

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Coinfecção por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (L.) amazonensis*: Um Estudo da  
Modulação da Resposta Imune *in vivo* e *in vitro***

Nordino Luis Chivale

Uberlândia, MG  
Setembro– 2025

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Coinfecção por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (L.) amazonensis*: Um Estudo da  
Modulação da Resposta Imune *in vivo* e *in vitro***

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós - graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal  
de Uberlândia como requisito parcial à obtenção  
do título de mestre

Aluno:

Nordino Luis Chivale

---

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Viera da Silva

---

Uberlândia, MG

Setembro–2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com  
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C543 Chivale, Nordino Luis, 1998-  
2025 Coinfecção por Trypanosoma cruzi e Leishmania (L.)  
amazonensis: Um Estudo da Modulação da Resposta Imune in vivo  
e in vitro [recurso eletrônico] / Nordino Luis Chivale. - 2025.

Orientador: Cláudio Viera da Silva.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Modo de acesso: Internet.  
DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.559>  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia. I. Silva, Cláudio Viera da, 1972-, (Orient.). II.  
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia  
e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2: Gizele  
Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicada

Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP  
38400-902  
Telefone: (34) 3225-8672 - [www.imunoparasito.ufu.br](http://www.imunoparasito.ufu.br) - [coipa@ufu.br](mailto:coipa@ufu.br)



**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 316 do PPGIPA				
Data:	Vinte e dois de setembro de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	14 h	Hora de encerramento:	17 e 50 min
Matrícula do Discente:	12412IPA011				
Nome do Discente:	Nordino Luis Chivale				
Título do Trabalho:	Coinfecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> : Um Estudo da Modulação da Resposta Imune <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Ecologia da Infecção: Uma Abordagem Decolonial ao Holobionte na Coinfecção <i>Trypanosoma cruzi/Leishmania</i> e seus Determinantes Sociais				

Reuniu-se no dia vinte e dois de setembro de dois mil e vinte e cinco, de forma remota, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Bruna Cristina Borges - UFG; Teresima Velikakkam - UFU e Cláudio Vieira da Silva - UFU, presidente e orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Cláudio Vieira da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação

interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Teresiama Velikkakam, Usuário Externo**, em 22/09/2025, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Cristina Borges, Usuário Externo**, em 22/09/2025, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/09/2025, às 18:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site  
[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **6668639** e o código CRC **BC69C738**.

---

**Referência:** Processo nº 23117.063245/2025-01

SEI nº 6668639

## **DEDICATÓRIA**

À minha amada esposa, Eunice Daniel Matsinhe, por seu  
amor e apoio inabaláveis que sustenta meus sonhos

O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano

**Isaac Newton**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha esposa, Eunice Daniel Matsinhe Chivale, companheira de todas as horas, agradeço a paciência, compreensão e por compartilhar comigo os sonhos e as alegrias desta caminhada. Seu amor me fortaleceu e me impulsionou a seguir em frente.

À minha família, Gilda Bernardo Tsembane (mãe), Luis Lazaro Chivale (pai), Virginia Luis Chivale e Lídia Luis Chivale (irmãs) meu alicerce e porto seguro, dedico este momento com imensa gratidão. O apoio incondicional, o amor e o incentivo de vocês foram essenciais para superar os desafios e alcançar esta conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Viera da Silva, agradeço pela orientação precisa, pelo conhecimento compartilhado e pela confiança depositada em mim. Sua dedicação e sabedoria foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Tripanossomatideos e Laboratório de Imunoparasitologia, agradeço pelo companheirismo, pela troca de experiências e pelo apoio mútuo. A colaboração e a amizade de vocês tornaram o ambiente de trabalho mais leve e produtivo.

Aos professores e colegas do programa de pós-graduação, agradeço pelos ensinamentos valiosos, pelas discussões enriquecedoras e pelo aprendizado compartilhado. A convivência com vocês foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À comunidade estrangeira, agradeço pela acolhida, pela troca de culturas e pela oportunidade de expandir meus horizontes. A experiência de conviver com vocês enriqueceu a minha vida e o meu trabalho.

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

**ASC:** Proteína associada à apoptose semelhante à CARD

**BHI:** Brain Heart Infusion Broth

**BMDM:** Macrófagos Derivados da Medula Óssea

**CBEA-UFU:** Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia

**CONCEA:** Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal

**cDNA:** Fita Complementar de Ácido Desoxirribonucleico

**Ct:** Cycle threshold (Limiar de ciclo)

**DMEM:** Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**ELISA:** Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

**GAPDH:** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**HE:** Hematoxilina e Eosina

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta

**IL-6:** Interleucina 6

**IL-10:** Interleucina 10

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gama

**TNF:** Fator de Necrose Tumoral

**IL-12:** Interleucina 12

**IL-18:** Interleucina 18

**L. (L.) amazonensis:** *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

**MOI:** Multiplicidade de Infecção

**M1:** Macrófago de polarização tipo 1

**M2:** Macrófago de polarização tipo 2

**NLR:** NOD-like Receptor

**NLRP:** Domínio de oligomerização de repetições ricas em leucina contendo pirina

**OD:** Densidade Óptica

**PAMP:** Padrão Molecular Associado a Patógeno

**PAHO:** Pan American Health Organization

**PBS:** Solução Salina Tamponada com Fosfato

**PCR:** Reação em Cadeia pela Polimerase

**RAW 264.7:** Linhagem de macrófagos RAW 264.7

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**RT-PCR:** Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia pela Polimerase

