócitos B e produção das citocinas IL4, IL5, IL6, IL10, promovendo a plasmocitose e hipergamaglobulinemia, que levará à formação de imunocomplexos, gerando uma resposta humoral ineficiente e conseqüentemente a sobrevivência do parasito (BARBIÉRI, 2006; COELHO *et al.*, 2018).

Outra célula importante, que está envolvida na resposta de LTA e LV e a Th17. Ela estimula a produção de IL-17, que pode aumentar a produção de mediadores inflamatórios (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e NOS2) e de acordo com alguns estudos, desenvolver uma correlação direta com TNF- $\alpha$ , estimulando uma ação exacerbada, levando ao progresso de LTA (PEREIRA-CARVALHO *et. al.*, 2013; SCOTT; LEE, J. S. *et. al.*, 2015; NOVAIS, 2016) ou a

uma ação mais eficaz e equilibrada, levando ao controle de LV (PITTA et al, 2009; NOVAIS, 2016).

Assim como, a MCP-1 / CCR2 (Proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) quimiocina CC, receptor 2 de quimiocina CC (CCR2)), que desempenha um grande papel na resposta imune contra a leishmania. Conhecida por atrair monócitos, células dendríticas (DCs), células assassinas naturais (NK) e linfócitos T de memória, é uma quimiocina fundamental para a defesa do hospedeiro a uma série de patógenos. Foi observado que altas doses de MCP-1, ativam os mecanismos anti- macrófagos de leishmania, seja induzindo reativos de oxigênio intermediários ou via produção de óxido nítrico (IBARRA-MENESES *et. al*, 2017). Na leishmaniose humana, há evidências de que concentrações elevadas de MCP-1, em lesões cutâneas autocurativas localizadas, tem papel importante no controle da infecção (SINGH *et. al*, 2017). Sua capacidade de ativar os mecanismos de morte de macrófagos anti-leishmania, tem sido amplamente estudada como um biomarcador de cura na leishmaniose tegumentar (IBARRA-MENESES *et. al*, 2017).

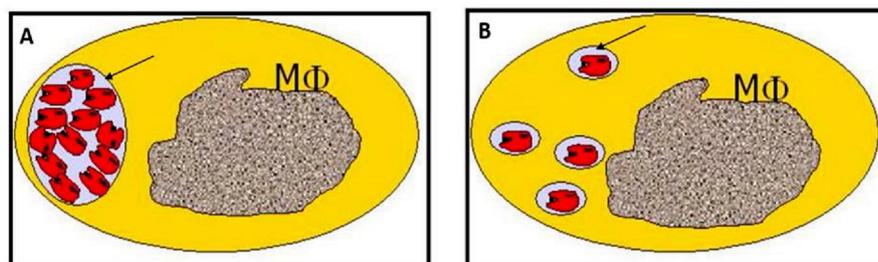
A resposta imune Th1, que é montada após a infecção, é constantemente acompanhada pela resposta de células T reguladoras (CD4+ e CD25+), que produzem IL-10 e TGF- $\beta$ , bloqueando a ativação excessiva de células Th1 e por conseguinte, prevenindo danos aos tecidos (CAMPANELLI *et al.*, 2006; LEOPOLDO *et.al.*, 2006; ANVERSA *et al.*, 2018).

Logo, podemos observar que é grande o arsenal imunológico envolvido na resposta contra a leishmaniose. As diversas subpopulações de células T CD4 (Th1, Th2, Th17 e T regulatórias) guiam a patologia para tipos distintos de resposta imunológica e manifestações clínicas. Dessa forma, a determinação do desfecho da doença vai depender de fatores que incluem, a atuação do sistema imune do hospedeiro e a uma série de características e habilidades do parasito (FOWELL, 2009; ANVERSA *et al.*, 2018).

A leishmania têm habilidades para desenvolver complexas estratégias de evasão do sistema imune, que leva a falha do hospedeiro vertebrado em controlar a infecção, como: a habilidade em resistir às ações microbicidas dos macrófagos e a de inibir a resposta imune celular do hospedeiro (CANTON *et al.*, 2012; CHAGAS *et. al.*, 2018)

Uma dessas estratégias é o desenvolvimento das estruturas denominadas vacúolos parasitóforos (VP), que facilitam a proliferação do parasito no fagolisossomo, levando as células ao rompimento (DESCOTEAUX, 2015).

Os fagossomos sofrem um processo de maturação que resulta na formação dos VPs (ANTOINE *et. al.*, 1990; REAL e MORTARA, 2012), nos quais o parasito se diferencia e se multiplica. Estes vacúolos são revestidos por uma membrana originada da membrana plasmática da célula hospedeira, formada por sucessivos e coordenados eventos de fusão com as vesículas da via endocítica. A estrutura do VP pode diferir dependendo da espécie de *Leishmania* e da célula hospedeira envolvida. (CANTON *et al.*, 2012; DESCOTEAUX, 2015).



**Figura 8. Vacúolos Parasitóforos:** Estruturas dos vacúolos (A) Apresentando uma área extensa e comportando um grande número de amastigotas (B) Apresentando uma área pequena e comportando um número reduzido de amastigotas. Essas diferenças se apresentam de acordo com a espécie A – Complexo *Leishmania* (*Leishmania*), B- Complexo *Leishmania* (*Viannia*). FONTE: TEIXEIRA, 2013.

A espécie *L. amazonensis* tem a capacidade peculiar de realizar a fusão dos VPs individuais e formar outros maiores, diluindo as proteases presentes nos lisossomos e permitindo que os parasitos se transformem em formas amastigotas resistentes às enzimas (CANTON *et. al.*, 2012; REAL e MORTARA, 2012).

A maioria das espécies do gênero *Leishmania* residem nos vacúolos estreitos e individuais, porém, amastigotas de *L. amazonensis* induzem a formação de vacúolos maiores que podem chegar a comportar até 30 amastigotas (DESJARDINS *et al.*, 1994; ANTOINE *et al.*, 2004; NDJAMEN *et al.*, 2010), enquanto *L. major* e *L. donovani*, induzem a formação de vacúolos pequenos, com pouco espaço ao redor das amastigotas (ANTOINE *et. al.*, 1998; CHANG; DWYER, 1978).

Reis *et. al.* (2011), em um estudo avaliando a formação dos VPs em uma infecção mista (*L. amazonensis* e *L. major*), observaram que o comportamento dessas estruturas pode mudar quando o ambiente é compartilhado. Ao analisar as células infectadas por *L. amazonensis* e *L. major*, na forma promastigota, eles observaram que inicialmente ocorria a fusão dos VPs e que *L. amazonensis* proliferava, inibindo *L. major*. Essa fusão ocorria bem

mais na forma promastigota do que na forma amastigota. Sugerindo que o compartilhamento pode ocorrer de forma diferente dependendo da espécie envolvida (REIS *et. al.*, 2011).

Além da quantidade de parasitos nos VPs ser variada, os tamanhos também variam dependendo da espécie. Infecção por *L. amazonensis* produz vacúolos bem maiores que os observados nas infecções por *L. donovani* e *L. chagasi* (REAL *et. al.*, 2011). Gerard Spath *et al* (2019), em um estudo com *L. donovani*, *L. amazonensis* e macrófagos deficientes (ou não) de acidificação fagossomal, observaram que enquanto *L. donovani* sobrevivia e proliferava somente em VPs menos ácidos, *L. amazonensis* conseguia altas taxas de proliferação em VPs com pH bem ácidos, revelando que essas estruturas também podem se diferenciar conforme o estado funcional das células hospedeiras (SPATH *et. al.*, 2009; GERARD *et. al.*, 2019). Mostrando, mais uma vez, que os vacúolos são estruturas que podem se modificar e contribuir para a sobrevivência da leishmania.

## 2.5 Infecções mistas

As infecções únicas por *Leishmania* já vêm causando grande impacto, pelo número de acometidos, pelo número de espécies, bem como pela variedade de perfil de resposta que essas espécies podem desenvolver. Por isso, quando a infecção ocorre na forma mista a complexidade e a gravidade aumentam, dificultando ainda mais o controle da doença (CELESTE *et. al.*, 2017).

Infecção mista e coinfeção, são infecções simultâneas de um organismo hospedeiro por dois ou mais patógenos (NOWAK, 1995, CHAGAS *et. al.*, 2018). Entretanto, vale ressaltar que a denominação infecção mista ou infecção concomitante, está relacionada a infecção por dois ou mais patógenos do mesmo gênero e a coinfeção relacionada a infecção com patógenos de gêneros diferentes (HANSEN & DAY, 2014).

Essas definições passaram a ser bem conhecidas quando associadas aos vírus, principalmente ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Todavia, a coinfeção ou infecção mista pode envolver a ação concomitante de inúmeros organismos, como bactérias, protozoários, helmintos e fungos (KARVONEN *et. al.*, 2012; HANSEN & DAY, 2014)

Evidências de infecção mista em humanos já foram relatadas no Amazonas, onde foi descrito o primeiro caso em humanos, na presença das espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (SILVEIRA *et. al.*, 1984); no Rio de Janeiro, onde encontraram *L. braziliensis* e *L. donovani* em lesão cutânea e na medula óssea de um mesmo paciente (OLIVEIRA NETO

et al. 1986);no Quênia, onde um paciente diagnosticado com LV apresentou *L. donovani* e *L. major* na cultura de aspirado do baço (MEBRAHTU et al. 1991); Assim como, no Sudão (IBRAHIM et al., 1994); Iraque (AL-DIWANY et al., 1995); Bolívia (MARTINEZ et al., 2002); Grécia (ANTONIOU et al. 2004) e Irã (SHIRIAN et al. 2012).

Além desses registros, em outros trabalhos já foram encontradas várias evidências dessa infecção em outros hospedeiros, como caninos (Madeira et al. 2005; Silveira et al., 2011; PIRES et al., 2014; QUARESMA et al., 2011; BENETH et al, 2017; SOUZA et al., 2019), equinos (SOARES et al., 2013) e no próprio vetor (CHAJBULLINOVA et al., 2012; ALEXANDRE et al., 2020).

No entanto, mesmo que os trabalhos sobre relatos de casos tenham sua importância, estudos que analisem o comportamento das espécies e as alterações imunológicas que ocorrem nessa infecção são necessários (BABIKER et al., 2014; CELESTE et al, 2017).

Um estudo recente de infecção mista (*L. amazonensis* e *L. infantum*) experimental, utilizando o modelo hamster (*Mesocricetus ratas*), mostrou através de análises clínicas, histopatológicas e imunológicas que as infecções mistas estão associadas a manifestações clínicas mais severas. Assim como, revelou que na infecção mista, *L. amazonensis* foi detectada mais cedo, nos órgãos e isolados avaliados (pele, baço e fígado), podendo *L. infantum* está se proliferando nas células, induzindo a visceralização da *L. amazonensis* (CELESTE et al., 2017).

Em outro trabalho, a infecção mista por *L. naiffi* e *L. braziliensis*, em modelo animal, apresentou expressão de RNAm de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  na área da lesão, sendo esta última a mais abundante dentre as citocinas avaliadas. Comparada as infecções únicas pelas mesmas espécies, a infecção mista apresentou maior expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ , sugerindo que a infecção mista por *L. naiffi* e *L. braziliensis* nesse modelo hamster, levou ao desenvolvimento de uma doença mais grave, sendo evidenciada pela clínica que apresentou lesões grandes e edemaciadas, células vacuoladas (degeneração tecidual) na área de lesão e alta expressão de TNF- $\alpha$  (CHAGAS et al, 2018).

Mesmo com esses registros, a infecção mista ainda apresenta baixa notificação. E a carência de identificação mais específica das espécies, durante os diagnósticos, pode ser a causa da dificuldade em se detectar esses eventos (CHAGAS et al., 2018).

Contudo, trabalhos experimentais sobre infecções mistas têm contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessas interações, podendo elucidar

aspectos clínicos, imunológicos e relação parasito-hospedeiro. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune na infecção mista por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* em macrófagos.

# **CAPÍTULO 1**

.

### 3.ARTIGO DE REVISÃO

#### **PANORAMA DA INFECÇÃO MISTA POR DUAS ESPÉCIAS DE *Leishmania*: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Luana Caroline Santos Pinheiro<sup>abd\*</sup>, Luís Douglas Miranda Silva<sup>abd</sup>, Rafael Cardoso Carvalho<sup>acd</sup>, Flavia Raquel Fernandes do Nascimento<sup>bd</sup>, Lucilene Amorim Silva<sup>abd\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Patologia, Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966 – Vila Bacanga, 65058-805, São Luís, MA, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Patologia, Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966 – Vila Bacanga, 65058-805, São Luís, MA, Brasil.

<sup>c</sup>Centro de Ciências Agrárias e Biológicas-Universidade Federal do Maranhão Campus IV MA-230, KM 04 – Boa Vista, 65500-000 – Chapadinha, MA, Brasil.

<sup>d</sup>Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS)-Universidade Federal do Maranhão Avenida dos Portugueses, 1966 – Vila Bacanga, 65058-805, São Luís, MA, Brasil.

\*Correspondência para o autor: Lucilene Amorim Silva, Luana Caroline Santos Pinheiro. Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966 – Vila Bacanga, 65058-805, São Luís, MA, Brasil, e-mail: lucarolsp1@gmail.com lucilene.silva@ufma.br

#### Highlights

- Compilado de artigos sobre infecção mista causada por espécies de *Leishmania*
- Foram encontrados nessa busca 40 artigos com essa temática
- A produção de trabalhos sobre infecção mista por espécies de *Leishmania* é escassa
- A frequência dessa infecção pode ser bem maior do que a previamente registrada
- A presença de duas ou mais espécies de *Leishmania* em um mesmo hospedeiro influencia o curso da infecção.

## RESUMO

Infecção mista é uma infecção simultânea no qual um organismo hospedeiro é afetado por dois ou mais patógenos. Quando essas infecções ocorrem na presença de mais de uma espécie de *Leishmania*, os registros são escassos, pelo fato de os métodos de diagnósticos não serem tão específicos para identificação das espécies. Além disso, o impacto das formas únicas da doença, bem como o controle da leishmaniose, tem sido difícil, principalmente em áreas de sobreposição de espécies e das formas clínicas Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), endêmicas em vários países, a exemplo do Brasil. Por isso se faz necessário entender o comportamento da infecção quando se apresenta na forma mista. Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo realizar uma revisão narrativa, acerca da infecção mista ocasionada por duas ou mais espécies de *Leishmania*. Inicialmente procedeu-se a busca nas seguintes bases de dados: Pubmed, LILACS, Embase, Scielo, Medline e Science Direct. As palavras-chaves utilizadas foram: “Coinfecção”, “*Leishmania*”, “Leishmaniose”, “infecção mista”, “mixed infection”, “coinfection” e “Leishmaniasis”. Os critérios de exclusão levados em consideração foram: a temática abordada (trabalhos que não abordassem infecção mista causada por espécies do gênero *Leishmania*, foram excluídos) e o tipo textual (monografias, dissertações, resumos, artigos de jornais, capítulos de livros não compuseram o trabalho). Foram encontrados um total de 994 artigos, utilizando as palavras chaves e selecionados 40. Foi verificado um número expressivo de relatos de casos e identificação de espécies para a comprovação da ocorrência de infecção mista. E nos poucos trabalhos *in vitro* e *in vivo*, foi observada que é diferente a dinâmica e a proliferação, quando estão em um ambiente compartilhado. Os trabalhos que relataram a identificação de novas competências e infecção mista nos vetores, mostraram que essa característica pode contribuir para a ocorrência da infecção mista. Contudo, a revisão mostrou que as investigações sobre essa infecção ainda são escassas, mas a partir desses trabalhos foi possível constatar que a frequência desse tipo de infecção mista, pode ser bem maior do que a previamente registrada. E as espécies quando estão no meio compartilhado, podem modificar seu comportamento, levando a formas mais graves da doença. Por isso, se faz necessário uma análise mais detalhada em hospedeiros, que apresentem leishmaniose com características atípicas, bem como utilização de métodos de identificação mais precisos e estudos mais específicos, para o conhecimento dos aspectos clínicos e imunológicos dessa infecção.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose, Infecção concomitante, *Leishmania spp*

### 3.1. INTRODUÇÃO

O impacto das epidemias contribuiu para o crescente questionamento sobre a relação parasito-hospedeiro. E o avanço dos estudos possibilitou a compreensão de que essa interação pode apresentar características peculiares, como a infecção de um hospedeiro por mais de uma cepa de patógeno do mesmo gênero ou de gênero diferente. Com isso muitas infecções, que antes eram conhecidas como únicas, passaram a ser reconhecidas como mistas ou coinfeções, apresentando vários genótipos de patógenos em um mesmo hospedeiro (BALMER, 2011; LAINE, 2018).

A leishmaniose é considerada um grave problema de saúde pública. E o aumento dos casos está muito ligado as mudanças ambientais, como desmatamento, construção de barragens, esquemas de irrigação e urbanização. Segundo dados recentes, estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos e cerca de 26.000 a 65.000 mortes ocorram anualmente. Com grande impacto no Brasil, país considerado endêmico, com a incidência da infecção em 23 estados e nas cinco regiões brasileiras, principalmente no Nordeste (REBELO et. al., 2013; WHO, 2018).

É uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitida pelo inseto, denominado flebotomíneo, pertencente aos gêneros *Lutzomyia*, *Phlebotomus* (gêneros mais estudados). As manifestações clínicas são variadas, se apresentando na forma de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), causada, por exemplo, por *L. brasiliensis* e *L. amazonensis*, com características de lesões cutâneas (localizada ou difusa) e mucocutâneas. E a Leishmaniose Visceral (LV), causada pela *L. chagasi*, *L. donovani*, com característica sistêmica com hepato e esplenomegalia (WHO, 2018; REIS, 2019).

As infecções geralmente induzem uma resposta complexa, apresentando características de perfil inflamatório ou regulatório nos indivíduos dependendo da espécie envolvida (SOONG et. al, 2012). Quando a leishmaniose se apresenta de forma mista, as consequências podem ser mais graves, aumentando a intensidade e resistência da doença (SILVA et al. 2011; PIRES, 2014; CHAGAS, 2018).

Vale ressaltar, que a denominação infecção mista, está relacionada a infecção por patógenos do mesmo gênero e coinfeção relacionada a infecção com patógenos de gêneros diferentes (NOWAK, 1995; HANSEN & DAY, 2014; CHAGAS et al, 2018).

A compreensão acerca dessas infecções, foi acontecendo conforme técnicas experimentais foram evoluindo, a exemplo das ferramentas moleculares cada vez mais

disponíveis para as investigações científicas. Essa definição passou a ser bem conhecida quando associada aos vírus, porém são infecções que podem envolver a ação simultânea de inúmeros organismos, como bactérias, protozoários, helmintos e fungos (KARVONEN *et al.* 2012; HANSEN & DAY, 2014)

As infecções concomitantes na presença de parasito do gênero *Leishmania*, são bem descritas quando relacionadas ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Pois, os estudos sobre a infecção com apenas espécies de *Leishmania*, ainda são escassos e a compreensão não é clara, sobre a interação entre os parasitos. Brasil (SILVEIRA *et al.* 1984; OLIVEIRA NETO *et al.* 1986); Quênia (MEBRAHTU *et al.* 1991); Sudão (IBRAHIM *et al.* 1994) e Iraque (AL-DIWANY *et al.* 1995), foram alguns países que realizaram os primeiros estudos e relatos de casos dessas infecções mistas em humanos. Além desses registros mais antigos, em trabalhos mais recentes já foram encontradas várias evidências desse comportamento em humanos e em outros hospedeiros.

Casos de infecções por mais de uma espécie de *Leishmania* apresentam baixas notificações. É possível que a dificuldade em se detectar esses eventos, se deva pela ausência de diagnósticos práticos, que possibilitem a identificação de espécies, em hospedeiros com características atípicas ou com dificuldades na resposta aos tratamentos (CHAGAS, 2018).

Um estudo recente de infecção mista experimental, utilizando o hamster (*Mesocricetus ratus*) infectado por *L. amazonensis* e *L. infantum*, mostrou através de análises clínicas, histopatológicas e imunológicas que essa infecção está associada a manifestações clínicas mais severas, que as manifestações vistas nas infecções únicas pelas mesmas espécies (CELESTE *et al.*, 2017)

A leishmaniose na sua forma única, afeta um número expressivo da população mundial, podendo desenvolver respostas imunológicas diferenciadas. Conforme a espécie envolvida, são necessários tratamentos intensos, muitas vezes desconfortáveis para os pacientes (DORA & SOUZA, 2005; FALCI & PASQUALOTTO, 2015; MARQUES *et al.* 2019). Então, quando a infecção ocorre na forma mista a complexidade e a gravidade podem aumentar. Assim como, a dificuldade de o paciente em responder ao tratamento. Características estas, que são conhecidas por um número ainda reduzido de pesquisas (CELESTE *et al.*, 2017; CHAGAS *et al.*, 2018)

Nesse sentido, esta revisão narrativa, acerca da infecção mista causada por duas ou mais espécies do gênero *Leishmania*, tem como objetivo evidenciar o impacto e apresentar o panorama do conhecimento sobre essa infecção, com descrições e correlações dos resultados.

### 3.2. METODOLOGIA

Foi realizado um levantamento no período de março a julho de 2020, nas seguintes bases de dados: Pubmed, LILACS, Embase, Scielo, Medline e Science Direct. Utilizando as palavras-chaves: “Coinfecção”, “*Leishmania*”, “Leishmaniose”, “infecção mista”, “mixed infection”, “coinfection” e “Leishmaniasis”.

A seleção dos estudos foi realizada em etapas. Inicialmente houve a identificação dos documentos nas bases de dados. E posteriormente, utilizando o software Covidence, foi realizada a primeira triagem e exclusão de duplicidades. Adotando-se como critérios de exclusão, textos que não abordassem a temática infecção mista causada por espécies do gênero *Leishmania* e o tipo textual como: monografias, dissertações, resumos, artigos de jornais e capítulos de livros, foi feita nova seleção, após a leitura dos títulos e resumos. Terminada esta etapa, foi realizada a leitura completa dos artigos selecionados e feita a relação dos resultados e achados de cada trabalho.

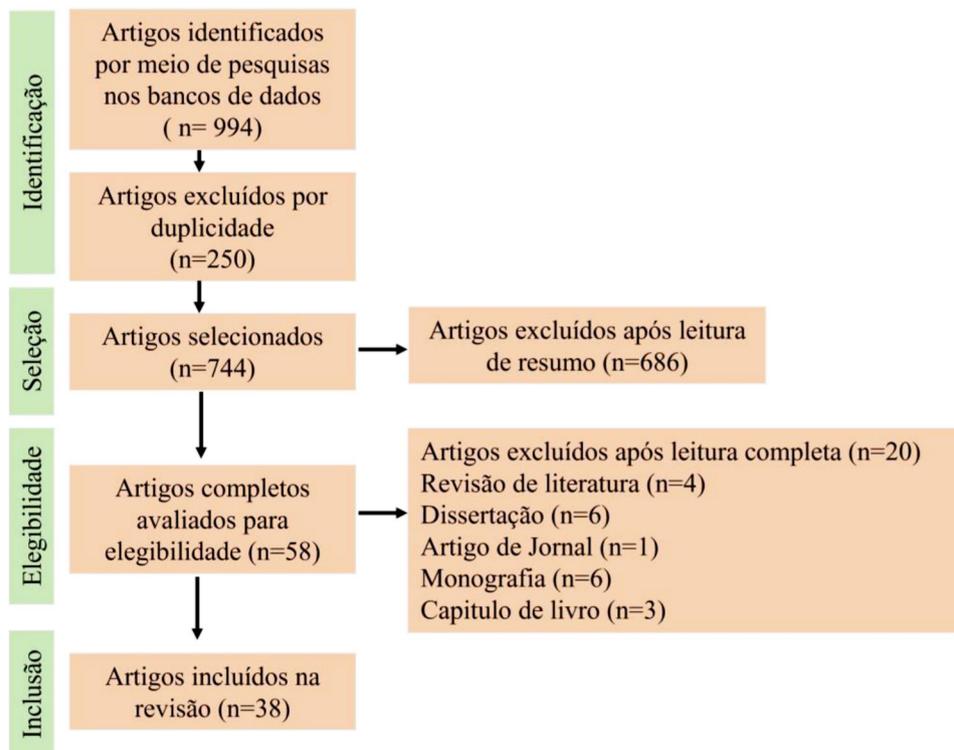


Figura 09. Fluxograma da seleção dos artigos incluídos na revisão

### 3.3. RESULTADOS

Dos 994 artigos encontrados, através das buscas utilizando as palavras chaves, foram incluídos na revisão 38.

**Tabela. 1** Lista dos trabalhos já desenvolvido sobre infecção mista.

<b>Espécies de <i>Leishmania</i> verificada em estudo</b>	<b>Tipo de trabalho</b>	<b>Autor (ano)</b>
Infecção mista <i>L. brasiliensis</i> e <i>L. amazonensis</i>	Estudo com humano. Foram feitas identificações das cepas, através do isolado de lesões, utilizando eletroforese de isoenzimas em gel de amido, infecção em hamster e cultivo em meio de cultura ágar-sangue. Foi observado que as espécies em conjunto, em um mesmo hospedeiro, podem modificar e intensificar sua ação.	SILVEIRA et. al., 1984
Infecção mista <i>L. brasiliensis</i> e <i>L. Donovanii</i>	Estudo com humano. Foi realizada a identificação das cepas através do isolado das úlceras e da medula óssea de um paciente, utilizando anticorpos monoclonais por imunofluorescência e imunoperoxidase.	OLIVEIRA -NETO et. al., 1986
Infecção mista <i>L. amazonensis</i> e <i>L. mexicana</i>	Estudo experimental. Técnicas de clonagem e equizoderma foram utilizadas para verificar a possibilidade da manutenção de mais de uma espécie de leishmania em um mesmo meio. Mostrando a presenças dos clones das duas espécies na cultura, e que nessa condição, elas podem se desenvolver e se manter no mesmo meio.	PACHECO et. al., 1989
Infecção mista com <i>L. donovani</i> e <i>L. Major</i>	Estudo com humano. Foi feita identificação das cepas, através do isolado da urina e aspirado esplênico, de um paciente com resistência ao tratamento, utilizando eletroforese em acetato de celulose, para a confirmação das espécies. Estudo descritivo	MEBRAHT U et. al., 1991
Infecção mista <i>L. donovani</i> e <i>L. aethiopica</i>	Estudo com humano. Foi feita análise e identificação das cepas, através das amostras do aspirado do linfonodo, realizando PCR com DNA cinetoplasto (kDNA) de <i>Leishmania</i> . Foi confirmada a presença da infecção mista em 5 pacientes, revelando a presença de infecção mista na região.	IBRAHIM et. al., 1994
Infecção mista <i>L. donovani</i> e <i>L. Major</i>	Estudo com humano. Foi realizada a identificação da cepa, através de isolado da medula óssea e da lesão, utilizando eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida e confirmada a presença de infecção mista na região.	AL-DIWANY et. al., 1995
Infecção mista <i>L. mexicana amazonensis</i> , <i>L. donovani DD8</i> e <i>L. infantum D2</i>	Estudo experimental. Foram utilizadas células U-937(macrófagos) e quatro cepas. A análise foi realizada em um scanner de células ativadas por fluorescência, que verificou a dominância ou exclusão das espécies.	ABDULLA H et. al., 1998

Infecção mista <i>L. major</i> , <i>L. turanica</i> , <i>L. gerbilli</i>	Estudo experimental. Os Gerbilo ( <i>Rhombomys opimus</i> ) foram infectados com <i>L. major</i> , <i>L. turanica</i> e realizada análises imunológicas, e taxa de infecção,	STRELKO VA <i>et. al.</i> , 2001
Infecção mista, <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	Estudo com humano. Foi realizada a identificação das cepas, através da amostra do isolado da lesão (com presença das duas espécies), de pacientes da Bolívia, por PCR. O resultado registrou o primeiro caso de infecção mista na região.	MARTINE Z <i>et al.</i> , 2002
Infecção mista <i>L. braziliensis</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. mexicana</i>	Estudo com humano. Novamente na Bolívia foi realizado um estudo com 29 pacientes com leishmaniose. Através das amostras de sangue e da lesão, foi feita a identificação das cepas por PCR. O resultado mostrou a presença em 8 pacientes (27,65%) de infecção mista.	BASTREN TA <i>et. al.</i> 2003
Infecção mista <i>L. infantum zymodeme MON-98</i> <i>L. infantum zymodeme MON-1</i> (cepas isoméricas)	Estudo com humano. Foi realizada a identificação por eletroforese em gel das cepas, através de amostra da medula óssea de paciente da Grécia. Foi observado que MON-98 e MON-1, demonstraram diferentes comportamentos <i>in vitro</i> e de sensibilidade ao antimoniato de meglumina, podendo esse comportamento, justificar a dificuldade do paciente em responder ao tratamento.	ANTONIO U <i>et. al.</i> , 2004
Infecção mista <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i>	Estudo com animal. Foi realizada identificação por PCR, das cepas, através dos isolados do sangue e linfonodo de cães do Rio de Janeiro. Foi registrado, nesse estudo, o primeiro caso no estado de cães com infecção mista.	MADEIRA <i>et. al.</i> , 2006
Infecção mista <i>L. amazonensis</i> e <i>L. Major</i>	Estudo experimental. Foi realizada a infecção mista em macrófagos e analisada a formação de vacúolos parasitóforos. As análises constataram a ocorrência do compartilhamento dos vacúolos na forma promastigota bem mais, que na forma amastigota no grupo de infecção mista. Os mecanismos permanecem desconhecidos, sugerindo que essas estruturas podem se modificar em culturas compartilhadas.	REAL <i>et. al.</i> , 2010
Infecção mista, <i>L. infantum</i> e <i>L. braziliensis</i>	Estudo com animal. Foram utilizados 72 roedores, 25 marsupiais e 98 cães domésticos, de Minas Gerais. 24 desses animais foram positivos para leishmaniose e 2 deles apresentaram infecção mista, a identificação da cepa foi realizada por PCR.	QUARESM A, <i>et. al.</i> 2011
Infecção mista <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. naiffi</i>	Estudo com humano. Através da análise de anticorpos monoclonais das amostras de 209 pacientes de Manaus, por imunofluorescência, foi observado que 29 (14%) desses pacientes apresentaram infecção mista. Ocorrência justificada pela sobreposição dessas espécies na região.	COELHO <i>et. al.</i> , 2011.
Infecção mista <i>L. tropica</i> e <i>L. major</i>	Estudo com humano. Foi realizada a identificação das cepas por PCR, de isolados de lesões oro nasais, de pacientes do Irã, para a confirmação da infecção mista. Apresentando mais uma vez incidência de infecção mista na região.	SHIRIAN <i>et. al.</i> 2012
Infecção mista <i>L. turanica</i> e <i>L.</i>	Estudo com vetor. <i>Phlebotomus papatasi</i> é um vetor da Leishmaniose, competente para <i>L. major</i> , que nesse estudo demonstrou competência para <i>L. turanica</i> . Os vetores foram infectados com as duas espécies. As análises	CHAJBUL LINOVA

<i>Major</i>	foram feitas com citometria de fluxo combinada com microscopia imunofluorescente. Resultado que evidenciou a nova competência do vetor.	et. al. 2012
Infecção mista <i>L. infantum</i> ( <i>selvagem</i> ) e <i>L. infantum</i> (PP75)	Estudo experimental. Os Hamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> ), foram infectados com as duas espécies. Foi realizada técnica de PCR para a identificação da cepa e da carga parasitária. Os resultados mostraram que a cepa selvagem demonstrou maior taxa de infecção que a cepa (PP75). O trabalho também descreveu os benefícios do qPCR na quantificação do parasitismo em um modelo de hamsters.	MOREIRA et. al. 2012.
Infecção mista <i>L. braziliensis</i> / <i>L. lainsoni</i>	Estudo com humano. Paciente, do Peru, apresentando característica atípica de leishmaniose, foi submetido a identificação de cepas por PCR, através do KDNA (cinetoplasto) de <i>Leishmania</i> . E como resultado apresentou infecção mista. Até o presente trabalho se desconhecia que o Peru era endêmico para <i>L. lainsoni</i> .	VELAND et. al., 2013
Infecção mista <i>L. infantum</i> <i>Leishmania braziliensis</i>	Estudo com animal. Primeiro estudo que descreveu a ocorrência de caso de Leishmaniose e de infecção mista em cavalos ( <i>Equus caballus</i> ), na região de Belo horizonte. A identificação das cepas foi realizada por PCR através das amostras da lesão e medula óssea.	SOARES et. al. 2013
Infecção mista <i>L. donovani</i> / <i>L. Major</i>	Estudo com humano. Foi realizada a identificação das cepas em amostras do sangue, medula e linfonodo, através de PCR, foi observado a presença de mais de uma espécie nas amostras de pacientes do Sudão. E registrada, mais uma vez, a ocorrência de infecção mista no país.	BABIKER et. al. 2014
Infecção mista <i>L. major</i> e <i>L. tropica</i>	Estudo com humano. Foi realizado o diagnóstico, por meio de análises moleculares (gene sCyt b, ITS-rDNA e microssatélite) de 150 paciente, onde 102 foram positivos para leishmaniose e desse grupo 1 apresentou infecção mista por <i>L. major</i> e <i>L. tropica</i> . Em algumas amostras as amastigotas apresentaram irregularidades, sendo sugerido mais pesquisas para avaliar o comportamento desse espécies na região do Irã.	SPOTIN et. al. 2014
Infecção mista <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i>	Estudo com animal. Foi realizada a identificação das cepas, através das amostras das lesões e do baço de 17 cães, por PCR e RFLP-PCR. Foi confirmada a ocorrência de infecção mista em 2 animais. O estudo descreveu a importância das técnicas moleculares nas investigações e identificações de espécies.	PIRES et. al. 2014
Infecção mista <i>L. braziliensis</i> / <i>L. infantum</i>	Estudo com animal. Foi realizada a identificação das cepas utilizando PCR, através das amostras de sangue e medula óssea de 189 animais (62 roedores, 35 marsupiais e 92 cães). O resultado mostrou a presença de infecção mista, em 10 a 11% a mais em roedores do que em cães. Dados que evidenciaram uma prevalência de leishmaniose em roedores, ainda não vista no estado de Minas Gerais.	FERREIRA et. al. 2015