**RT-** Transcriptase Reversa

**qPCR:** PCR Quantitativo em Tempo Real

***T. cruzi:*** *Trypanosoma cruzi*

**Th1:** Linfócito T auxiliar tipo 1

**Th2:** Linfócito T auxiliar tipo 2

**TLR:** Toll-like Receptor

**TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral alfa

**UFU**-Universidade Federal de Uberlândia

**WHO-OMS:** Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
Figura 2: Ciclo de vida da Leishmania.....	4
Figura 3: Distribuição geográfica da leishmaniose e da doença de Chagas no mundo, com classificação por endemicidade e coendemicidade .....	6
Figura 4: Representação esquemática da resposta imune do hospedeiro à infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
Figura 5 Capacidade de Invasão e Multiplicação de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> em Macrófagos RAW 264.7 .....	21
Figura 6: Avaliação da Carga Parasitária de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> em Macrófagos RAW 264.7 ao Longo do Tempo.....	23
Figura 7: Análise da expressão gênica de macrófagos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e/ou <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	25
Figura 8:Análise da expressão gênica de inflamassomas em macrófagos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e/ou <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	27
Figura 9 Análise da produção de citocinas em macrófagos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e/ou <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	29
Figura 10. Análise Histopatológica da Inflamação Cardíaca em Camundongos .....	31
Figura 11. Carga Parasitária de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> em Tecidos de Camundongos Balb/c Infectados e Coinfectados.....	33
Figura 12 Expressão relativa de genes no coração de camundongos BALB/c infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ou coinfectados. ....	35
Figura 13 Expressão relativa de genes na pata de camundongos BALB/c infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ou coinfectados .....	37
Figura 14 Expressão relativa de genes no baço de camundongos BALB/c infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ou coinfectados. ....	39
Figura 15 Níveis séricos de citocinas em camundongos BALB/c infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ou coinfectados. ....	41
Figura 16: Impacto na Resposta Imune e Progressão da Doença de Chagas na Coinfecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	45

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Aspectos gerais de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.2. Aspectos gerais de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	3
1.3. Distribuição geográfica da leishmaniose e da doença de Chagas no mundo .....	5
1.4. Resposta Imune a <i>T. cruzi</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	7
1.5. Justificativa do Estudo .....	10
2. Objetivos .....	12
2.1. Objetivo Geral .....	12
2.2. Objetivos Específicos .....	12
3. Material e Métodos .....	13
3.1. Aspectos Éticos e Local de Estudo .....	13
3.2 Parasitos .....	13
3.3. Células.....	13
3.4. Animais .....	14
3.5. Ensaios de Invasão e Multiplicação Intracelular.....	15
3.5.1. Ensaio de Invasão.....	15
3.5.2. Ensaio de Multiplicação Intracelular.....	15
3.6. Determinação do Parasitismo em macrófagos RAW 264.7 .....	15
3.7. Determinação da Expressão Gênica em macrófagos RAW 264.7 .....	16
3.8. Dosagem de Citocinas Th1/Th2 no Sobre-nadante de Macrófagos Infectados e Estimulados .....	17
3.9 Análise Histopatológica do Coração de Camundongos Balb/c Infectados .....	17
3.10 Dosagem de Citocinas no Plasma de Camundongos Infectados .....	17
3.11.1. Determinação do Parasitismo por qPCR em Tecidos de Camundongos Balb/c .....	18
3.11.2. Quantificação da Expressão Gênica por RT-qPCR em Tecidos .....	18

3.12. Análise Estatística .....	19
4. Resultados .....	20
4.1. <i>T. cruzi</i> apresenta maior capacidade replicativa que <i>L. (L.) amazonensis</i> em infecção única de macrófagos .....	20
4.2. <i>L. (L.) amazonensis</i> altera o ambiente intracelular, tornando-o menos permissivo à replicação de <i>T. cruzi</i> nas fases mais tardias da infecção .....	22
4.3. Coinfecção promove perfil misto de ativação M1/M2 em macrófagos .....	23
4.4. Coinfecção Modula a Expressão de Genes Relacionados ao Inflamassoma .....	26
4.5. Coinfecção Modula a Resposta Imune de Forma Paradoxal, Criando Um Perfil Misto e Desequilibrado das Citocinas Th1 e Th2 .....	28
4.6. Coinfecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> exacerbá a miocardite induzida por <i>T. cruzi</i> .....	30
4.7. Coinfecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> sugere tropismo exacerbado de <i>T. cruzi</i> para coração e baço .....	32
4.8. A inflamação no coração dos coinfetados é ativada de forma excessiva, mas a resposta que seria necessária para controlar a replicação do parasita está inibida .....	34
4.9. A coinfeção estabelece um cenário imunológico atenuado e desequilibrado no local da infecção .....	35
4.10. A coinfeção por <i>T. cruzi</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> inibe certas vias de resposta imunológica no baço .....	37
4.11. A Coinfecção induz uma resposta inflamatória sistêmica prolongada e desregulada	39
5. Discussão.....	42
6. Conclusão .....	47
7. Referências Bibliográficas.....	48