Infecção mista <i>Leishmania (V.) sp e Leishmania (L.) amazonensis</i>	Estudo com humano. Estudo descritivo transversal, com coleta de dados a partir de questionários, epidemiologia e coleta de material biológico (sangue) para análise de CD4 e CD8 por PCR. Foram analisadas amostras de 199 indivíduos. Como resultado, 4 apresentaram coinfeção HIV e desse grupo 3 apresentaram infecção mista <i>Leishmania (V.) sp e Leishmania (L.) amazonensis</i> . Evidenciando a ocorrência de 2,01% de infecção mista em conjunto com coinfeção HIV/AIDS.	SILVA et. al. 2015
Infecção mista <i>L. turanica / L. major</i>	Estudo com vetor. Foram utilizados <i>Phlebotomus papatasi e Phlebotomus salehi</i> para investigar a presença de infecção mista nos vetores. Foi utilizado PCR para a identificação das cepas e confirmação da infecção em <i>P. papatasi</i> . Esse foi o primeiro registro de <i>L. major</i> em <i>P. salehi</i> na região do Irã.	RAFIZADE H S. et. al. 2016.
Infecção mista <i>L. infantum / L. amazonensis</i>	Estudo com animal. 103 amostras de sangue periférico de cães da região de Bauru-SP foram utilizadas. Foi realizado o teste de ELISA para diagnóstico e PCR e PCR-RFLP para a identificação das espécies. Como resultado, 9 cães apresentaram infecção mista.	SANCHES et. al. 2016
Infecção mista <i>L. amazonensis e L. infantum</i>	Estudo experimental. Hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) foram infectados com <i>L. amazonensis e L. infantum</i> . Nos grupos de infecção mista, <i>L. amazonensis</i> foi detectada mais cedo que <i>L. infantum</i> nos órgãos e isolados avaliados (pele, baço e fígado), mas com <i>L. infantum</i> prevalecendo com o passar do tempo. O trabalho também sugere que em meio de cultura misto, uma espécie antes não observada pode se proliferar com o passado do tempo, além de modificar seu comportamento, quando analisado <i>in vivo</i> .	CELESTE et. al. 2017
Infecção mista <i>Leishmania, L. major ou L. tropica</i>	Estudo com animal. Foi realizado uma comparação sorológica das infecções causadas pelas três espécies de <i>Leishmania</i> , utilizando ELISA e kit de antígeno rK39 (PCR). Antígenos recombinantes, como o rK39 para a sorologia é uma ferramenta diagnóstica adicional. O estudo mostrou que o diagnóstico por ELISA, não foi tão preciso para diferenciar as espécies como ocorreu por PCR.	BENETH et. al., 2017
Infecção <i>L. major e L. amazonensis</i>	Estudo experimental. Foi realizado um ensaio <i>in vivo</i> com camundongos Che/HeJ e C57/BL, com infecção mista por <i>L. major e L. amazonensis</i> . Os resultados sugeriram que os animais apresentaram células B diferenciadas, no primeiro animal com <i>L. major</i> , as células B dificultaram a infecção com <i>L. amazonensis</i> e a clínica foi menos grave. Enquanto no segundo animal, não foi observado uma interferência das células B na infecção e a clínica se apresentou de forma mais grave.	GIBSON-CORLEY et. al., 2017
Infecção mista <i>Leishmania infantum, Leishmania amazonensis</i>	Estudo epidemiológico. Foi realizada a captura de ratos ( <i>Rattus rattus</i> ), na área urbana de Londrina (PR). Foi feita a análise por nested-PCR, a partir do sangue total dos animais. Dos 181 ratos capturados, 7 apresentaram infecção mista, trazendo evidência da urbanização dessas espécies na região.	CALDART et. al., 2017

Infecção mista <i>L. guyanensis</i> e <i>L. Amazonenses</i>	Estudo em humano. Foram utilizadas amostras de sangue, para análises imunofluorescência indireta e amostra da lesão para realização de PCR com enzimas de restrição Hae III e Ava I, para identificação das espécies. No grupo de infecção mista, as análises revelaram macrófagos vacuolados com grande número de parasitos e um perfil misto de resposta inflamatória, além de baixos níveis de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> , e de CD4 /Th1, resultando em uma mistura clínica e características imunológicas dos diferentes perfis.	GOSCH et. al., 2018
Infecção mista <i>L. donovani</i> e <i>L. tropica</i> .	Estudo em humano. Foi feita uma análise da incidência de leishmaniose em áreas de conflitos. Amostras de soro de soldados foram coletadas. 30 dos 225 soldados testado, deram positivo na sorologia (anti- <i>Leishmania</i> ) para leishmaniose. Dos 30 positivos, 3 foram diagnosticados com infecção mista, através do PCR (DNA de <i>Leishmania</i> ). Foi evidenciado que em áreas de conflitos, os soldados podem ter considerada exposição as espécies de <i>Leishmania</i> .	OBWALLE R et. al., 2018
Infecção mista <i>Leishmania infantum</i> / <i>Leishmania major</i>	Estudo em humano. Primeiro caso de infecção mista em pacientes com HIV, no Irã. Caso raro na região. Paciente apresentando célula T CD4 + em níveis baixos e lesões graves, foi submetido a biópsia de pele e exames histopatológicos (lâminas coradas) e moleculares (PCR com DNA de <i>Leishmania</i> ). As análises, confirmaram a ocorrência de infecção mista em paciente com o vírus.	BADIRZA DEH et. al., 2018
Infecção mista	Estudo em animal. Foram encontradas 2 espécies de ouriços, <i>Atelexis algirus</i> e <i>Paraechinus aethiopicus</i> , com características atípicas. Após as análises, utilizando PCR-RFLP, das amostras de sangue, baço, fígado, rins e cotonetes, foi identificada em 8 animais a ocorrência de infecção mista por <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> . Confirmando a infecção natural de <i>Atelexis algirus</i> , sendo considerado, após esse trabalho, reservatório para espécies de <i>Leishmania</i> .	SOUGUIR-OMRANI et. al. 2018
Infecção mista <i>L. braziliensis</i> e <i>L. Naiff</i>	Estudo experimental. Foram infectados hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) com as duas espécies e avaliado características imunopatológicas. Os resultados mostraram intensa presença de células vacuoladas e linfonodos com carga parasitaria alta nas infecções mistas. O grupo de infecção mista também apresentou maior expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ , sendo a justificativa para o grande dano tecidual observado e agravamento da infecção nesse grupo.	CHAGAS et. al., 2018
Infecção mista <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	Estudo com animal. Foram analisadas 349 amostras de sangue periférico de cães. ELISA, que mostraram reatividade cruzada entre essas três espécies. E posteriormente feitos nested PCR e RFLP de ampliações usando HaeIII. E dos trinta cães que deram positivo para leishmaniose, 8 apresentaram infecção mista. Mostrando que as técnicas moleculares são as estratégias eficazes para os diagnósticos mais precisos nas infecções.	SOUZA et. al. 2019
Infecção mista <i>L. infantum</i> e <i>L. braziliensis</i>	Estudo experimental. Os vetores <i>Lutzomyia longipalpis</i> e <i>Lutzomyia migonei</i> foram infectados com <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> e os parasitos marcados por diferentes fluorescências, para analisar a competição interespecífica e sua localização durante a infecção mista. Foi observado que os dois parasitos se desenvolvem sem competir no interior do vetor. Concluindo, que esses dois vetores são vetores específicos, sendo competentes para mais de uma espécie de <i>Leishmania</i> .	ALEXANDRE et. al., 2020.

### 3.4 DISCUSSÃO

A maior parte dos trabalhos realizados foram sobre relatos de caso, entretanto os poucos estudos experimentais encontrados, mostraram bastante relevância. Em muitos registros foi comumente descrito a problemática da escassez de trabalhos sobre infecção mista, causada por duas espécies de *Leishmania*, bem como a dificuldade em se detectar esses eventos, devido à ausência de diagnóstico mais específicas, para casos dessa natureza.

O primeiro relato ocorreu na Amazônia (Brasil) em 1984, com registro do primeiro caso de infecção mista em humanos por espécies de *Leishmania* (*L. braziliensis* e *L. amazonensis*), encontradas em isolados de lesões distintas de um mesmo paciente. A identificação das espécies ocorreu através da eletroforese de isoenzimas em gel de amido, incluindo também observações de comportamento e desenvolvimento em modelos animais e *in vitro*. Sugerindo que a proliferação inicial foi ocasionada pela *L. braziliensis* e que o acometimento por duas espécies em um mesmo hospedeiro pode levar ao agravamento da doença (SILVEIRA *et al.*, 1984).

Em 2011, novamente na Amazônia (Brasil), utilizando técnicas com anticorpos monoclonais (anti-leishmania) e isoenzimas, foi identificada através das amostras da lesão dos pacientes representando 14% (29/209) do total das amostras avaliadas (COELHO *et al.*, 2011). Mostrando que, somente, depois de 27 anos, foi realizado o segundo trabalho referente a infecção mista, mesmo sendo uma região de sobreposição de espécies de parasitos e de vetores.

No Rio de Janeiro (Brasil), Oliveira *et al.* (1985) utilizando a técnica com anticorpos monoclonais (por imunofluorescência e imunoperoxidase), identificaram a presença de *L. donovani* e *L. braziliensis*, em isolados da úlcera e da medula óssea de um único paciente. No mesmo estado, Pacheco *et al.* (1990), verificaram dificuldades na classificação taxonômica de alguns dos isolados de humanos e animais, então utilizaram técnicas de clonagem de células e análise de esquizodema. E como resultado, detectaram a presença de espécie de *Leishmania*, constatando a ocorrência de infecção mista e sugerindo que não há imunidade cruzada (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1985), contestando a sugestão descrita no trabalho de Silveira *et al.* (1984), que sugeriu a ocorrência de imunidade cruzada na infecção mista.

No Quênia (África), uma análise, por isoenzimas, das amostras de um paciente em momentos distintos, revelou infecção mista por *L. donovani* e *L. major* (MEBRAHTU *et al.*, 1991). Técnica que mostrar diferentes parâmetros cinéticos e propriedades de regulação

diferentes, que proporcionou a identificação das diferentes espécies. Três anos depois no Sudão (África), amostras do aspirado de linfonodos de pacientes com leishmaniose que não respondiam ao tratamento, foram submetidas a identificação da espécie através de PCR com DNA de cinetoplasto (kDNA). E verificada a presença de *L. donovani* e *L. aethiopica* em um grupo e *L. donovani* e *L. major* em outro. Quando em cultura com mais de uma espécie, alguns trabalhos sugerem a ocorrência da sobreposição ou eliminação de uma das espécies. Pelo fato de cada espécie ter um crescimento diferenciado, ocorrendo assim uma seleção rápida, comprometendo a identificação das espécies em uma mesma amostra quando realizado o isolamento (IBRAHIM *et al.*, 1994; CELESTE *et al.*, 2017). Essa característica seletiva pode justificar a dificuldade em se detectar as infecções mistas, quando realizado testes em pacientes com características intensas que não respondem bem ao tratamento.

Discussões sobre a interação sinérgica / antagônica entre diferentes espécies de *Leishmania* são necessárias para compreender melhor a forma clínica dessas infecções. Babiker *et al* (2014), avaliaram amostras (sangue e lesão) de pacientes com diferentes manifestações clínicas, utilizando PCR direcionado ao gene do citocromo oxidase II (COII) e identificaram a infecção mista por *L. donovani* e *L. major*. Esse achado, assim como o de Antoniou *et al.* (2004), tiveram implicações importantes, em relação a escolha das técnicas de diagnóstico mais eficientes e conseqüentemente da escolha da terapia mais apropriada, para casos envolvendo infecções mistas. Técnicas mais sensíveis e específicas, como ensaios moleculares e imunológicos, são fundamentais para determinação mais precisa dos diagnósticos.

Na Bolívia Martinez *et al* (2002), identificaram por isoenzima, amostras de pacientes com Leishmaniose Cutânea (LC) difusa intensificada, de difícil tratamento, as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*. Sugerindo que o comportamento atípico dessa forma clínica estava ocorrendo pelo fato da infecção mista. Bastrenta *et al* (2003), no mesmo país, um ano depois, verificaram que dos 28 pacientes com LC ativa e um com LV, examinados e analisados por técnica de PCR, 27,6% (8 pacientes) apresentaram infecções mistas por espécies de *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. mexicana*. Veland *et al.* (2013), através de técnica de PCR-RFLP, identificaram em um mesmo paciente, no Peru, as espécies *L. braziliensis* e *L. lainsoni*, essas evidências mostraram a presença das espécies de *Leishmania* que causam as formas clínicas Cutânea e Mucosa, já bastante frequente segundo a OPAS/OMS (2019), na forma de infecção única, na forma mista na Bolívia e Peru.

Al-diwany *et. al.* (1995) no Iraque, fizeram o registro do primeiro caso de infecção mista em humanos, utilizando eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida, identificaram diferentes cepas através de isolado da medula óssea e da lesão de um mesmo paciente, confirmando o primeiro caso de infecção mista na região, justificado pela sobreposição de espécies de parasitos e de vetores no país.

Shirian *et al.* (2012), reportaram o primeiro caso de paciente com Leishmaniose Mucosa, envolvendo infecção mista no Irã. Realizada a PCR e a imunohistoquímica, a partir do material das lesões, foi identificada a presença de *L. tropica* e *L. major* nas lesões orais e nasais, respectivamente. Valendo ressaltar, que essas espécies (*L. tropica* e *L. major*) não são associadas com a forma mucosa da doença. Entretanto, neste caso de infecção mista, houve o desenvolvimento dessa manifestação clínica, nos pacientes infectados. Revelando que as espécies envolvidas nas infecções mistas, podem alterar o seu comportamento.

Novamente, o grupo do Irã identificou, a infecção mista em pacientes, através das análises filogenéticas, de mitocôndrios (*Cyt b*) e de núcleo (ITS-r DNA), com genes morfométricos. Métodos considerados mais concisos para a identificação das estirpes e das espécies de *Leishmania* envolvidas. Trazendo novas possibilidades de investigação das coinfeções e infecções mistas (SPOTIN *et. al.*, 2014).

Badirzadeh, *et. al.* (2018), registraram o primeiro caso de infecção mista com duas espécies de *Leishmania* em um paciente com HIV, identificada através de PCR-RFLP. Essa infecção mista levou a sintomas atípicos, incluindo visceralização, resistência a drogas e efeitos colaterais mais graves durante o tratamento. Com as espécies alterando seu comportamento na infecção mista, com *L. major*, espécie dermatotrópicas, visceralizando e *L. infantum*, espécie viscerotrópica, difundindo para a pele, apresentando clínicas mais complexas de difícil tratamento (Badirzadeh *et. al.*, 2018). Comportamento que foi observada no experimento *in vivo* de Celeste *et.al.* (2017). Demonstrando a importância de investigações mais específicas de pacientes assintomáticos em áreas endêmicas.

Antoniou *et. al* (2004), realizaram o primeiro registro de infecção mista na Grécia, de um paciente com LV, que não respondia ao tratamento. Foi verificado que o paciente estava infectado por mais de uma cepa de *L. infantum*, sendo uma delas pertencente ao zimodema MON-1, já encontrado no Mediterrâneo, onde o caso ocorreu e que geralmente é suscetível ao tratamento. E a outra o zimodema MON-98, raro e nunca reportada na região. As cepas exibiram diferentes comportamentos e mostraram diferentes sensibilidades *in vitro* e *in vivo*

(ANTONIOU *et al.*, 2004). Considerando os diferentes perfis de suscetibilidade das espécies de *Leishmania*, com relação aos fármacos, é possível que o que foi visto neste estudo, também ocorra em infecções mistas entre espécies, uma sendo mais resistente que a outra, podendo comprometer o tratamento. Considerando os diferentes perfis de susceptibilidade das espécies de *Leishmania* com relação aos fármacos, é possível que o que foi visto neste estudo também ocorra em infecções mistas entre espécies. Além disso, o desenvolvimento de lesões atípicas, como sinal de disseminação cutânea da leishmaniose visceral, foi observado em um paciente HIV positivo que apresentou infecção simultânea por *L. infantum* e *L. donovani* (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2011). Essa característica foi observada também no trabalho realizado no Tocantins (Brasil) em 2018, relacionada a dificuldades de diagnósticos e falhas terapêuticas, revelando por técnicas moleculares uma infecção mista com *L. guyanensis* e *L. amazonensis* nos pacientes em estudo (GOSCH, 2018).

Em outro estudo, que avaliou a ocorrência de leishmaniose em áreas de conflitos, utilizou amostras de soro de soldados, para a análise sorológica (anti-*Leishmania*) e PCR (DNA de *Leishmania*). Os resultados mostraram que, dos 225 soldados testados, 30 testaram positivos para leishmaniose e 3 pacientes foram diagnosticados com infecção mista. Evidenciando que em áreas de conflitos, os soldados podem ter considerada exposição as espécies de *Leishmania* na sua forma única e mista (OBWALLER, *et al.*, 2018).

Em trabalhos envolvendo relatos de caso, foi possível perceber que a utilização de técnicas moleculares como: reação em cadeia de polimerase (PCR), PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação), RT-PCR (em tempo real), eletroforese de isoenzimas, eletroforese em acetato de celulose, anticorpos monoclonais são essenciais para a identificação e confirmação da presença de toda a gama de espécies de parasito presentes no hospedeiro (VICTOIR *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2019). Entretanto, pelo fato dessas técnicas disporem de um alto custo e estrutura, para serem usadas de forma prática, em muitas situações não são utilizadas, acarretando uma escassez de resultados claros sobre identificação taxonômica, clínica e epidemiológica dessa infecção

Como a leishmaniose é uma doença que é transmitida através de um vetor, trabalhos que explorem mais a compreensão sobre a relação vetor e parasito são necessários para entender seu comportamento e sua competência. Isso foi observado em alguns trabalhos como o de Rafizadeh S. *et al.* (2016), que identificaram no nordeste do Irã a presença das espécies *L. major* e *L. turanica* em *Phlebotomus papatasi*. Esse vetor era considerado restrito da espécie

*L. major*, sendo capaz de suportar apenas o desenvolvimento desta espécie (DOBSON *et al.*, 2010). Entretanto, por meio de técnicas moleculares, PCR-RFLP, nested-PCR e sequenciamento foi possível identificar a ocorrência da infecção mista (RAFIZADEH *et al.*, 2016). Anteriormente Chajbullinova *et al.* (2012), comprovou a competência de *Phlebotomus papatasi* para *L. turanica*. Importantes descobertas visto que, o aumento da competência, bem como a ocorrência de infecção mista em vetores leva a um possível aumento na proliferação de infecções mistas em hospedeiros.

Em um outro estudo sobre competência e infecção mista experimental, o flebotomíneo *P. Papatasi* foi infectado por *L. turanica* e *L. major*. E os resultados mostraram que ambas as espécies podem coexistir no vetor, apresentando por vezes picos de prevalência de uma ou outra, mostrando que a manutenção de mais de uma espécie em um vetor, pode levar a competição entre elas e essa competição, pode vir a afetar a transmissão de uma das espécies. Apesar disso, casos de infecção mista não necessariamente deixariam de ocorrer, uma vez que muitas espécies de *Leishmania* são transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos, como é o caso das espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. naiffi*, que na região Amazônica são transmitidas pelos diferentes vetores: *L. whitmani*, *L. umbratilis* e *L. squamiventris*, respectivamente (SOUZA, 2019).

Casos de infecções mistas também foram observados em hospedeiros domésticos e silvestres como: caninos, felinos, equinos. Em 2005, no Rio de Janeiro, foram registrados casos de cães naturalmente infectados pelas espécies *L. braziliensis* e *L. chagasi*, identificadas, a partir de amostras de sangue, por análise de PCR seguido de hibridização molecular (MADEIRA *et al.*, 2005). Bem como em outros relatos (SILVEIRA *et al.*, 2011; QUARESMA *et al.* 2011; PIRES *et al.* 2014; BAMOROVAT *et al.* 2014; BENETH *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019) que também realizaram estudos de casos em animais e utilizaram técnica como PCR, ELISA, Imunofluorescência para a identificação das espécies.

No ano de 2011, em um outro estudo de caso realizado na área urbana de Belo Horizonte (Brasil), área endêmica para leishmaniose, foi registrada infecção mista em cães domésticos (QUARESMA *et al.*, 2011) e três cavalos (*Equus caballus*) ((SOARES *et al.*, 2013) pelas espécies *L. braziliensis* e *L. infantum* (espécies responsáveis por LC e LV no Brasil respectivamente), identificadas por PCR. Análises mais minuciosas em hospedeiros intermediários, utilizando técnicas moleculares, como PCR, nested-PCR, RFLP-PCR,

imunofluorescência, têm mostrado serem estratégias bem mais eficazes para a vigilância epidemiológica em áreas endêmicas.

A identificação de casos de infecção mista é importante tanto em humanos, quanto em cães, roedores, equinos, entre outros hospedeiros, pois têm implicações relevantes para o controle da doença em áreas urbanas. Ferreira *et al.*, (2015) ao identificarem em roedores *M. musculus* e *R. Rattus* a infecção mista (*L. braziliensis* e *L. infantum*), utilizando nested-PCR e sequenciamento. Registro importante, visto que são espécies de animais que têm se mostrado frequentes na cidade, onde ocorreu o estudo

Pasa *et al.* (2015), realizaram uma investigação sobre infecção mista em gatos na Turquia, utilizando como método ELISA e PCR. E os resultados revelaram que a identificação das espécies de *Leishmania* é essencial para o entendimento epidemiológico da infecção em gatos, pois os sinais clínicos avaliados isoladamente não são indicativos de leishmaniose em gatos, como ocorre em cães. Em um outro estudo de caso no mesmo ano, também utilizando a técnica de PCR, foi identificada a ocorrência de infecção mista em amostras de cães da cidade de São Paulo (Brasil) (GUIMARAES *et al.*, 2016).

É possível observar nos trabalhos já citados, a importância da identificação mais minuciosa das espécies envolvidas na infecção, bem como a necessidade em se desenvolver trabalhos que explorem a relação do parasito com os hospedeiros. Assim como, a interação parasito com vetor, pois é através do vetor que ocorre a transmissão. Por isso, a necessidade em desenvolver trabalhos que realizem essas análises e respondam esses questionamentos.

Na maioria dos ensaios, são utilizadas técnicas específicas para a identificação de espécies. Métodos que facilitam e proporcionam melhores diagnósticos, não só nas infecções por *Leishmania*. Beneth *et al.* (2017), ao realizarem a identificação de infecção mista (*L. infantum* e *L. tropica*) em amostras de sangue e lesões de cães, compararam os métodos padrões utilizados. E observaram que as técnicas de PCR, PCR RFLP, são bem mais precisas, que a sorologia por ELISA, com o antígeno de promastigota, para distinguir as espécies de *Leishmania* envolvidas nas infecções caninas (BENETH *et al.*, 2017).

Na Tunísia Souguir-Omrani *et al.* (2018), identificaram a ocorrência de infecção mista por *L. major* e *L. infantum* em ouriços (*Paraechinus aethiopicus* e *Atelerix algirus*), através de análises de PCR (DNA de *Leishmania*). Foi observada que uma pequena parcela apresentava lesões, enquanto a maioria era assintomático. Importante dado, pois é o primeiro registro de infecção mistas identificadas nessa espécie, que é reservatório para *Leishmania*

(SOUGUIR-OMRANI *et. al.*, 2018).

Souza *et al.* (2019), analisaram amostras de cães com leishmaniose e verificaram a presença de animais com infecção mista por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Inicialmente foram realizados testes de sorologia(anti-*Leishmania*), que demonstraram reatividade cruzada entre as espécies, enquanto o diagnóstico por PCR (DNA *Leishmania*) permitiu alta sensibilidade e identificação das espécies (SOUZA *et. al.*, 2019). Esses achados destacaram a importância de estudos epidemiológicos mais abrangentes, uma vez que o perfil de transmissão das leishmanioses pode estar mudando, pelo fato de alguns vetores serem mais competentes para mais de uma espécie de *Leishmania*.

Durante a compilação dos artigos, foi possível observar a escassez de trabalhos experimentais envolvendo infecção mista. Abdullah *et. al.* (1998), realizaram o primeiro trabalho *in vitro* na Alemanha, com células U-937(macrófagos) e quatro cepas (*L. mexicana amazonensis*, *L. donovani* DD8 e *L. infantum* D2) realizaram uma análise utilizando um scanner de células ativadas por fluorescência, que o grupo acreditava ser uma metodologia eficaz para a avaliação das amastigostas e promastigotas em cultura. Em seus resultados observaram que a dominância ou exclusão de uma espécie não ocorre, se a infecção com a segunda cepa acontecer após 3 horas (ABDULLAH *et. al.*1998). Todavia, a percepção sobre as infecções mistas e coinfeções nesse ano ainda eram mínimas.

Strelkova *et. al.* (2001), ao avaliar a característica de dominância das espécies, em um ensaio *in vivo*, observaram que pode haver alteração na dinâmica de transmissão de determinada espécie, nos casos de infecção única por *L. major* e *L. turanica*, podendo manter-se na pele de gerbil (*Rhombomys opimus*), seu hospedeiro natural, por até seis meses. E quando essa infecção se apresenta de forma mista, pode haver uma persistência de até 18 meses, favorecendo a manutenção da *L. major* (STRELKOVA *et. al.*,2001). Indo de encontro aos achados de ABDULLAH *et. al.*1998.

Em relação aos trabalhos que apresentaram investigações sobre aspectos imunológicos, Gibson-Corley *et. al* (2017), ao realizar infecção mista por *L. major* e *L. amazonensis* em camundongos Che/HeJe C57/BL com infecção mista por *L. major* e *L. amazonensis*. Observaram que os animais apresentaram células B diferenciadas. Quando realizada infecção no primeiro animal com *L. major*, as células B dificultaram a infecção com *L. amazonensis* e a clínica foi menos grave. Enquanto no segundo animal, não foi observado uma interferência das células na infecção e a clínica se apresentou de forma mais grave. O trabalho mostrou

uma influência das células B e conseqüentemente do perfil imune do hospedeiro no controle da infecção (GIBSON-CORLEY *et al.*, 2017). Revelando que além das diferentes espécies, os diferentes perfis do hospedeiro, Th1 (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , ROS) ou Th2(IL-10, TGF- $\beta$ ), têm grande influência na resposta imune frente a infecção. Entretanto, se faz necessário a compreensão sobre a participação das células B na resposta imune na infecção mista por leishmania (SCORZA *et al.*, 2017; COELHO *et al.*, 2018).

O arsenal imunológico envolvido na resposta contra a leishmaniose é grande. As diversas subpopulações de células T CD4 (Th1, Th2, Th17 e T regulatórias) guiam a patologia para tipos distintos de resposta imunológica e manifestações clínicas. Dessa forma, a determinação do desfecho da doença vai depender de fatores que incluem, a atuação do sistema imune do hospedeiro e a uma série de características e habilidades do parasito (FOWELL, 2009; ANVERSA *et al.*, 2018).

Em um outro estudo de infecção mista experimental, utilizando o modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com *L. amazonensis* e *L. infantum*, mostrou por análises histopatológicas (laminas da lesão), imunológicas (imunofluorescência) e moleculares( PCR e sequenciamento), que as infecções mistas estão associadas a manifestações clínicas mais graves, que as infecções únicas pelas mesmas espécies, com *L. amazonensis* responsável por esplenomegalia precoce, lesões de pele no local do inóculo, lesões disseminadas e detecção mais acelerada e com *L. infantum* podendo prevalecer com o passar do tempo (CELESTE *et al.*, 2017).

Recentemente um estudo sobre os vetores, avaliou comportamento de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia migonei*, quando infectado com mais de uma espécie de *Leishmania*. Foi observado que ao realizar a infecção, os parasitos se desenvolviam e não competiam entre si, o que levou a classificar os vetores em duas categorias: vetores específicos, a exemplo *Phlebotomus papatasi*, que permitia o desenvolvimento de uma ou duas espécies de parasitos intimamente relacionados. E vetores permissivos, que suportavam infecções experimentais por uma gama de *Leishmania spp.* *L. migonei*, foi considerado um vetor permissivo para uma variedade de espécies como: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, que proliferaram, durante os três dias iniciais, crescendo de forma semelhante, mas com *L. infantum* a apresentando maior taxa de infecção nos vetores e uma proliferação significativamente mais rápida (ALEXANDRE *et al.*, 2020).

São bem relevantes os estudos que avaliam o desenvolvimento de duas espécies de

parasitos, que causam formas diferentes de leishmaniose em um mesmo vetor. Pois, a leishmaniose necessita do vetor para se disseminar e as novas competências podem contribuir para o aumento da ocorrência das infecções únicas e infecções mistas

### 3.5. CONCLUSÃO

A revisão trouxe a percepção de que as infecções mistas, ocasionadas por diferentes espécies de *Leishmania*, estão presentes nos vetores e hospedeiros. Mas, ainda são escassos os trabalhos envolvendo essa temática. Os trabalhos compilados, evidenciaram, a importância das técnicas moleculares nos diagnósticos e identificações de espécies. Além de trazerem informações sobre as alterações de comportamento (viscerotrópicas e dermatópicas), proliferação desigual e compartilhamento de estruturas (vacúolos parasitóforos) pelas espécies na infecção mista, características que podem levar ao agravamento e dificuldade no controle da infecção.

Entretanto, ainda existem muitos questionamentos, qual perfil da resposta imune é desenvolvido na infecção mista? Qual a atuação das células B na infecção mista? O que leva as espécies em meio compartilhado a promover um agravamento da infecção? Qual a participação dos vacúolos parasitóforos na resistência das espécies na infecção mista? Sendo necessário mais esclarecimento sobre as alterações do comportamento das espécies, curso clínico e a resposta imunológica, relacionadas a essa infecção.

Por isso, estudos que analisem esses parâmetros, ainda desconhecidos, são importantes, pois a leishmaniose é uma doença endêmica em grande parte do mundo e sua forma mista pode ser uma das causas do aumento da sua morbidade e letalidade.

### REFERÊNCIA

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

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

ALEXANDRE, J., SADLOVA, J., LESTINOVA, T, 2020. **Infecções experimentais e coinfeções por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* em duas espécies de mosca da areia, *Lutzomyia amigonei* e *Lutzomyia longipalpis***. Scientific Reports.

ALVES SOUZA N, SOUZA LEITE R, DE OLIVEIRA SILVA S, 2019. **Detection of mixed Leishmania infections in dogs from an endemic area in South eastern Brazil.** Acta Trop.

ALVES SOUZA N, SOUZA LEITE R, DE OLIVEIRA SILVA S, 2019. **Detection of mixed Leishmania infections in dogs from an endemic area in South Eastern Brazil.** Acta Trop.

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

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

BADIRZADEH, A.; MOHEBALI, M.; SABZEVARI, S.; GHAFPOORI, M, 2018 **Case Report: First Coinfection Report of Mixed *Leishmania infantum*/*Leishmania major* and Human Immuno deficiency Virus–Acquired Immune Deficiency Syndrome: Report of a Case of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Iran.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

BALMER, O., M. TANNER, 2018. **Prevalence and implications of multiple-strain infections.** Lancet Infect. Dis.

BAMOROVAT M.; SHARIFI I.; ALI MOHAMMADI M.; FASIHI HARANDI M.; MOHEBALI M.; MALEKPOUR AFSHAR R.; BABAEI Z.; ZIAALI N.; AFLATOONIAN MR. 2014. **Leishmaniose visceral canina em Kerman, sudeste do Irã: um estudo soropidemiológico, histopatológico e molecular.** Iranian Journal of Parasitology,

BASTRENDA B, 2003. **Human mixed infections of *Leishmania spp.* and *Leishmania Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 98 (2), p. 255-264.

CELESTE, JORDANNA LUÍZA DE LIMA; MOURA, ANA PAULA VENUTO MOURA, FRANÇA-SILVA, JOÃO CARLOS, 2017. **Experimental mixed infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*).** Cambridge University Press.

CHAGAS, B. D, 2018. **Resposta Imunopatológica de Hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos à Infecção Mista por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) naiffi*,** Semantic Scholar, Biologia.

CHAJBULLINOVA, A., VOTYPKA, J., SADLOVA, J, 2012. **Desenvolvimento de *Leishmania turanica* em moscas da areia e competição com *L. major*.** Vetores de parasitas.

CHISTIAKO, D. A.; MYASOEDOVA V. A. , REVIN, V. V. , OREKHOV, AN; COELHO L, 2011. **Characterization of *Leishmania spp.* causing cutaneous leishmaniasis in Manaus,**

**Amazonas, Brazil.** Parasitol. Res., v. 108, p. 671-677.

COELHO, L. I. C.; PAES, M.; GUERRA, J. A.; AUGUSTO, J.; BARBOSA, M. G.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M. E.; BRANDÃO-FILHO, S. P., 2011. **Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil** Parasitol Res.

HANSEN, J.; DAY, T., 2014. **Coinfection and the Evolution of drug resistance.** Journal of evolutionary biology.

FERREIRA EDE C, CRUZ I, CAVALCANTE C, 2015 **Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World.** BMC Vet Res.

GOSCH, C. S.; RESENDE, B. S.; AMORIM, C. B.; MARQUES, C. P.; PEREIRA, L. I. A.; PINTO, S. A.; ULIANA, S. R. B.; COELHO, A. C.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M. L., 2018. **Case Report: Atypical Cutaneous Leishmaniasis in a Patient with Mixed *Leishmania guyanensis* and *Leishmania amazonensis* Infection.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*

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

KARVONEN A, SEEHAUSEN O, 2012. **The role of parasitism in adaptive radiations - when might parasites promote and When might They constrain ecological speciation?** International Journal of Ecology.

KATHLEEN VICTOIRE, SIMONNE DE DONCKER, LEYDA CABRERA, EUGENIA ALVAREZ, JORGE AREVALO, ALEJANDRO LLANOS-CUENTAS, DOMINIQUE LE RAY, JEAN-CLAUDE DUJARDIN, 2003. **Identificação direta de espécies de *Leishmania* em biópsias de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.** *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*

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

LAINÉ, ANNA-LIISA; MALINEN, HANNU, 2018. **Life-history correlations change under coinfection leading to higher pathogen load.** Evolution letters 2-2.

MADEIRA M, 2006. **Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil.** Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hyg., v. 100(5), p. 442-445.

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

andHygiene.

MAROLI, M, 2013. **Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern.** Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 27, p. 123-147.

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

MUXEL, S. M, 2017. **Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection.** *Front Microbiol.*

NOWAK, A MAY; MARTIN, ROBERT, 1995. **Coinfection and the Evolution of Parasite Virulence** Proceedings. Biological Sciences . The Royal Society.

NOWAK, MA e RM May, 1994. **Superinfecção e evolução da virulência do parasito.** Proc. R. Soc. B Biol. Sci.

OBWALLER AG, KÖHSLER M, POEPPL W, 2018. ***Leishmania* infections in Austrian soldiers returning from military missions abroad: a cross-sectional study.** Clin Microbiol Infect.

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

OMRANI, H. S.; CHEMKHI, J.; MILI, A. F.; AOUN, Y. S. B.; HADJ-ALI I. B., GUIZANI, I.; GUERBOUJ, S, 2018. ***Paraechinus aethiopicus* (Ehrenberg 1832) and *Atelerix lagurus* (Lereboullet 1842) hedgehogs: Possible reservoirs of endemic leishmaniasis in Tunisia.** Science Direct.

PASA, S. TETIK VARDARLI, A., EROL, N., KARAKUS, M., TOZ, S., ATOSOY, A., BALCIOGLU, C., EMEK TUNA, G., EMIS, O.V., ERTABAKLAR, H., OZBEL, Y, 2015. **Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey.** Vet Parasitol.

PEREIRA SA, 2006. **Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro.** Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

PETTETT C, W MACDONALD D, AL-HAJIRI A, AL-JABIRY H, YAMAGUCHI N, 2020. **Characteristics and Demography of a Free-Ranging Ethiopian Hedgehog, *Paraechinus aethiopicus*, Population in Qatar.** Animals (Basel).