## RESUMO

A coinfecção por múltiplos parasitas é uma realidade clínica complexa e ainda subinvestigada em áreas endêmicas. A infecção por *T. cruzi* causa a Doença de Chagas, uma patologia com alto tropismo cardíaco, enquanto *L. (L.) amazonensis* causa leishmaniose cutânea, e ambas coexistem em diversas regiões. A compreensão das interações imunológicas entre esses dois patógenos é necessária para o prognóstico da doença, mas permanece amplamente desconhecida. Com o objetivo de preencher essa lacuna, este estudo investigou a modulação da resposta imune em modelos *in vitro* e *in vivo* da coinfecção, focando na progressão da doença de Chagas. Demonstramos que a coinfecção não se manifesta como um processo aditivo, mas sim como uma interação paradoxal que resulta em um cenário de desregulação imunológica. Em infecções isoladas, *T. cruzi* possui uma superioridade replicativa sobre *L. (L.) amazonensis* em macrófagos, destacando sua intrínseca capacidade de proliferação. Contudo, a presença de *L. (L.) amazonensis* suprime a replicação de *T. cruzi* em ambiente isolado, ao mesmo tempo em que a coinfecção promove uma polarização mista de macrófagos M1/M2 e uma redução na expressão de vias inflamatórias cruciais. Paradoxalmente, essa modulação local facilita a patogênese sistêmica de *T. cruzi*, levando a um desfecho de doença mais grave, com maior disseminação parasitária e um agravamento da miocardite chagásica. A resposta imune no coração é caracterizada por uma inflamação excessiva, mediada, possivelmente, pelo aumento de IL-6, mas que é ineficaz para o controle do parasita devido à inibição da expressão de iNOS. Concluiu-se que o desequilíbrio imunológico na coinfecção contribui para o agravamento da cardiopatia, reforçando a importância de se considerar as coinfecções no diagnóstico e manejo da Doença de Chagas em regiões de coendemicidade.

**Palavras-chave:** Coinfecção, Doença de Chagas, Leishmaniose, Resposta Imune, Macrófagos, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania. (Leishmania) amazonensis*.

## ABSTRACT

Co-infection with multiple parasites is a complex and under-investigated clinical reality in endemic areas. *T. cruzi* infection causes Chagas disease, a pathology with high cardiac tropism, while *L. (L.) amazonensis* causes cutaneous leishmaniasis, and both diseases coexist in several regions. Understanding the immunological interactions between these two pathogens is necessary for disease prognosis but remains largely unknown. Aiming to fill this gap, this study investigated the modulation of the immune response *in vitro* and *in vivo* models of co-infection, focusing on the progression of Chagas disease. We demonstrated that co-infection does not manifest as an additive process, but rather as a paradoxical interaction that results in a scenario of immunological dysregulation. In single infections, *T. cruzi* showed a superior replicative capacity over *L. (L.) amazonensis* in macrophages, highlighting its intrinsic proliferative capacity. However, the presence of *L. (L.) amazonensis* suppressed *T. cruzi* replication in isolated environments, while co-infection promoted a mixed M1/M2 macrophage polarization and a reduction in the expression of necessary inflammatory pathways. Paradoxically, this local modulation facilitates the systemic pathogenesis of *T. cruzi*, leading to a more severe disease outcome, with greater parasitic dissemination and an exacerbation of chagasic myocarditis. The immune response in the heart is characterized by excessive inflammation, possibly mediated by an increase in IL-6, which is nevertheless ineffective for parasite control due to the inhibition of iNOS expression. It was concluded that the immunological imbalance in co-infection contributes to the worsening of cardiomyopathy, reinforcing the importance of considering co-infections in the diagnosis and management of Chagas disease in co-endemic regions.

**Keywords:** Co-infection, Chagas Disease, Leishmaniasis, Immune Response, Macrophages, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania. (Leishmania) amazonensis*.

## **1. Introdução**

### **1.1. Aspectos gerais de *Trypanosoma cruzi***

A infecção pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é a causa da doença de Chagas, uma patologia crônica e sistêmica de relevância global. A doença se manifesta em duas fases distintas: a aguda, caracterizada por alta parasitemia e geralmente autolimitada, e a crônica, de progressão lenta e baixa parasitemia (COURA et al., 2013; PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2018; MACALUSO et al., 2023). Na fase aguda, cerca de 70% dos pacientes permanecem assintomáticos, enquanto os 30% restantes podem desenvolver, após décadas, manifestações cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas significativas (MACALUSO et al., 2023; MARIN-NETO, 2023; WHO, 2024).

Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma doença negligenciada, a doença de Chagas, outrora prevalente na América Latina, expandiu seu alcance para a Europa e os Estados Unidos, impulsionada pela migração e por vias de transmissão como transfusões de sangue e transplantes de órgãos (MARIN-NETO et al., 2023; WHO, 2023). No Brasil, a doença já afetou cerca de 40% do território, com maior incidência em Minas Gerais, Goiás, Bahia, São Paulo, Acre, Amazonas e Amapá. A maioria dos surtos recentes concentrou-se no Pará (75,9%) e Amapá (12,5%), com casos esporádicos no Amazonas, Tocantins e Bahia (CONCEIÇÃO et al., 2013; LIMA et al., 2018).

O ciclo de vida de *T. cruzi* envolve dois hospedeiros e múltiplas formas (epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos), cada uma adaptada às condições específicas do vetor (triatomíneo) e do hospedeiro mamífero (COURA, 2013). A transmissão ocorre quando o triatomíneo ingere sangue infectado, permitindo que os tripomastigotas se transformem em epimastigotas no intestino do inseto. Estes se multiplicam e migram para o reto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Durante a picada, o inseto libera fezes contendo os parasitas, que penetram no hospedeiro mamífero através da pele ou mucosas. No interior das células do hospedeiro, os tripomastigotas transformam-se em amastigotas, que se multiplicam e liberam novos tripomastigotas na corrente sanguínea (tripomastigotas sanguíneos). A ingestão destes por outro triatomíneo completa o ciclo (COURA, 2013; STANAWAY e ROTH, 2015; MACALUSO et al., 2023; WHO, 2024).