PIRES MQ, MADEIRA MF, BITTENCOURT VP, PACHECO RS, 2014. **Cutaneous and visceral leishmaniasis coinfection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil:**

**evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

QUARESMA, P. F., RÊGO, F. D., BOTELHO, H. A., DA SILVA, S. R., MOURA, A. J., NETO, R. G. T., 2011. **GONTIJO, C. M. F. F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

RAFIZADEH, S.; SARAEI, M.; ABAEI, M. R.; OSHAGHI, M.A.; MOHEBALI, M.; PEYMANI, A.; NASERPAOUR-FARIVAR, T.; BAKHSHI, H.; RASSI, YAVAR, 2016. **Molecular Detection of *Leishmania major* and *L. turanica* in Phlebotomus papatasi and First Natural Infection of *P. salehit* *L. major* in North-East of Iran.** J. Arthropod-Borne Dis., v.10.

REIS, L.L., 2019. **Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014.** Cad. Saúde Pública, v. 35, n. 1, p. 1-14.

ROSSI, M. & FASEL, N. **How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions.** Int Immunol 30, 2018.

SANCHES, LETÍCIA DA CRUZ; MARTINI, CLEBER COSTA DE; NAKAMURA, ALEX AKIRA; SANTIAGO, MARIA EMÍLIA BODINI; DOLABELA DE LIMA, BEATRIZ; LIMA, VALÉRIA MARÇAL FELIX DE, 2016. **Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control / Infecção natural por *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* e suas implicações para o controle da doença.** Revista Brasileira de Parasitologia.

SANTOS-OLIVEIRA J, 2011. **Atypical Lesions as a Sign of Cutaneous Dissemination of Visceral Leishmaniasis in a Human Immunodeficiency Virus–Positive Patient Simultaneously Infected by Two Viscerotropic *Leishmania* Species.** Am. J. Trop. Med. Hyg.

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

SILVA, L. A., 2011. **Aspectos da Leishmaniose Visceral Canina: epidemiologia, sorologia e novas perspectivas de tratamento.** 117 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Fiocruz, Salvador.

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

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

SPOTIN, A.; ROUHANI, S.; PARVIZI, P, 2014. **The Association of Leishmania major and Leishmania tropica Aspects by Focusing Their Morphological and Molecular Features on Clinical Appearances in Khuzestan Province, Iran.** Hindawi Publishing Corporation.

STRELKOVA MV, ELISEEV LN, PONIROVSKY EN, DERGACHEVA TL, ANNACHARYEVA DK, EROKHIN PI, EVANS DA, 2001. **Mixed leishmanal infection in *Rhombomys opimus*: a key to the persistence of *Leishmania major* from one transmission season to the next.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology.

VELAND, N., VALENCIA, B. M., ALBA, M., ADAUI, V., LLANOS-CUENTAS, A., AREVALO, J., BOGGILD, A. K, 2013. **Case Report: Simultaneous Infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) lainsoni* in a Peruvian Patient with Cutaneous Leishmaniasis.** Am. J. Trop. Med. Hyg..

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis.** WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis.** WHO.

## **CAPÍTULO 2**

•

#### 4.INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas tropicais e subtropicais, causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. As suas manifestações clínicas são variadas, apresentando-se na forma de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), causada, por exemplo, por *L. brasiliensis*, *L. amazonensis*, caracterizada por lesões cutâneas (localizada ou difusa), mucocutâneas. E na forma de Leishmaniose Visceral (LV), causada pela *L. chagasi*, com característica sistêmica (WHO, 2018).

No Brasil, por ser uma região endêmica e ocorrer sobreposição de espécies de LV e LTA, o controle da transmissão e infecção torna-se bem complexo. E embora os diagnósticos sorológicos e parasitológicos, tenham facilitado a vigilância, em muitos casos a ausência da identificação das espécies impedir um controle efetivo (MADEIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011; PIRES *et al.*, 2014).

As infecções geralmente induzem uma resposta imunológica complexa, apresentando características de perfil inflamatório ou regulatório nos indivíduos dependendo da espécie envolvida, influenciando a forma clínica da doença (SOONG *et al.*, 2012). Quando a leishmaniose se apresenta de forma mista, as consequências podem ser mais graves. Infecção mista é uma infecção simultânea de um hospedeiro por dois ou mais patógenos. A compreensão da existência dessa forma de infecção foi acontecendo conforme as técnicas experimentais e ferramentas moleculares foram evoluindo (NOWAK, 1995; HANSEN & DAY, 2014; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018).

Apesar de ainda poucos reportados, os casos de infecção simultânea na leishmaniose podem levar a quadros clínicos graves e de difícil manejo. Analisar a resposta imunológica, no contexto da infecção mista, pode elucidar questões sobre o curso desse tipo de infecção

Todavia, trabalhos realizados no Brasil (SILVEIRA *et al.*, 1984; OLIVEIRA NETO *et al.*, 1986); Quênia (MEBRAHTU *et al.*, 1991); Sudão (IBRAHIM *et al.*, 1994) e Iraque (AL-DIWANY *et al.*, 1995), mostraram que a infecção com esse comportamento pode ser mais frequente. Esses primeiros estudos e relatos de casos mostraram registros mais antigos, entretanto, em trabalhos mais recentes já é possível encontrar evidências de infecções concomitantes de espécies de leishmania em humanos e em outros hospedeiros, como caninos, equinos e no próprio vetor, revelando também que a presença de duas espécies em um mesmo hospedeiro pode intensificar a infecção (BABIKER *et al.*, 2014; CELESTE *et al.*, 2017).

E para entender melhor o comportamento dos parasitos na infecção mista, é necessário compreender o perfil imunológico e a relação parasito/hospedeiro existente nesse meio e a influência desses aspectos na resistência ou suscetibilidade à infecção. Ressaltando que o equilíbrio de reações inflamatórias e regulatórias, durante a resposta imunológica, leva ao controle da infecção e o desequilíbrio frequentemente determina a taxa de sobrevivência dos parasitos (MENEZES, 2016).

O controle da infecção, está relacionado a atuação organizada das células do sistema imunológico, principalmente os macrófagos, com grande participação na resposta frente a leishmaniose. Os macrófagos possuem inúmeras funções como: fagocitose de patógenos, de células infectadas, de detritos, apresentação de antígenos, produção de diferentes citocinas, controlando muitas vezes a infecção, participando tanto da resposta imune inata como da adaptativa (SHAPOURI-MOGHADDAM *et. al.*, 2018).

Eles desempenham papel fundamental no manejo da infecção, pois, são as principais células que controlam a replicação da *Leishmania* no fagolisossomo, estrutura que se desenvolve no interior dos macrófagos. Em uma infecção com *L. amazonenses* a resposta muitas vezes é dúbia, apresentando um perfil inflamatório ou regulatório com citocinas como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), fator de crescimento transformante beta (TGF-b), interleucina 10 (IL-10), apresentando uma variedade de formas clínicas. Enquanto a infecção por *L. chagasi*, caracteriza-se por apresentar muitas vezes um perfil inflamatório com produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e reativos de oxigênio e nitrogênio, apresentando-se de forma sistêmica (AOKI, 2019).

A clínica da leishmaniose exibida no hospedeiro nas infecções com *L. chagasi* e *L. amazonensis*, pode apresentar aspectos atípicos, como: o aparecimento de lesões intensas, com características ulceradas vulcânicas, verrugosas, eczematosas, bem como desenvolvimento das lesões em regiões do corpo incomuns como: tronco, nádegas e genitais. Com infecção por *L. amazonensis*, podendo apresentar comportamento visceral e se disseminando para vários órgãos, causando mudanças patológicas similares as produzidas na forma visceral (MEIRELES, 2017). *L. chagasi*, que tem sido identificada nas lesões localizadas e tem desenvolvido características crônicas (RIBEIRO-ROMÃO *et. al.*, 2014; CELESTE *et. al.*, 2017). Vale ressaltar que em muitos casos atípicos a identificação das

espécies é ausente, levando ao questionamento se a ocorrência é de uma infecção única com características incomuns ou de uma infecção mista (CHAGAS *et. al*, 2018).

Dessa forma, no caso de infecção mista experimental com duas espécies de *Leishmania*, qual perfil de infecção será predominante? Se as duas espécies podem ser encontradas nas células do sistema fagocítico mononuclear concomitantemente, quais das cepas teriam maior infectividade? Como elas modificam a resposta imune durante a infecção *in vitro*? Portanto, entender as alterações e as particularidades que ocorrem na infecção quando se apresenta na forma mista, se faz necessário, visto que a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção influencia o curso clínico e a resposta imune. E o conhecimento dessas novas características podem levar a uma melhor estratégia de controle da doença.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo geral**

Investigar a resposta imune em macrófagos com infecção mista por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*.

### **5.2. Objetivo específico**

- Verificar a taxa de infecção das espécies na infecção única e mista por *Leishmania amazonensis* GFP e *Leishmania chagasi*
- Comparar a capacidade fagocítica de macrófagos infectados na forma única e mista por *Leishmania amazonensis* GFP e *Leishmania chagasi*.
- Analisar a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio na infecção única e mista de *Leishmania amazonensis* GFP e *Leishmania chagasi*.
- Identificar possíveis alterações no comportamento dos vacúolos parasitóforos em macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*.
- Analisar a produção de citocinas presentes no sobrenadante da cultura de macrófagos infectados na forma única e mista por *Leishmania amazonensis* GFP e *Leishmania chagasi*

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Culturas de células RAW 264.7

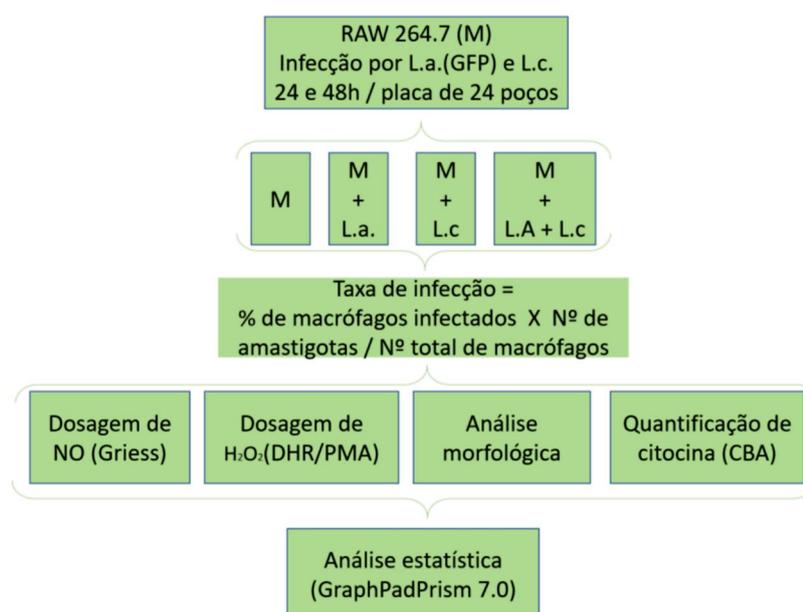
As células da linhagem RAW 264.7 foram mantidas em meio RPMI suplementado com gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB), acondicionadas na estufade CO<sub>2</sub> a 37 °C. As células foram coradas com azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer, com auxílio do microscópio óptico de luz comum e ajustadas para a concentração de 1x10<sup>5</sup> células/mL em 500ul de meio por poço (RASCHKE *et. al.*, 1978).

### 6.2. Parasito

As formas promastigotas das cepas *L. amazonensis* (MHOM/BR/1987/BA-125), marcadas com proteína verde fluorescente (GREEN FLUORESCENT PROTEIN- GFP), cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvia Uiliana do Instituto de Ciências Biomédicas (USP-SP) e *L. chagasi* (MHOM/BR/1970/BH-46), foram cultivadas em meio Schneider e M199 suplementado com 10% de SFB e acondicionadas em estufa B.O.D a 25°C.

### 6.3 Delineamento Experimental

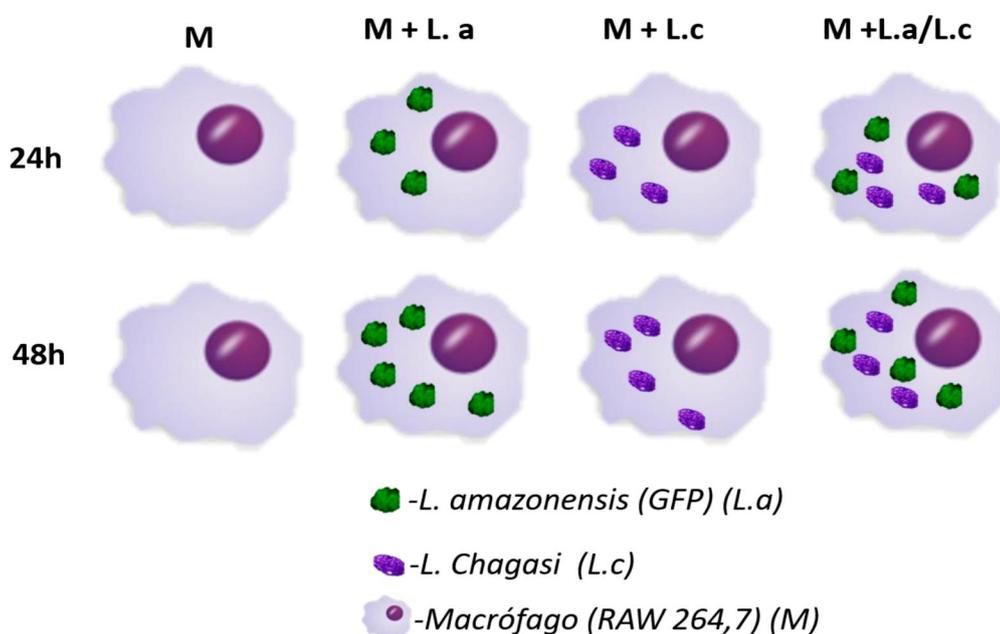
Procedimentos estão descritos no fluxograma abaixo:



**Figura 10.** Fluxograma analítico do trabalho.

#### 6.4 Infecção dos Macrófagos

Os macrófagos foram co-incubados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* GFP e/ou *Leishmania chagasi*, em placa de 24 poços na proporção de um macrófago para dez parasitos (1:10), durante 4 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados com meio RPMI-1640 para remoção dos parasitos extracelulares e novamente repostos para os fagócitos serem incubados em estufa nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 10). Os ensaios foram realizados com macrófagos que não receberam estímulo (M0).



**Figura 11.** Disposição dos grupos

#### 6.5. Avaliação da taxa de infecção de macrófagos M0

Após o período de infecção dos macrófagos na placa de 24 poços, as lamínulas presentes no fundo da placa foram retiradas, lavadas com PBS estéril e coradas com Giemsa a 10%, para análise em microscópio óptico de fluorescência, com auxílio de óleo de imersão na objetiva de 100x (ZAKAI *et. al.*, 1998; SILVA JR. *et. al.*, 2015). As lamínulas foram divididas em quadrantes e realizada a contagem de 100 macrófagos por lamínula. Desses 100 macrófagos, foi feita a contagem das amastigotas presentes no citoplasma e posteriormente realizado o cálculo da taxa de infecção utilizando a seguinte fórmula (PATRÍCIO, 2011):

$$\text{Taxa de infecção} = \% \text{ de macrófagos infectados} \times \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de amastigotas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de macrófagos}}$$

As espécies foram diferenciadas pela expressão de fluorescência presente somente nas *Leishmanias amazonensis*. Além disso, a contagem das amastigotas ocorreu no campo claro e no campo escuro do microscópio óptico de fluorescência e posteriormente realizada a diferença entre a quantidade observada em cada campo.

#### **6.6. Dosagem de NO**

Após o tempo de 24 e 48 horas, das infecções, 50µL do sobrenadante das culturas foi retirado para realização da dosagem de NO, através da adição de 50µL do reagente Griess. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 540nm (DING, 1988).

#### **6.7. Dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Para dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi retirado o sobrenadante dos poços, após 24 e 48 horas de infecção e adicionado em outra placa com o PBS. Essa placa foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em PBS, e foi adicionado o DHR (dihidrorodamina) (100nM) e posteriormente foi incubada em estufa a 37°C, por 10 minutos. Após o tempo de reação com o DHR, adicionou-se o PMA (phorbol myristate acetate) (50 nM) nos poços pré-definidos e depois a placa foi incubada novamente em estufa a 37°C por 60 min. A suspensão celular foi então lavada com PBS, centrifugada e ressuspensa em 200µL de PBS. Depois as células foram avaliadas em citômetro de fluxo, com os parâmetros de complexidade (SSC) e tamanho celular (FSC) definindo pelo *gate* de aquisição das células, no FACS Calibur (CHEN & JUNGER, 2012).

#### **6.8. Morfometria**

As lamínulas foram retiradas da placa, lavadas com PBS e enxutas delicadamente. Em seguida, foram fixadas com paraformaldeído durante 2 minutos e depois coradas com Giemsa a 10% por 10 minutos. Novamente as lâminas foram enxutas, desta vez em temperatura ambiente (protegidas contra partículas externas) por no mínimo 24 horas. Depois as lamínulas foram seladas com bálsamo do Canadá e posteriormente feita análise em microscópio óptico de fluorescência (ZAKAI *et. al.*, 1998).

No microscópio óptico de fluorescência (invertido NIKON®, modelo eclipse Ti-U) e do programa NIS-Elements advanced research (Nikon Corporation ®, Japão) foi avaliado o tamanho das amastigotas e a quantidade e área dos vacúolos parasitóforos por

grupo, com aumento de 1000x, mensurando em micrometro ( $\mu\text{m}$ ) o comprimento (L) e largura (W) dos vacúolos parasitóforos (ZAKAI *et. al.*, 1998; SILVA JR. *et. al.*, 2015).