## *Trypanosoma cruzi*

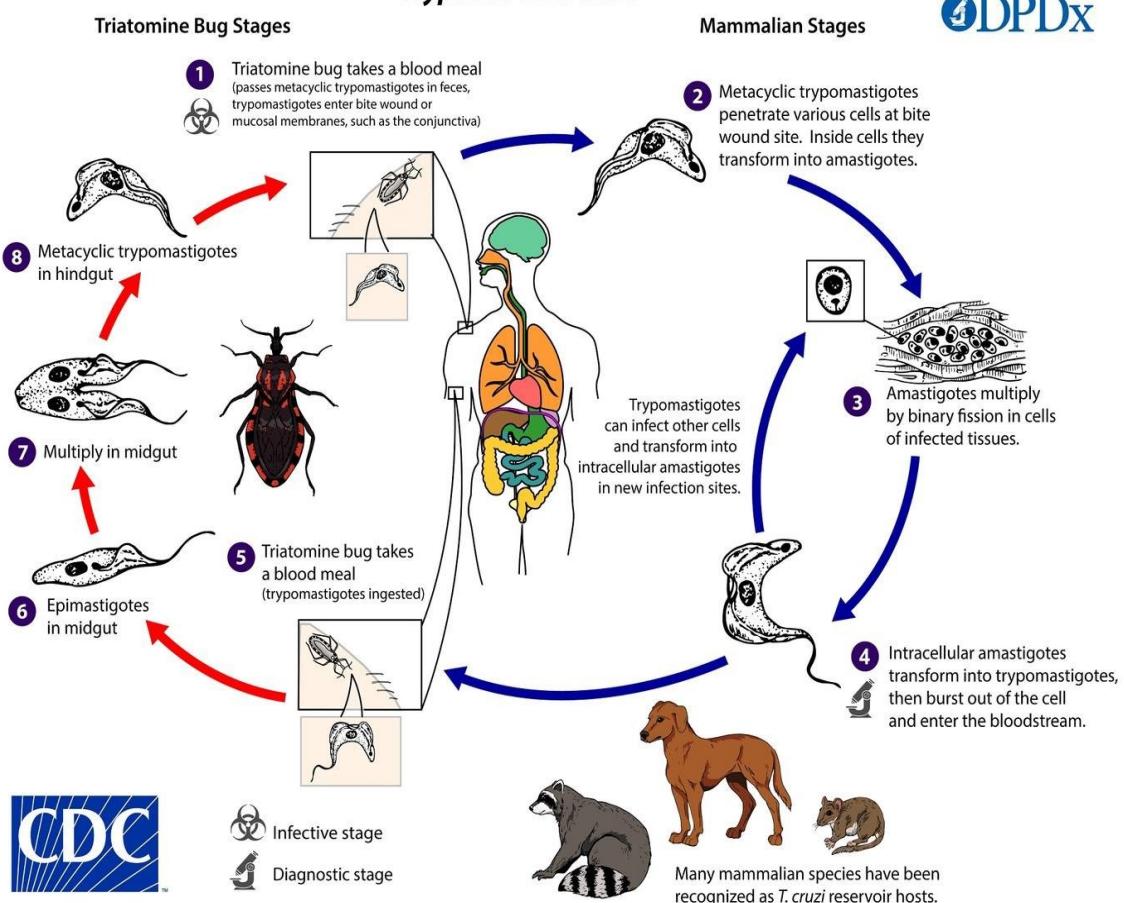


Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Fonte: Organização Mundial da Saúde - WHO). (1) Por meio das fezes do triatomíneo, tripomastigotas metacíclicos do inseto barbeiro infectam o hospedeiro humano, (2-3) transformando-se em amastigotas que se replicam intracelularmente. (4) Após diferenciação em tripomastigotas sanguíneos, eles se disseminam no hospedeiro ou (5) são ingeridos pelo barbeiro (c-7), onde se transformam em epimastigotas, multiplicam-se e (8) evoluem para tripomastigotas metacíclicos infectantes no intestino do inseto, fechando o ciclo. A transmissão também pode ocorrer por outras vias além do vetor.

O tratamento da Doença de Chagas baseia-se principalmente no uso de antiparasitários como o benznidazol e o nifurtimox, que são mais eficazes na fase aguda da infecção, embora também possam apresentar benefícios na fase crônica ao reduzir a progressão da doença e a carga parasitária. Ambos os medicamentos têm limitações, como efeitos adversos e baixa eficácia em fases avançadas da doença, o que impulsiona a busca por novas terapias e estratégias terapêuticas combinadas (BERN et al., 2011; RIBEIRO et al., 2022). Estudos recentes também investigam abordagens imunomoduladoras e terapias baseadas em novos alvos moleculares, com foco em melhorar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais dos tratamentos disponíveis (BONNEY e ENGMAN, 2015).