### **6.9 Dosagem de citocinas**

Para a quantificação das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  MCP-1e TNF- $\alpha$  foi realizada a técnica de CBA, ensaio citométrico de esferas ordenadas. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do Kit (Mouse Th1/Th2/Th17 cytokine Kit) obtidos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA). O sobrenadante da cultura após a infecção dos macrófagos, foi centrifugado à 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitação de debris. Em cada poço da placa de 96 poços, fundo U, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  da amostra padrão fornecida pelo fabricante e das amostras a serem testadas. Em seguida foi colocado 25 $\mu\text{L}$  de cada reagente “cytokinebeads” para marcar a produção de cada citocina e 25  $\mu\text{L}$  de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE. Os tubos foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 3 horas protegidos da luz. Após o período de incubação as amostras foram ressuspensas com 300  $\mu\text{L}$  de solução tampão. A placa foi centrifugada por 10 minutos à 1500 rpm e o sobrenadante descartado. As amostras foram então novamente ressuspensas em 150  $\mu\text{L}$  de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACS calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

### **6.10 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com software Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para averiguar a normalidade dos dados. Em seguida, realizou-se ANOVA com pós-teste de Bonferroni para variáveis paramétricas ou o teste de Kruskal-Walis com pós-teste de Duns para variáveis não paramétricas. Em todos os casos, os resultados foram considerados significantes quando,  $p < 0,05$ . Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

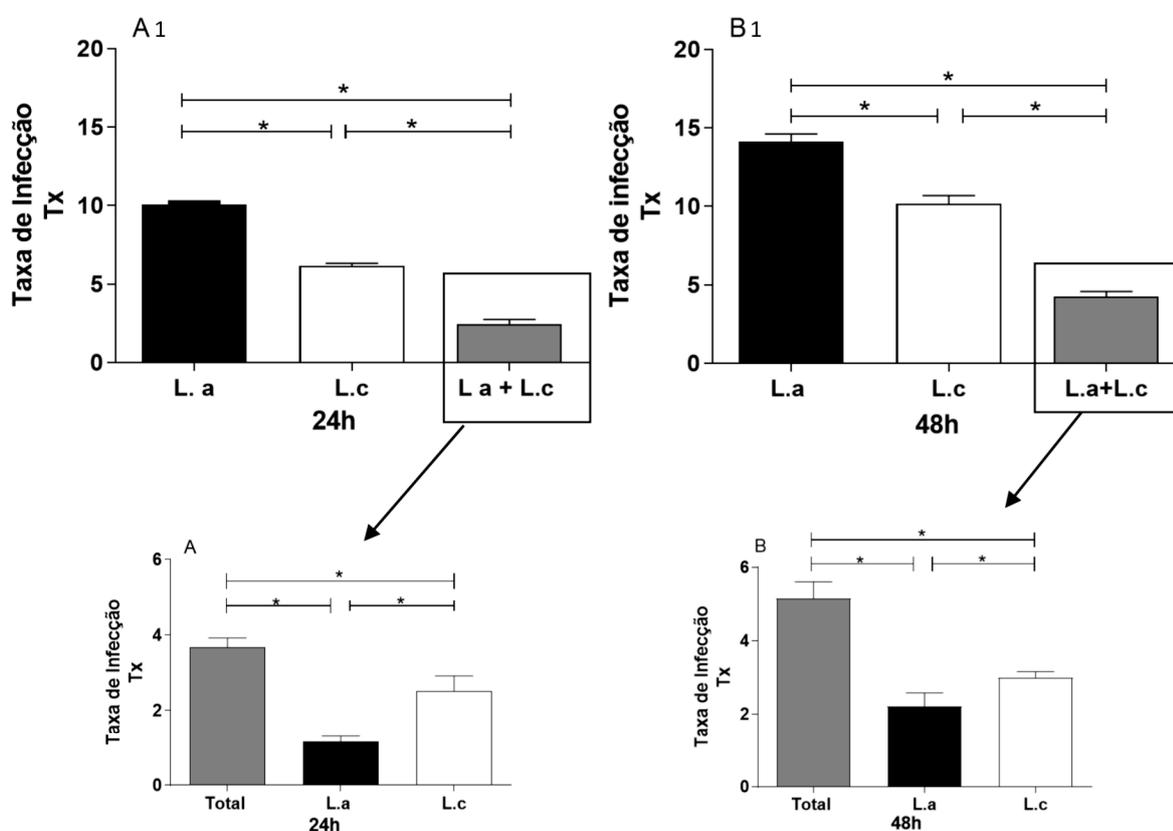
## **7. RESULTADOS**

Foram avaliadas a taxa de infecção, formação de vacúolos, produção de peróxido de hidrogênio e citocinas inflamatórias. Parâmetros importantes, pois a resposta imunológica da célula quando infectada com *L. amazonensis* se difere de quando infectada com *L. chagasi*,

característica que está relacionada com o perfil de infecção de cada espécie (HERMIDA, 2016).

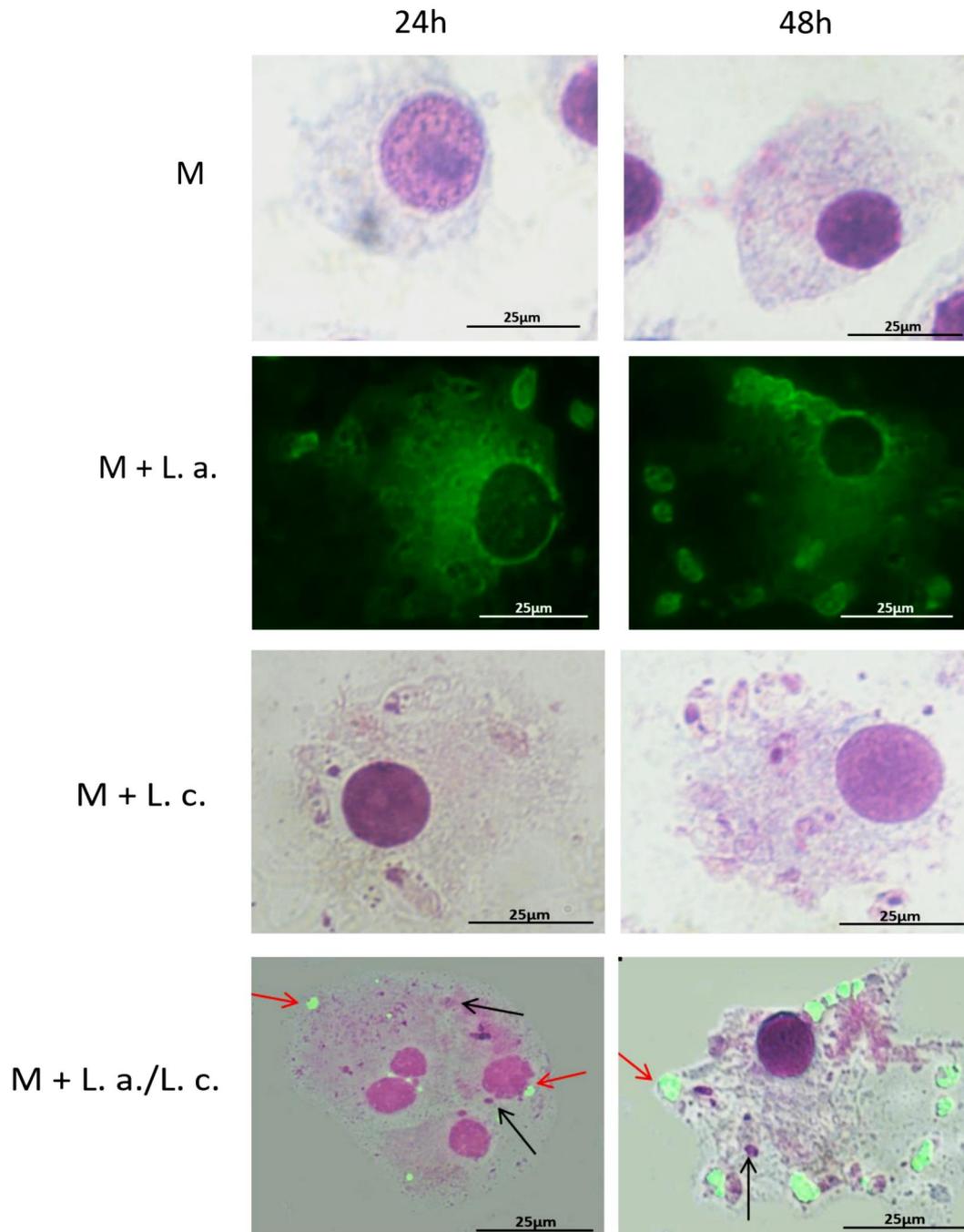
### 7.1 Taxa de Infecção de macrófagos M0

Observou-se que, no período de 24 e 48h o grupo LA (*L. amazonensis*) apresentou taxa de infecção maior que o grupo LA + LC (infecção mista). Entretanto quando avaliada a taxa de infecção na infecção mista, o grupo que apresentou maior proliferação foi LC (*L. chagasi*) diferindo do comportamento observados nas infecções únicas (LA e LC).



**Figura 12. Infecção de macrófagos por *Leishmania*:** Taxa de infecção (fórmula) de macrófagos RAW 264.7 ( $1 \times 10^5$ ). Grupos LA (infectado por *L. amazonensis*), LC (infectado com *L. chagasi*) e LA+LC (infecção mista com *L. amazonensis* e *L. chagasi*) (A1) Taxa de infecção por 24 horas. (B1) Taxa de infecção por 48 horas. (A) Taxa de infecção na infecção mista por 24 horas. (B) Taxa de infecção na infecção mista por 48 horas. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão, onde \*  $p < 0,05$ , diferença entre os grupos (Teste Kruskal-Wallis com pós teste de Duns).

## 7.2 Macrófagos RAW 264.7 infectados por *Leishmania amazonensis* (GFP) e *Leishmania chagasi*

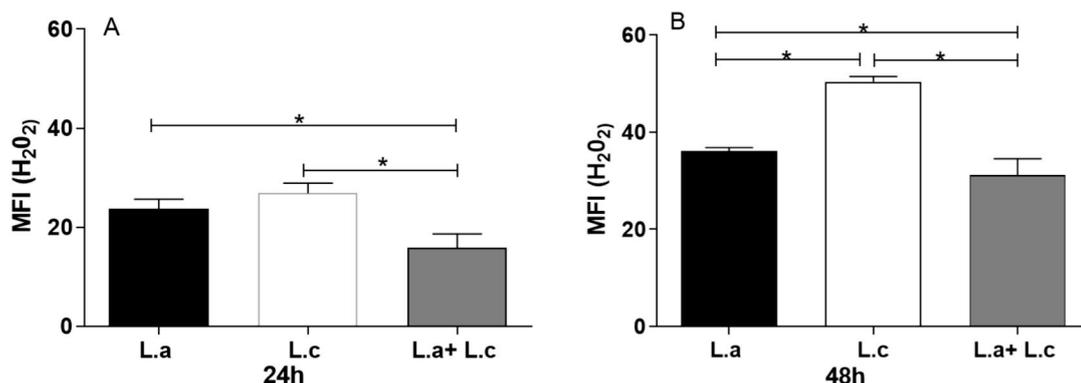


**Figura 13. Macrófagos (RAW 264.7) infectados por *Leishmania amazonensis* (GFP) e *Leishmania chagasi*. (M)** Macrófagos não infectados; **(M+L.a)** Macrófagos infectados com *L. amazonensis*; **(M+L.c)** Macrófagos infectados com *L. chagasi*. **(M+L.a+L.c)** (Infecção mista) Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Setas pretas (amastigotas *L. chagasi*) e as setas vermelhas (amastigotas *L. amazonensis*). As lamínulas foram retiradas da placa de 24 poços, coradas com Giemsa e visualizadas através do Microscópio Óptico de Fluorescência Nikon Eclipse Ti.

### 7.3 Quantificação de NO e Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em macrófagos

A produção de óxido nítrico não foi detectada no sobrenadante das culturas.

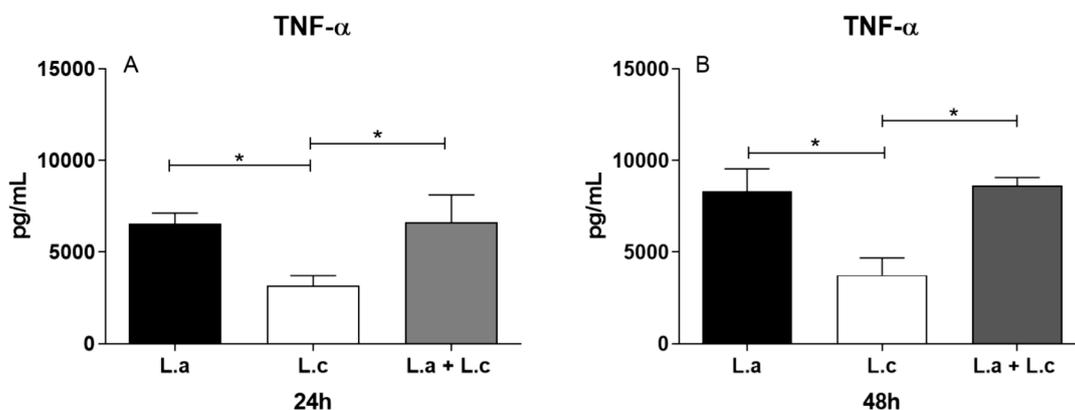
Ao avaliar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tempos de 24 e 48h, o grupo infecção mista (LA + LC) demonstrou uma produção menor, comparado aos grupos LA e LC. Mas analisando a produção em relação ao período o grupo LA+LC e grupo LC demonstraram aumento significativo.



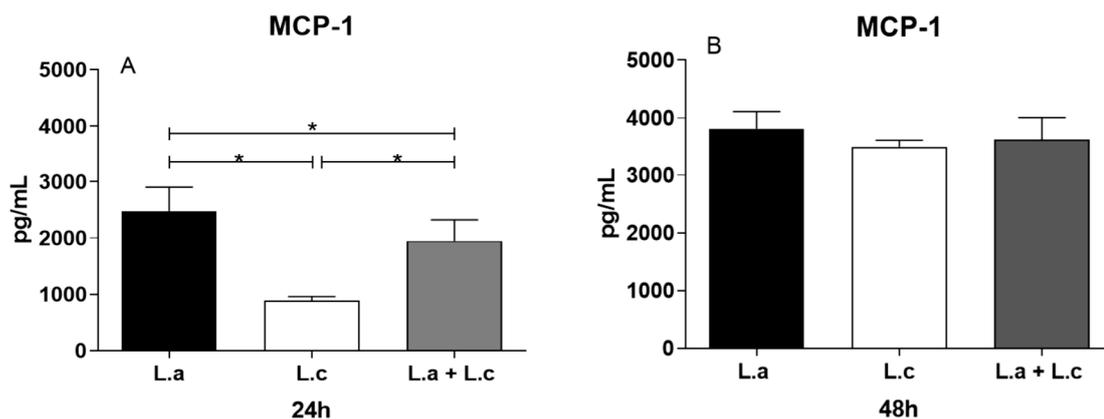
**Figura 14. Produção de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** Os macrófagos RAW 264.7 (1x10<sup>5</sup>/poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e/ou *L. chagasi* (1x10<sup>6</sup>/poço). Em seguida foram marcados via DHR para avaliação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no período de 24h. (B) Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no período de 48h. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, onde \* p < 0,05, diferença entre os grupos (Teste Kruskal-Wallis com pós teste Duns).

### 7.4 Quantificação de citocinas

A quantificação das citocinas, IL-6, IFN- $\gamma$  não foram detectadas no sobrenadante das culturas, mas a produção de TNF- $\alpha$  no período de 24h, assim como no de 48h nos grupos LA+LC e LA foram maiores comparado com o grupo LC. A produção de MCP-1 no período de 24h foi relevante na infecção mista (LA+LC) e na LA. No período de 48h todos os grupos demonstraram elevada produção da quimiocina.



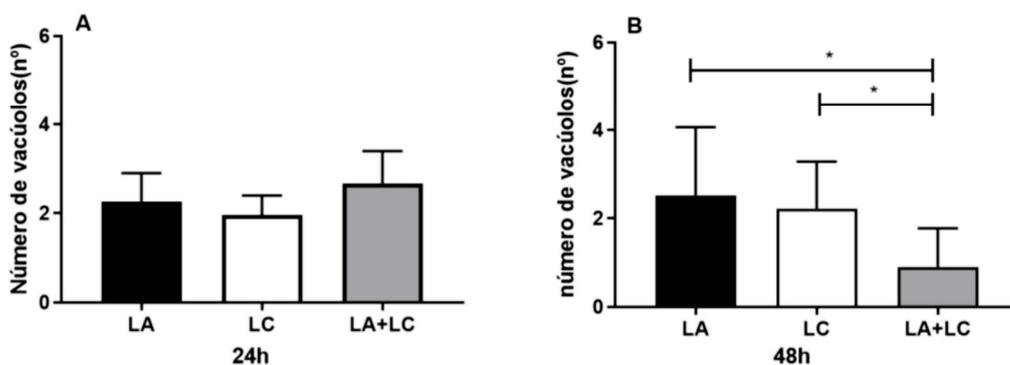
**Figura 15. Quantificação de Citocinas TNF- $\alpha$ .** Os macrófagos RAW 264.7 (1x10<sup>5</sup>/poço) foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* e/ou *L. chagasi* (1x10<sup>6</sup>/poço) em dois períodos. O sobrenadante da cultura foi utilizado para quantificação de citocinas via técnica de CBA. (A) Quantificação TNF- $\alpha$  em 24h. (B) Quantificação de TNF- $\alpha$  em 48h. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, onde \* p < 0,05, diferença entre os grupos (Teste Kruskal-Wallis com pós teste Duns).