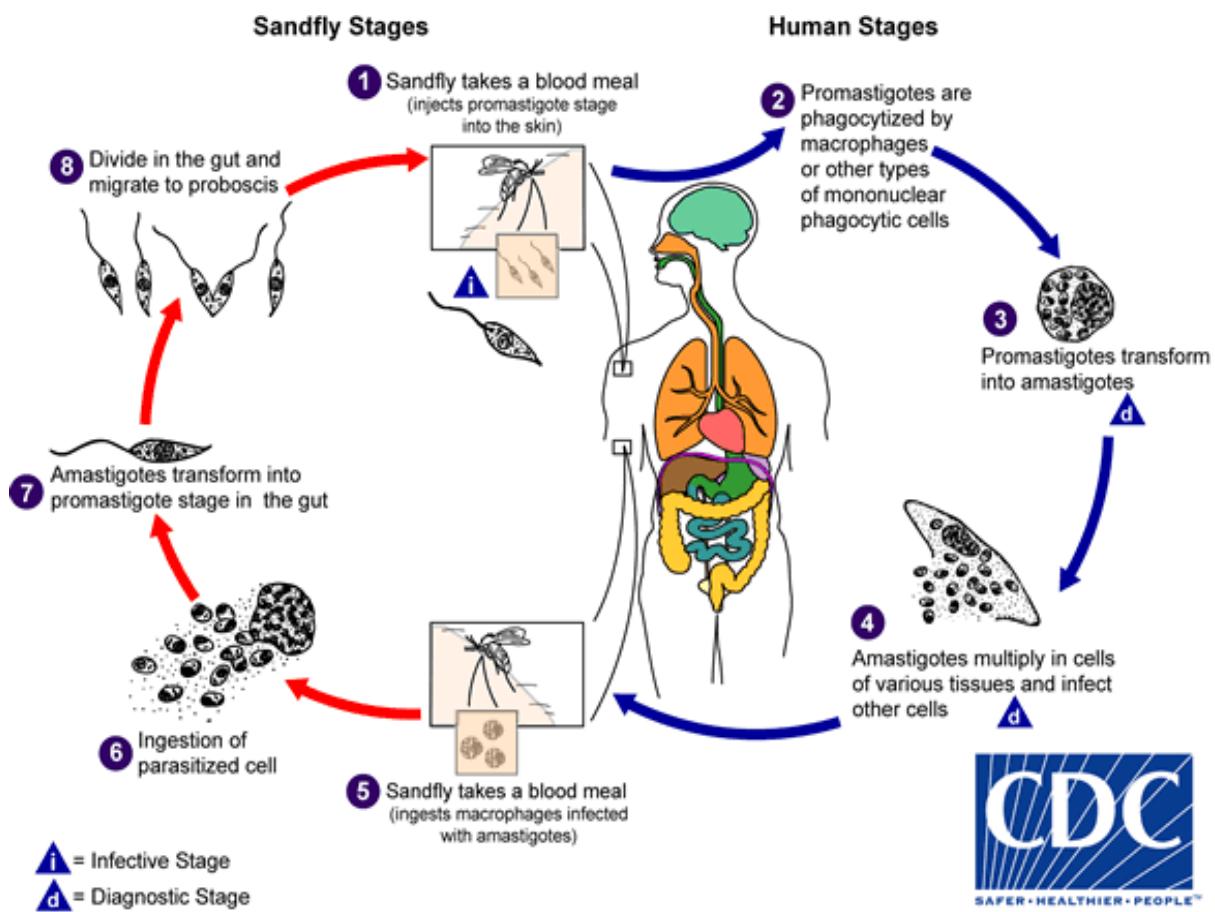
## **1.2. Aspectos gerais de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

*Leishmania (Leishmania) amazonensis* é um protozoário parasita do gênero *Leishmania*, causador de diversas manifestações clínicas da leishmaniose, uma zoonose endêmica em várias regiões do mundo (BLAINE et al., 2023). No Brasil e em outros países da América Latina, essa espécie é particularmente associada à leishmaniose cutânea difusa, uma forma da doença caracterizada por lesões ulcerosas extensas e de difícil tratamento (ANIVERSA et al., 2018).

A leishmaniose cutânea difusa se manifesta por meio de múltiplas lesões ulcerosas, frequentemente indolores, que podem abranger grandes áreas do corpo. A evolução clínica é variável, e a resposta ao tratamento convencional é frequentemente insatisfatória (PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021). A ausência de uma vacina eficaz e as dificuldades no tratamento da leishmaniose cutânea difusa representam desafios significativos para os sistemas de saúde (SILVA et al., 2013).

O ciclo de vida de *L. (L.) amazonensis* alterna entre duas formas (promastigota e amastigota) e dois hospedeiros: o inseto vetor (flebótomo) e o mamífero (incluindo o ser humano). A forma promastigota, alongada e flagelada, é encontrada no intestino do flebótomo e é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. A forma amastigota, arredondada e aflagelada, é encontrada no interior das células do hospedeiro vertebrado e é a forma replicativa do parasita (BATES, 2018).

A transmissão ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada pica um mamífero e inocula promastigotas metacíclicos na pele. Estes são fagocitados por macrófagos e outras células do sistema imune, onde se transformam em amastigotas e se multiplicam. A ruptura das células infectadas libera novos parasitas, que podem infectar outras células. Ao se alimentar de um hospedeiro infectado, o flebótomo ingere macrófagos contendo amastigotas, que se transformam em promastigotas no intestino do inseto, reiniciando o ciclo (BATES, 2018; CDC, 2024).



**Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania*** (Fonte: Organização Mundial da Saúde - WHO). (1) Flebótomos fêmeas infectadas picam o hospedeiro mamífero e injetam promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. (2) Os promastigotas são fagocitados por macrófagos. (3) Dentro dos macrófagos, os promastigotas se transformam em amastigotas. (4) Os amastigotas se multiplicam dentro dos macrófagos. (5-6) Um flebótomo ingere macrófagos infectados com amastigotas durante o repasto sanguíneo. (7) No intestino médio do flebótomo, os amastigotas se transformam em promastigotas. (8) Os promastigotas se multiplicam e migram para a probóscide do flebótomo, prontos para infectar um novo hospedeiro.

O tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (L.) amazonensis* permanece um desafio, devido à variabilidade na resposta terapêutica e à toxicidade dos fármacos disponíveis. Os antimoniais pentavalentes, como o antimoníato de meglumina, continuam sendo a primeira linha de tratamento, embora apresentem limitações como efeitos colaterais severos e surgimento de resistência parasitária. Alternativas como a anfotericina B lipossomal e a miltefosina têm mostrado eficácia em alguns casos, mas seu uso ainda é restrito devido ao custo elevado ou disponibilidade limitada (CROFT et al., 2006; PONTE-SUCRE et al., 2017). Estudos com novas moléculas e estratégias imunoterapêuticas vêm sendo desenvolvidos para superar essas barreiras e proporcionar tratamentos mais seguros e eficazes (FERREIRA et al., 2020).

### **1.3. Distribuição geográfica da leishmaniose e da doença de Chagas no mundo**

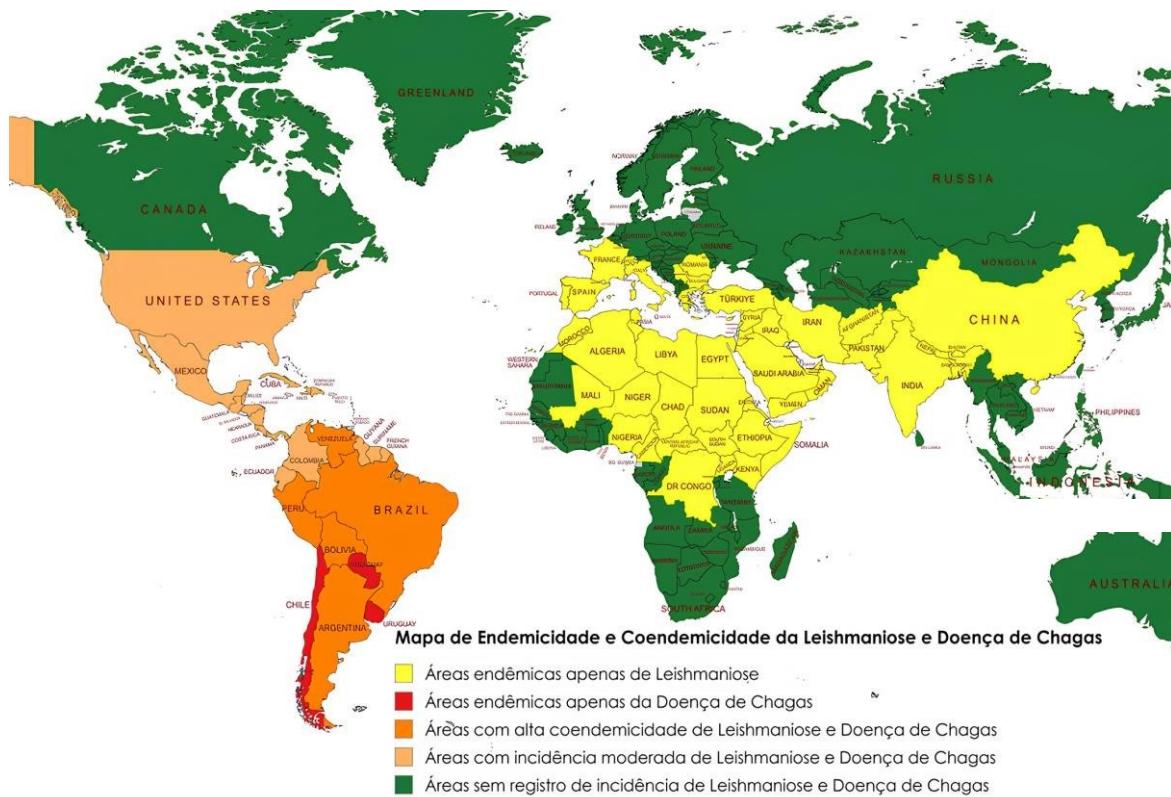
A leishmaniose e a doença de Chagas são enfermidades parasitárias negligenciadas de grande relevância na saúde pública global. Ambas possuem distribuição geográfica predominantemente tropical e subtropical, mas apresentam padrões distintos de dispersão, refletindo fatores ecológicos, sociais e vetoriais específicos. A leishmaniose está amplamente distribuída em cerca de 90 países, com destaque para regiões da América Latina, África, Oriente Médio, sul da Ásia e Europa mediterrânea (ALVAR et al., 2012). Já a doença de Chagas é praticamente restrita ao continente americano, com maior concentração nos países da América do Sul e Central, embora casos importados tenham sido identificados em regiões não endêmicas como Europa, América do Norte, Japão e Austrália (COURA e VIÑAS, 2010; BERN et al., 2011; GONZALEZ-SANZ et al., 2023; ECDC, 2024 e MONTEBLANCO et a., 2025).

Nas Américas, observam-se amplas áreas de coendemicidade, especialmente no Brasil, Bolívia, Argentina, Peru, Paraguai e Colômbia, onde há sobreposição espacial entre os vetores triatomíneos (transmissores de *T. cruzi*) e os flebotomíneos (vetores de *Leishmania* spp.) (PAHO, 2023). Tais regiões representam zonas de risco elevado, especialmente em contextos rurais e periurbanos, com fragilidade no saneamento e no acesso à saúde. O mapa evidencia essa sobreposição ao classificar tais áreas com alta coendemicidade. Por outro lado, países como Chile e Uruguai registram casos autóctones de doença de Chagas, mas não apresentam transmissão local de leishmaniose, ilustrando um cenário de endemicidade exclusiva (WHO, 2023a). Em contraste, países como México, Venezuela e Honduras apresentam ambas as doenças, mas com intensidade e distribuição geográfica variadas, justificando sua classificação como áreas de coendemicidade moderada (PAHO, 2023).