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

### 7.5. Quantidades de Vacúolo

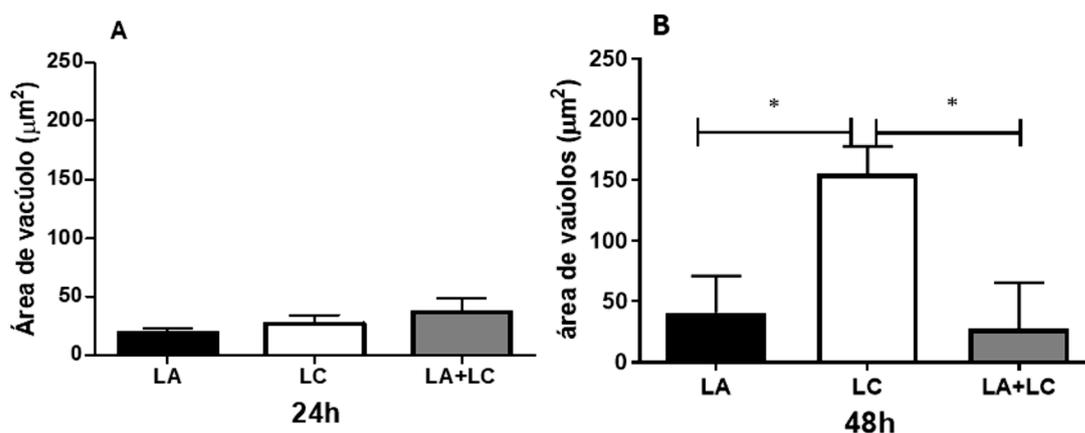
Observou-se que, não houve uma diferença quando se comparou a quantidade de vacúolos entre os grupos infectados durante o período de 24 horas. Entretanto no período de 48 horas, foi verificado que nas infecções únicas LA e LC não foram notadas grandes alterações, mas no grupo de infecção mista (LA+ LC) percebeu-se uma significativa diminuição na quantidade dessas estruturas.



**Figura 17. Quantidades de Vacúolos.** Quantidade de vacúolos apresentados nos grupos LA (RAW 264.7 infectado com *L. amazonensis*), LC (RAW 264.7 infectado com *L. chagasi*) e LA+LC (RAW 264.7 infectado com *L. amazonensis* e *L. chagasi*), em dois tempos de infecção (A) Quantidade de vacúolos no período de 24 horas (B) Quantidade de vacúolos por 48 horas. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão, onde \*  $p < 0,05$ , diferença entre os grupos (Teste Kruskal-Wallis com pós teste Duns).

### 7.6 Área de Vacúolos

Observou-se que em relação a área de vacúolos, no período de 24 horas, não houve diferença entre os grupos, entretanto, analisando o tempo de 48 horas notou-se claramente uma diferença no grupo LC em relação aos grupos LA e LA+LC, demonstrando um aumento na área dos vacúolos no grupo parasitado com *L. chagasi*.



**Figura 18. Área de Vacúolos.** Tamanho dos vacúolos parasitóforos medidos em  $\mu\text{m}^2$ , apresentados nos grupos LA (RAW 264.7 infectado com *L. amazonensis*), LC (RAW 264.7 infectado com *L. chagasi*) e LA+LC (RAW 264.7 infectado com *L. amazonensis* e *L. chagasi*), em dois tempos de infecção (A) Área dos vacúolos no período de 24 horas (B) Área dos vacúolos por 48 horas. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão, onde \*  $p < 0,05$ , diferença entre os grupos (Teste Kruskal-Wallis com pós teste de Duns).

## 8. DISCUSSÃO

Os estudos ainda são escassos e a compreensão não é clara sobre a interação entre os parasitos quando a infecção mista ocorre na presença de duas ou mais espécies de *Leishmania*. Aspectos como: relação parasito-hospedeiro e a resposta imune precisam ser elucidados. E com objetivo de avaliar a resposta imune e as alterações ocorridas na infecção dos macrófagos por *L. amazonensis* e *L. chagasi*, foram realizados testes *in vitro* e posteriormente análises de alguns parâmetros.

Após a infecção dos macrófagos pelas espécies, foi medida inicialmente a taxa de infecção (Figura 12). Ao analisar os resultados, notou-se que o grupo de infecção única LA (*L. amazonensis*) apresentou uma taxa de infecção mais elevada em ambos os tempos avaliados (24h e 48h), quando comparado com os demais grupos. Característica já observada em outros estudos que analisaram o comportamento da *L. amazonensis* e a descreveram como uma espécie que apresenta altas taxas de infecção, por modular a ação da TNF- $\alpha$  de um perfil inflamatório para um regulatório (LIU *et al*, 2014; AOKI *et al*, 2019). Também foi observado que o grupo infecção mista (LA+LC) não apresentou uma taxa de infecção tão expressiva, quando comparado ao grupo LA. Entretanto, quando medida a taxa de infecção no grupo de infecção mista, a espécie que apresentou maior taxa foi *L. chagasi*. Martinez *et. al.* (2002), em um trabalho com pacientes com infecção mista, ao realizar uma cultura com as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*, no mesmo meio, observaram uma dominância da *L. amazonensis*,

inibindo o crescimento da *L. infantum*. Mostrando que existe a capacidade de uma espécie de eliminar a outra quando estão presentes em um meio compartilhado.

Em um teste *in vivo*, realizado com hamster (*Mesocricetus ratas*), foi observado que em macrófagos infectados concomitantemente com *L. amazonensis* e *L. infantum*, a primeira espécie foi uma das responsáveis por esplenomegalia precoce, assim como por lesões de pele no local do inóculo e lesões disseminadas. Nesse caso, a visceralização da *L. amazonensis* pode estar relacionada com a busca das espécies em se estabelecer no hospedeiro, podendo *L. infantum* estar comprometendo a proliferação da *L. amazonensis* nos macrófagos, assim alterando seu comportamento (CELESTE *et al.*, 2017).

Observando o resultado da taxa de infecção na infecção mista (LA+LC), *L. chagasi*, pode estar apresentando uma taxa de infecção maior inicialmente pois, mesmo que cada espécie, na infecção única, tenha proliferação e estabelecimento diferente, o compartilhamento na célula pode modificar comportamentos vistos na infecção por uma espécie. Como *L. amazonensis* possui uma capacidade proliferativa alta na infecção única, a existência de uma competição no meio é uma característica que vale a pena ressaltar, visto que as duas espécies possuem o mesmo nicho e mesmo objetivo, proliferar e sobreviver no hospedeiro.

A ocorrência de proliferação desigual e migração e/ou eliminação de uma das espécies em culturas mistas, pode ser um fator que dificulte a identificação em procedimentos de isolamento e caracterização das infecções mistas (ABREU-SILVA *et al.*, 2004; RAFIZADEH S. *et al.*, 2016; CELESTE *et al.*, 2017).

Os macrófagos quando fagocitam os parasitos, se destacam pela variedade de mecanismos microbicidas para controlar e eliminar o agente intracelular, como: óxido nítrico (NO) e Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que são considerados um dos principais mediadores leishmanicidas (BOGDAN *et al.*, 2015).

Ao analisar o NO, não foi observado uma produção significativa. Possivelmente pelo fato de o macrófago ser M0, resultado encontrado também em um trabalho do grupo do Laboratório de Imunofisiologia (UFMA), que avaliou a produção de NO em macrófagos M0, M1, M2 e observou que a produção de NO é baixa em M0, isso pelo fato da alta capacidade do parasito em estimular a atividade do complexo inflamassomano M1 e não no M0, induzindo a produção da citocina IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que atuam no aumento da ativação e

produção de óxido nítrico nas células parasitadas (LIMA-JUNIOR *et. al.*, 2013; SILVA, 2018).

Além do NO, também foi verificada a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos macrófagos via marcação por DHR (Figura 14). Ao observar os resultados, a produção se mostrou mais expressiva nos grupos de infecção única (LA e LC) nos dois tempos. Principalmente no grupo LC, possivelmente porque a ativação dos macrófagos na LV (*L. chagasi*, *L. donovani*) ocorre via IFN- $\gamma$ , que resulta na síntese de reativos de nitrogênio e oxigênio (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e pela baixa produção dos antioxidantes pela molécula de NO. Assim não havendo o balanço redox e dessa forma, a produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) aumenta pela baixa produção de NO, que culmina no aumento da produção de EROS (WINK *et al.*, 2011, SILVA, 2018; CHISTIAKO *et. al.*, 2018).

Quando avaliado o grupo de infecção mista (LA + LC) no tempo de 48h, foi observado um aumento na produção H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparando com tempo de 24h. Santos-Pereira (2019) observou em um estudo comparativo, que a influência de *L. infantum* em relação à produção de reativos de oxigênio foi bem maior que a de *L. amazonensis*, revelando que *L. infantum* desenvolveu um perfil Th1 (inflamatório). Desse modo, sugerimos que essa produção observada no grupo de infecção mista pode estar sendo influenciada pela *L. chagasi* mais do que pela *L. amazonensis*.

Valendo ressaltar que durante o reconhecimento por receptores de membrana e consequente fagocitose do parasito, o “burst oxidativo”, via NADPH oxidase, é iniciado. Este mecanismo é de grande importância na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), onde se destaca o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que atua em componentes celulares do parasito, como proteínas e lipídios, além de causar aumento da permeabilidade da membrana e danos ao DNA, culminando na destruição da leishmania (SCOTT & NOVAIS, 2016). Entretanto, a produção exagerada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compromete a célula e para uma resposta equilibrada se faz necessário a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, que contribuem para uma regulação e reação mais eficaz da célula contra o patógeno (POLARI LP *et. al.*, 2019).

Foi realizada também a quantificação das citocinas produzidas no sobrenadante das culturas (Figura 15). As citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  não foram detectadas, apenas TNF- $\alpha$  e MCP-1. E ao avaliar a produção de TNF- $\alpha$ , foi verificada nos grupos LA+LC e LA uma produção acentuada, em comparação com o grupo LC, no período de 24 e 48 horas.

A TNF- $\alpha$  é uma citocina importante no controle de LTA e LV, atuando no equilíbrio da resposta imune. A produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, após o início da infecção, induz a ação do IFN-gama que vai promover a ativação dos macrófagos e produção de radicais livres como O<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> e as ROS (MUNIZ *et. al.*, 2016; NOVAIS *et. al.*, 2017; POLARI *et. al.*, 2019).

Essa característica dúbia da citocina é bem observada na resposta imune contra a LTA. Já foi relatado que infecções causadas por *L. amazonensis*, desenvolvem respostas imunes com presença significativa de TNF- $\alpha$ , uma das possíveis justificativas para a existência das variadas formas clínicas (NOVAIS *et al.*, 2017). Considerando o perfil de resposta desenvolvido pela *L. amazonensis* e observando que a produção dessa citocina no grupo LA+LC foi semelhante à observada no grupo LA, é possível que o aumento dessa citocina na infecção mista esteja sendo influenciada mais pela *L. amazonensis* do que pela *L. chagasi*.

A influência de TNF- $\alpha$  na infecção mista, foi observada no trabalho de Chagas *et. al.* (2018), que verificaram aspectos imunológicos e clínicos na infecção por *L. naiffi* e *L. braziliensis*. A infecção mista apresentou maior expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ , que explicou a degeneração tecidual e agravamento clínico, em modelo hamster, levando a forma mais grave da doença (presença de lesões grandes e edemaciadas), diferente da observada nas infecções únicas pelas mesmas espécies, evidenciando que na infecção mista a clínica se mostrou intensificada (CHAGAS *et. al.*, 2018).

Em relação à MCP-1, foi verificada produção expressiva no grupo LA+LC e no grupo LA no período de 24h. Já no período de 48h, a produção dessa quimiocina foi elevada em todos os grupos sem diferença estatística entre eles.

As citocinas desempenham função no recrutamento e na ativação celular de fagócitos para o sítio inflamatório, assim como a quimiocina MCP-1, que induz reativos de oxigênio intermediários ou via produção de óxido nítrico, como um possível biomarcador de cura na LTA ou favorecendo a infecção de novas células na fase aguda, principalmente em modelos *in vivo* (DUQUE & DESCOTEAUX, 2015, WANG, 2019). Como não houve uma diferença entre os grupos com relação à produção da MCP-1 e no período de 48h houve um aumento expressivo, ela não foi o parâmetro claro de avaliação da resposta na infecção mista, muito pelo fato de estar relacionada a uma variedade de papéis na resposta imune contra leishmania.

Além da regulação da resposta imunológica, que pode favorecer a sobrevivência do parasito, a leishmania desenvolve complexas estratégias que também ajudam na evasão do

sistema imune e uma dessas estratégias é o desenvolvimento das estruturas denominadas vacúolos parasitóforos (VP), que facilitam a proliferação do parasito no fagolisossomo, levando as células hospedeiras ao rompimento (DUQUE & DESCOTEAUX *et. al.*, 2015)

Nos macrófagos, os parasitos conseguem sobreviver no vacúolo parasitóforo devido a alguns mecanismos utilizados para “driblar” a atividade antimicrobiana deste hospedeiro. Esses mecanismos incluem a degradação das proteínas que medeiam o tráfico de vesículas pela GP63, interrompendo a apresentação cruzada de antígenos e a secreção de citocinas proinflamatórias (DUQUE & DESCOTEAUX *et. al.*, 2015).

A avaliação da quantidade e área dos VPs, foram parâmetros importantes, visto que é a região onde abriga as amastigotas quando são fagocitadas, favorecendo seu estabelecimento no organismo do hospedeiro (DIAS *et. al.* 2014). Observou-se que no tempo de 24h a quantidade de VPs (Figura 17) presente nos três grupos (LA, LC, LA+LC) não demonstrou diferença. Já no tempo de 48h, o grupo LA+LC apresentou uma redução na quantidade dos vacúolos, quando comparado às infecções com uma única *Leishmania* (LA e LC) (Figura 16). A redução na quantidade de vacúolos no grupo infecção mista pode estar relacionada ao compartilhamento desses vacúolos.

Real *et. al.* (2011), observaram em um experimento *in vitro* com *L. major* e *L. amazonensis*, que as espécies compartilharam os VPs na sua forma promastigota e *L. amazonensis* impediu a proliferação da *L. major*. Entretanto, quando avaliado o compartilhamento na forma amastigota não foi confirmada totalmente a fusão.

Já em outro trabalho mais recente, foi observado que existem diferenças significativas na formação desses compartimentos, induzidos por diferentes espécies de *Leishmania*. Os VPs produzidos na infecção por *L. amazonensis* são grandes e contêm uma quantidade expressiva de amastigotas, enquanto na infecção por *L. donovani* e *L. chagasi* são pequenos com poucas amastigotas (GHAGAS *et. al.*, 2018). Nesse sentido, é possível que a diminuição na quantidade dos vacúolos no grupo LA + LC, deva-se pelo fato de haver duas espécies com características de formações estruturais de VPs diferentes compartilhando a mesma célula.

Ao avaliar a área do vacúolo (Figura 18), foi possível verificar que no tempo de 24h o tamanho dos VPs nos três grupos, não demonstrou diferença significativa. Mas no tempo de 48h, foi observado que apenas o grupo LC apresentou um aumento expressivo dessa estrutura. Estudos anteriores mostraram que espécies de *L. amazonensis* e *L. mexicana* tem potencial de formação de vacúolos parasitóforos gigantes, que servem como proteção para os efeitos

leishmanicida como produção de NO e ROS (NOVAIS *et. al.*, 2016). Nesse sentido, como foi o grupo LC que apresentou uma produção expressiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é possível que o aumento na extensão dos vacúolos nesse grupo seja um mecanismo de proteção da *L. chagasi*.

Os resultados das análises demonstraram, que a relação entre as duas espécies (*L. chagasi* e *L. amazonensis*) na infecção mista, é de competição. Inicialmente como espécie *L. chagasi* apresentando maior taxa de infecção, com a produção de peróxido de hidrogênio influenciada pela *L. chagasi* e a produção de TNF- $\alpha$ , possivelmente, influenciada pela *L. amazonensis*. Revelando características diferenciadas na formação dos vacúolos parasitóforos e no compartilhamento dessas estruturas pelas espécies.

Os dados apresentados mostraram a importância de compreender o comportamento da infecção mista, pois a influência das espécies na resposta imune, no estabelecimento do protozoário no hospedeiro e no curso da infecção, ocorre de forma diferente no meio compartilhado. Por isso, investigações que analisem o comportamento das espécies, a relação parasita-hospedeiro, alterações morfológicas e imunológicas, são necessárias, pois as infecções mistas podem estar acontecendo silenciosamente, contribuindo para o agravamento e aumento da letalidade da leishmaniose.

## 9. CONCLUSÃO

- A relação das espécies, *L. chagasi* e *L. amazonensis*, na infecção mista é de competição, com elas proliferando de forma desigual, buscando se estabelecer no macrófago.
- A produção de peróxido de hidrogênio na coinfeção foi semelhante à observada na infecção única por *L. chagasi*, como essa espécie desenvolve uma resposta mais inflamatória, sugere-se que a produção do reativo na infecção mista esteja sendo influenciado pela *L. chagasi*.
- A produção de TNF- $\alpha$  se mostrou elevada na infecção única por *L. amazonensis* e na infecção mista, sugerindo que a produção dessa citocina na infecção mista esteja sob influência da *L. amazonensis*.
- A quantidade de vacúolos na infecção mista foi menor, comparada a quantidade nas infecções únicas por *L. chagasi* e *L. amazonensis*, por possivelmente estar ocorrendo o compartilhamento dessas estruturas pelas espécies.