Na África, a leishmaniose é amplamente distribuída, especialmente no Leste e Norte do continente, com formas cutâneas e viscerais fortemente associadas a pobreza extrema, desnutrição e instabilidade política. Em países como Etiópia, Sudão, Quênia, Argélia e Mali, a transmissão é ativa e, muitas vezes, recorrente em surtos epidêmicos (WHO, 2023b). A doença de Chagas, por outro lado, está ausente da África em termos de transmissão natural, com registros limitados a casos importados e experimentais. Situação semelhante é observada na Ásia, onde a leishmaniose visceral é altamente endêmica na Índia, Bangladesh e Nepal, enquanto a forma cutânea predomina no Irã, Paquistão, Afeganistão e Síria. Também nesses

países não há vetores competentes para a transmissão autóctone de *T. cruzi*, tornando improvável a ocorrência natural da doença de Chagas (ALVAR et al., 2012).

Na Europa, destaca-se a presença de leishmaniose visceral zoonótica em regiões do Mediterrâneo, como Espanha, Itália, Portugal e Grécia, com transmissão vinculada a cães domésticos e flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (ECDC, 2023). A doença de Chagas, embora não endêmica, representa um desafio emergente nos serviços de saúde de países com alta imigração latino-americana, principalmente Espanha e Suíça, onde há protocolos de triagem sorológica em bancos de sangue e gestantes (COURA e VIÑAS, 2010; Bern et al., 2011). A América do Norte, por sua vez, apresenta registros limitados de transmissão de *T. cruzi* em estados do sul dos Estados Unidos, como Texas e Arizona, assim como de leishmaniose cutânea em humanos e cães, ainda que com baixa expressão epidemiológica (BERN et al., 2011).



**Figura 3: Distribuição geográfica da leishmaniose e da doença de Chagas no mundo, com classificação por endemicidade e coendemicidade.** O mapa foi construído usando mapchat com base em dados epidemiológicos globais provenientes da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2023a, 2023b), Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO, 2023), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC, 2023), bem como em estudos de revisão epidemiológica de Alvar et al. (2012), Coura & Viñas (2010) e Bern et al. (2011).

Por fim, diversas regiões do globo permanecem livres da transmissão autóctone de ambas as doenças, como Canadá, Europa setentrional, Rússia, Japão, Austrália e Nova Zelândia. Essas áreas estão associadas a climas temperados ou frios, alto desenvolvimento

socioeconômico, ausência de vetores e vigilância epidemiológica eficiente (WHO, 2023a; ECDC, 2023). O mapa construído reflete essas dinâmicas ao classificar em cores distintas as áreas com leishmaniose isolada, doença de Chagas isolada, coendemicidade, endemicidade moderada e ausência de transmissão. Essa representação geográfica, baseada em dados oficiais e literatura especializada, serve como ferramenta valiosa para análise de risco, alocação de recursos e planejamento de ações de controle e vigilância em saúde pública.

#### **1.4. Resposta Imune a *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis***

A resposta imune representa um intrincado sistema de defesa do hospedeiro contra patógenos, como *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*, sendo classicamente dividida em imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata, a primeira linha de defesa, caracteriza-se por respostas rápidas e não específicas, mediadas por células como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Estas reconhecem padrões moleculares conservados nos patógenos (PAMPs) através de receptores como os Toll-like receptors (TLRs) e os receptores NOD-like (NLRs), desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , essenciais para o controle inicial da infecção (MURPHY et al., 2016; ABBAS et al., 2018). A imunidade adaptativa, mais tardia e específica, é orquestrada por linfócitos T e B. Linfócitos T atuam na eliminação de células infectadas, enquanto linfócitos B produzem anticorpos que neutralizam os patógenos (MURPHY et al., 2016; ABBAS et al., 2018).

Na infecção por *T. cruzi*, a resposta imune adaptativa desempenha um papel necessário no controle da parasitemia e na limitação dos danos teciduais, embora o parasita possa persistir em baixos níveis no hospedeiro (MACALUSO, 2023). Na fase aguda, *T. cruzi* ativa células dendríticas e macrófagos, que atuam como células apresentadoras de抗ígenos (APCs). As células dendríticas, após o reconhecimento do patógeno, migram para os órgãos linfoides secundários, onde interagem com células T CD4+ (Th), induzindo a sua diferenciação em células T helper 1 (Th1), um processo necessário para a polarização da resposta imune. Esta diferenciação é fortemente influenciada pela citocina IL-12, produzida tanto pelos macrófagos quanto pelas células dendríticas. Os macrófagos, por sua vez, ao serem ativados, produzem IL-12 e TNF- $\alpha$ , esta última uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel central na resposta imune inata e na ativação de outras células imunes, incluindo as Natural Killer (NK). As células NK, estimuladas por IFN- $\gamma$  e IL-12, também contribuem para a eliminação do patógeno através da produção de IFN- $\gamma$  e da ativação de macrófagos. A produção de Espécies Reativas de Nitrogênio e espécies reativas de oxigênio (RNI e ROS) pelos macrófagos ativados

é um mecanismo essencial na destruição do patógeno.