## REFERÊNCIA

- ABDULLAH, S.M., FLATH, B., PRESBER, W. **Mixed infection of human U-937 cells by two different species of *Leishmania***. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1998.
- AL-DIWANY LJ, AL-AWKATI NA, ATIA M, RASSAM MB. **Concomitant natural infection with *L. donovani* and *L. major*: a case report from Iraque**. Journal Sozial-UndPraventivmedizin . 1995
- ALENCAR B. F. P.; FIGUEIREDO, I. A. **Epidemiological profile of American CutaneousLeishmaniasis cases in thestateof Maranhão from 2015 to 2017**. Revista de Investigação Biomédica, v.10, nº3, 2018
- ALVARENGA, D.G.; ESCALDA, P.M.F.; COSTA, A.S.V.; MONREAL, M.T.F.D. **Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados a letalidade**. Revista da SociedadeBrasileira de Medicina Tropical, 2010
- ANTONIOU M, DOULGERAKIS C, PRATLONG F, DEDET JP, TSELENTIS Y **Short report: treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite *Leishmania infantum***. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.2004.
- ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ, L. E. **Human leishmaniasis in Brazil**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- AOKI, JI, MUXEL, SM, ZAMPIERI, RA. **Modulação da resposta imune diferencial na infecção precoce por *Leishmania amazonensis* dos macrófagos BALB / ce C57BL / 6 com base em perfis de transcriptoma**. Scientific Reports, 2019
- ARIAS, J. R., NAIFF, R. D. **The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil**. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 76.1981
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Aulton Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- BABIKER AM, RAVAGNAN S, FUSARO. **Concomitant Infection with *Leishmania donovani* and *L. major* in Single Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Patients from Sudan**. Journal of Tropical Medicine.2014.
- BARDI, G.T, SMITH, M.A, HOOD, J.L. **Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization**, Cytokine v° 105, 2018
- BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDE Z, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. **The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure**. The Journal of Experimental Medicine: JEM, 2001.

BOGDAN, C. **Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update.** *Trends In Immunology*, [s.l.], v. 36, n. 3, p.161-178. Elsevier BV, 2015.

BRANDÃO-FILHO, S. P., CARVALHO, F. G., BRITO, M. EF, ALMEIDA, F. A., NASCIMENTO, L. A. **American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in "Zona da Mata" region.** *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 89.1994

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral 2017.** Brasília: Ministério da Saúde, p. 25, 2017.

CARNEIRO MBH, ROMA EH, RANSON AJ, DORIA NA, DEBRABANT A, SACKS 99 DL. **NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during Leishmania amazonensis Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis.** *J Immunol.* 2018

CASSETTA, L., CASSOL, E., & POLI, G. **Macrophage polarization in health and disease.** *The Scientific World Journal*, v. 11, p.2391-2402, 2011.

CAVALCANTI AS, RIBEIRO - ALVES M, O PEREIRA LE. **A carga parasitária induz a quebra progressiva da arquitetura do baço e prejudica a expressão do mRNA de citocinas em cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum*.** *PLoS ONE.* 2015

CELESTE, JORDANNA LUÍZA DE LIMA; MOURA, ANA PAULA VENUTO MOURA, FRANÇA-SILVA, JOÃO CARLOS **Experimental mixedinfectionof *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus ratus*).** Cambridge University Press. 2017

CHAGAS, B. D. **Resposta Imunopatológica de Hamsters (*Mesocricetusratus*) submetidos à Infecção Mista por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) naiffi*,** *Semantic Scholar, Biologia*, 2018

CHEN, Y., & JUNGER, W. G. **Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils.** *Methods in Molecular Biology*, p.115-124, 2011.

CHISTIAKO, D. A.;MYASOEDOVA V. A., REVIN, V. V. , OREKHOV, A.N. ; BOBRY SHEV , Y. V. **O impacto de fatores reguladores de interferon na diferenciação e polarização de macrófagos em M1 e M2,** *Science Direct Immunobiologia*, v 233, 2018

COELHO, V.T.S.;SILVA, J.A.; REIS,T,A.R.; FIGUEIREDO,J.E.F.; SANTORO, M. M.; COELHO,E.A.F. **Purificação de antígenos imunogênicos de *L.chagasi* por cromatografia de imunoafinidade (igg1/igg2a) anti- lrps (proteínas ribossômicas de leishmania).** *Cadernos Técnicos de Saúde da FASEH*, no 05, 2018

CONCEIÇÃO-SILVA, F., MORGADO, F.N., and COUTINHO, S.G. **A Resposta Imune a Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa.** In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. *Leishmanioses do continente americano* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, pp. 357-379. ISBN 978-85- 7541-568-9 , 2014

COSTA, D. N. C. C.; BERMUD, P. M. M., RODAS, L. A. C.; NUNES, C. M.; HIRAMOTO, R. M., TOLEZANO, J. E.; CIPRIANO, R. S., CARDOSO, C. D., CODEÇO, C. T.; NETO, F. C. **Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino.** *Revista de Saúde Pública*, 2018.

DIAS, B. R. S. **Vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania amazonensis* e *Leishmaniamajor* interagem de forma distinta com a via autofágica.** 2014. 115 f. **Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)** - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

DING, AIHAO H.; NATHAN, Carl F.; STUEHR, DENNIS J. **Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production.** *The Journal of Immunology*, v. 141, n. 7. 1988.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. ***Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means.** *Current Opinion in Microbiology*, v. 26, p.32-40, 2015.

GALDINO, H. JR., SAAR GOMES, R., DOS SANTOS, JC, PESSONI, LL, MALDANER, AE, MARQUES, SM, **Amastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* induzem a expressão de TNF alfa e IL-10 por células mononucleares de sangue periférico humano in vitro de forma dependente de TLR4.** *Cytokine* 88, 184–192. doi: 10.1016 / j. cyto.2016.09.009, 2016

GIUDICE, A., VENDRAME, C., BEZERRA, C., CARVALHO, LP, DELAVECHIA, T., CARVALHO, EM. **Os macrófagos participam da proteção do hospedeiro e da patologia da doença associada à infecção por *Leishmania braziliensis*.** *BMC Infect. Dis* . 12, 75. doi: 10.1186 / 1471-2334-12-75, 2012.

GIBSON W, PEACOCK L, FERRIS V, WILLIAMS K, BAILEY M. **The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*.** *Parasites & Vectors*. Feb 25. 2008.

GIRAUD, E., MARTIN, O., YAKOB, L. **Quantificar Promastigotas Metacíclicas de *Leishmania* de Mordidas Individuais de Moscas-de-areia revela a eficiência da transmissão vetorial.** *Commun Biol* 2, 2019

GORDON, S., PLÜDDEMANN, A. **Macrófagos de tecidos: heterogeneidade e funções.** *BMC Biol* 15, 53, 2017

GUIMARÃES-E-SILVA, ANTÔNIA SUELY; SILVA, SORAIA DE OLIVEIRA; RIBEIRO DA SILVA, ROSA CRISTINA

; PINHEIRO, VALÉRIA CRISTINA SOARES ; REBÊLO, JOSÉ MANUEL MACÁRIO ; MELO, MARIA NORMA . ***Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis.** PLoS One. 2017.

IBRAHIM ME, SMYTH AJ, ALI MH, BARKER DC, KHARAZMI A. **The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites.** Acta Tropica Journal 57. 1994

IBARRA-MENESES AV, SANCHEZ C, ALVAR J, MORENO J E CARRILLO E. **Monocyte Chemotactic Protein 1 in Plasma from Soluble *Leishmania* Antigen-Stimulated Blood Whole como um Potencial Biomarcador da Cellular Imune Response to *Leishmania infantum* .** *Frente. Immunol.* 8: 1208. doi: 10.3389 / fimmu.2017.01208, 2017

KAYE, P.; SCOTT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface.** Nature reviews. Microbiology, v. 9, n. 8, p. 604, 2011.

KHANJANI, N.; GONZALEZ,U.; LEANARDI-BEE, J., MOHEBALI, M.; SAFFARI, M. KHAMESIPOUR, A. **Vaccines for preventing cutaneous leishmaniasis,** Cochrane Database Syst Revist, 2018.

KOSTKA SL, DINGES S, GRIEWANK K, IWAKURA Y, UDEY MC, STEBUT E. **IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice.**The Journal of Immunology. 2009.

LEMOS, M. H. C., SILVA, W. C., GOMES, F. C. S., COSTA, L. P. J. O., JÚNIOR, J. D. P. A., TEIXEIRA, D. R. A., SANTOS, F. A. S., PINHEIRO, D. H. A., QUEIROZ, B. F. S. **Epidemiologia das Leishmanioses no Estado do Piauí,** Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, Vol.25,n.2, Fev 2019

LESSA, D.A.B., Alencar, N. X., Torres Filho1, R.A., Costa, M.F.M., Fernandes W.R., Saraiva, E.M. **Aumento da atividade leishmanicida de macrófagos alveolares de equinos adultos com asma equina leve.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.vol.71, n.3. 2019

LESTINOVA T, ROHOUSOVA I, SIMA M, DE OLIVEIRA CI, VOLF P. Insights into the sandfly saliva: **Blood-feeding and immune interactions between sandflies, hosts, and *Leishmania*.** PLoS Negl Trop Dis. 2017

LIU, Y. C., ZOU, X. B., CHAI, Y. F., & YAO, Y. M. **Macrophage polarization in inflammatory diseases.** International Journal of Biological Sciences, v. 10, n. 5, p.520-529, 2014.

LIMA, I. S. **Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp.** PLoS ONE, v. 9, n. 2, 2014

MADEIRA MF, SCHUBACH A, SCHUBACH TPM, PACHECO RS, OLIVEIRA FS, PEREIRA SA. **Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro.** Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2005.

MARTINEZ E, MOLLINEDO S, TORREZ M, MUÑOZ M, BAÑULS AL, LE PONT F. **Coinfection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum* /*L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous Leishmaniasis in Bolivia.** Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2002.

MCFARLANE E, PEREZ C, CHARMOY M, ALLENBACH C, CARTER KC, ALEXANDER J. **Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*.** *Infect Immun.* 2008

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

MENEZES, J.A. **Fatores de risco peridomiciliares e conhecimento sobre leishmaniose visceral da população de Formiga, Minas Gerais.** *Revista brasileira epidemiologia.* vol.19, n.2, pp.362-374. ISSN, 2016

MILLS, C. D. **Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages.** *Frontiers in Immunology*, [s.l.], v. 6, p.1-12, 5, 2015.

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

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

MIYAKE, K. **Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors.** *Semin Immunol.* 2007

MEIRELES CB, MAIA LC, SOARES GC, TEODORO IPP, DO SOCORRO VIEIRA GADELHA M, DA SILVA CGL. **Atypical Presentations of Cutaneous Leishmaniasis: A systematic review.** Systematic review, *Acta tropica*, 2017

MOREIRA, P. R. R.; FERNANDO, F. S.; MONTASSIER, H. J.; ANDRÉ, M. R.; VASCONCELOS, R.O. **Polarized M2 macrophage in dogs with visceral leishmaniasis.** *Veterinary Parasitology*, v. 226, p. 69-73, 2016.

MUNIZ, AC, BACELLAR, O., LAGO, EL, CARVALHO, AM, CARNEIRO, PP, GUIMARÃES, LH. **Marcadores imunológicos de proteção na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: um estudo de coorte de 5 anos.** *J. Infect. Dis.* 214, 570–576. doi: 10.1093 / infdis / jiw196, 2016

NETO, V. S. G., FILHO, A. K. D. B., SANTOS, A. M., PRAZERES, M. P. C. S. de, BEZERRIL, A. C. R., FONSECA, A. V. L. de, REBÊLO, J. M. M.. **An analysis of the spatiotemporal distribution of American cutaneous leishmaniasis in counties located along road and railway corridors in the State of Maranhão, Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical .2013.

NOVAIS, FO, CARVALHO, AM, CLARK, ML, CARVALHO, LP, BEITING, DP, BRODSKY, IE. **A citotoxicidade das células T CD8 + medeia a patologia na pele por ativação do inflamassoma e produção de IL-1beta.** *PLoS Pathog* 13: e1006196. doi: 10.1371 / journal. ppat.1006196, 2017

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas.** Recuperado de: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>, 2019.

OLIVEIRA CI. **Animal models for infectious diseases caused by parasites: leishmaniasis** *Drug Discovery Today - Journal: Disease Models.* 2005

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

OLIVIER, M., ATAYDE, V. D., ISNARD, A., HASSANI, K., & SHIO, M. T. ***Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63.** *Microbes and Infection*, v. 14, n. 15, p.1377-1389. Elsevier BV, 2014

OUALHA R, BARHOUMI M, MARZOUKI S, HARIGUA-SOUIAI E, AHMED M BEN, GUIZANI I. **Infection of human neutrophils with leishmania infantum or leishmania major strains triggers activation and differential cytokines release.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2019

PATRÍCIO, F. J. B. **Atividade imunoestimulante e anti-*Leishmania* de *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz)** [Tese de doutorado]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão, 2011.

PINTO, C. S, PEREIRA, J.P, LAGES, L. S, BEZERRA. N. P. C, COIMBRA, V. C. S. **Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Maranhão, Brasil.** *Revista Brasileira de Educação e Saúde* ISSN 2358-2391, v. 9, n. 3, 2019

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

PITTA MGR, ROMANO A, CABANTOUS S, HENRI S, HAMMAD A, KOURIBA B. **IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*.** *The Journal of Clinical Investigation,* 2009.

POLARI LP, CARNEIRO PP, MACEDO M, MACHADO PRL, SCOTT P, CARVALHO EM E BACELLAR O. **A infecção por *Leishmania braziliensis* aumenta a expressão dos receptores Toll-like 2 e 4 e dispara a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em pele humana Leishmaniose.***FrenteCélula. Infectar. Microbiol .* 9: 120. doi: 10.3389 / fcimb.2019.00120

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

RAFIZADEH, S. **Molecular Detection of *Leishmania major* and *L. turanica* in *Phlebotomus papatasi* and First Natural Infection of *P. salehi* to *L. major* in North-East of Iran.** J. Arthropod-Borne Dis., v.10 , 2016.

REIS, L.L..**Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014.** Cad. Saúde Pública, v. 35, n. 1, p. 1-14, 2019.

RODRIGUES , MARIA ZILMA ANDRADE . **Estudo da resposta imunológica do tipo th1 / th2 em pacientes co infectados pelo hiv-1 e *Leishmania sp. nabahia*.** (TESE) 2008.

RODRIGUES, C. M.; VALADARES, H. M.; FRANCISCO, A. F.; ARANTES, J. M.; CAMPOS, C. F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; ARAUJO, M. S.; ARANTES, R. M.; CHIARI, E.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D.; FARIA, A. M.; MACEDO, A. M. **Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection.** PLoSNeglTropDis, v. 4, n. 10, p. e846. 2010

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

SALDAÑA A, SAMUDIO F, MIRANDA A, HERRERA LM, SAVEDRA SP, CÁCERES L, BAYARD V, CALZADA JE. **Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the West-shore of the Panama Canal.** MenInst Oswaldo Cruz 100: 729-731. 2005

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

SANTOS-PEREIRA S, CARDOSO FO, CALABRESE KS, ZAVERUCHA DO VALLE T.***Leishmania amazonensis* resistance in murine macrophages: Analysis of possible mechanisms.** PLoS ONE, 2019

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

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. **Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis.** Nature Reviews Immunology, v. 16, n. 9, p.581-592, 2016.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H. **Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease.** Journal of cellular physiology, 2018

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

SICA, A., ERRENI, M., ALLAVENA, P., & PORTA, C. **Macrophage polarization in pathology.** Cellular And Molecular Life Sciences, v. 72, n. 21, p.4111-4126, 2015.

SILVA DA, MADEIRA MF, TEIXEIRA AC, DE SOUZA CM, FIGUEIREDO FB **Laboratory tests performed on *Leishmania* serum reactivated or euthanized by the leishmaniasis control program.** Journal of Veterinary Parasitology. 2010.

SILVA, Daniela. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas.** 2008. 120f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Santa Catarina Florianópolis. 2008.

SILVA, L. A. . Aspectos da Leishmaniose Visceral Canina: epidemiologia, sorologia e novas perspectivas de tratamento. 117 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia - Fio Cruz, Salvador, 2011.

SILVA, L. D.M. **Investigação do processo de polarização em macrófagos m1 e m2 durante infecção por *Leishmania amazonensis*.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

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

SINGH N, SUNDAR S. **Quimiocinas inflamatórias e seus receptores na leishmaniose visceral humana: perfil de expressão gênica no sangue periférico, fontes celulares esplênicas e seu impacto no tráfico de células inflamatórias.** *Mol Immunol* 85: 111–9. doi: 10.1016 / j.molimm.2017.02.008, 2017.

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

SOONG L, HENARD CA, MELBY PC. **Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. Seminars in Immunopathology, 2012**

STEVERDING, D. **The history of leishmaniasis.** *Parasites Vectors* 10, 2017

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

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. **Leishmaniasis: a review.** F1000 Research, v. 6, p. 750, 2017.

VERMA, G.K., VERMA, S., SHANKER, V., SINGH, G. & TEGTA, G.R., **A rare case of diffuse cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient from sub-Himalayan India.** Tropical Doctor. 2012

VOLF P, SADLOVA J. **Sex in Leishmania.** Science. Science. 2009

WANG N, LIANG H, ZEN K. **Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance.** Front Immunol. 2014 doi: 10.3389/fimmu.2014.00614

WANG Y., SMITH W., HAO D., HE B., KONG L. **M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds,** *International Immunopharmacology*, 2019.

WILSON, R. **Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay.** PLOS Neglected Tropical Diseases. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** WHO 2019

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** WHO 2017

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** WHO 2018

YING, W., CHERUKU, P. S., BAZER, F. W., SAFE, S. H., & ZHOU, B. **Investigation of Macrophage Polarization Using Bone Marrow Derived Macrophages.** Journal of Visualized Experiments :JoVE, (76), 50323, 2013.