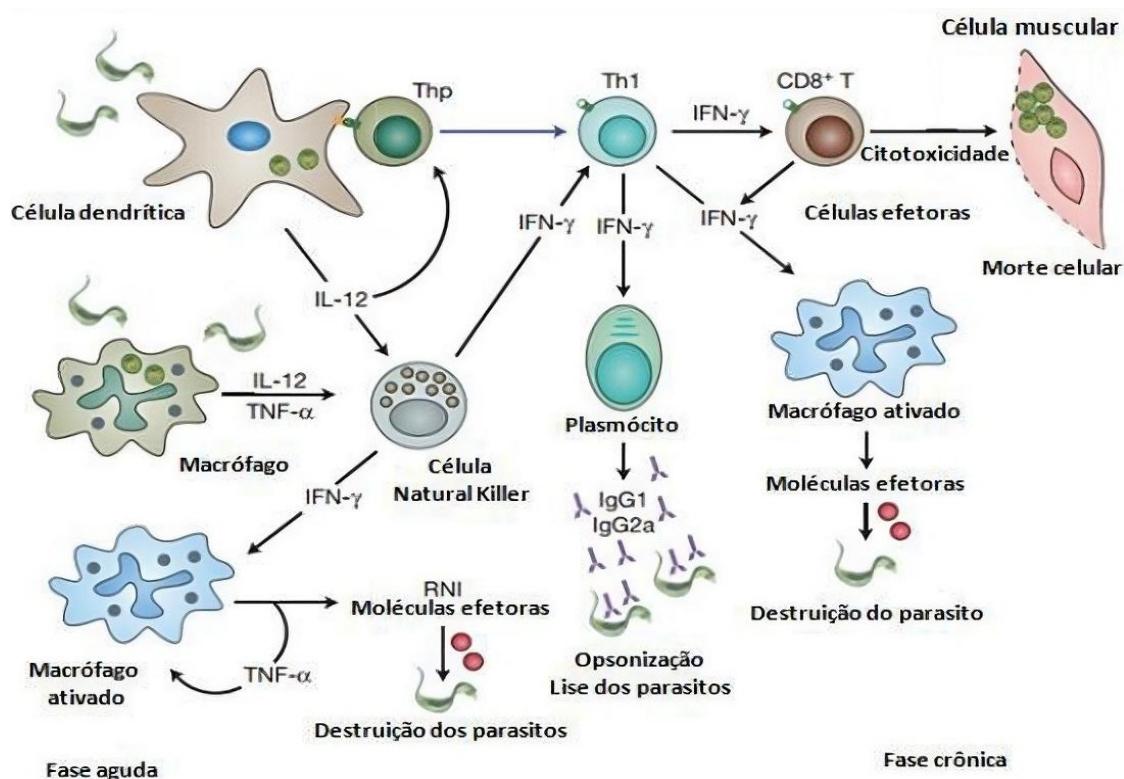


Figura 4: Representação esquemática da resposta imune do hospedeiro à infecção por *Trypanosoma cruzi*. (Fonte: Barros, 2016). Fase Aguda: Inicia-se com a fagocitose do parasita por células dendríticas e macrófagos. Estas células ativam-se e produzem citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 e TNF- $\alpha$ . A IL-12 induz a diferenciação de linfócitos T auxiliares virgens (Thp) em linfócitos Th1, e a ativação de Células Natural Killer (NK), que por sua vez produzem IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  é necessário para a ativação de macrófagos e a produção de óxido nítrico (NO) e outras moléculas efetoras, que levam à destruição dos parasitas. Macrófagos ativados também liberam TNF- $\alpha$ , que atua em um *feedback* positivo na ativação de outros macrófagos. Fase Crônica: A resposta adaptativa mediada por linfócitos T continua a ser essencial. Os linfócitos Th1 induzem a produção de IFN- $\gamma$ , que ativa linfócitos T CD8+, resultando em citotoxicidade direta e morte de células musculares infectadas. Além disso, o IFN- $\gamma$  também estimula a diferenciação de plasmócitos, que secretam anticorpos (IgG1, IgG2a). Estes anticorpos participam da opsonização e lise dos parasitas, facilitando sua destruição. Macrófagos ativados na fase crônica continuam a produzir moléculas efetoras para a destruição do parasita.

A transição para a fase crônica é marcada pela amplificação da resposta imune adaptativa, principalmente mediada pelas células Th1. As células Th1 produzem grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , uma citocina multifuncional que desempenha um papel crítico em diversas vias de eliminação do patógeno. O IFN- $\gamma$  atua diretamente na ativação de macrófagos, potencializando a sua capacidade fagocítica e a produção de moléculas efetoras, levando à destruição do parasita. Além disso, o IFN- $\gamma$  estimula o desenvolvimento de plasmócitos, que são as células produtoras de anticorpos. A produção de anticorpos, como IgG1 e IgG2a, resulta

na opsonização e lise dos parasitas, mecanismos importantes na eliminação extracelular. A citotoxicidade mediada por células T CD8+, ativadas também sob a influência do IFN- $\gamma$ , representa um pilar fundamental da resposta imune adaptativa. As células T CD8+ efetoras atacam e destroem células musculares infetadas, induzindo a morte celular e limitando a propagação do patógeno.

Em contraste, a resposta imune à *L. (L.) amazonensis* apresenta uma plasticidade notável, com diferentes perfis de citocinas (predominância Th1 ou Th2) frequentemente associados às distintas manifestações clínicas da doença (MURPHY et al., 2016; ABBAS et al., 2018). Após a inoculação de *Leishmania*, o parasita explora o microambiente inflamatório induzido pela saliva do vetor para facilitar sua invasão celular. Neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas e a fagocitar os promastigotas, contudo, os macrófagos emergem como as células primárias para a replicação parasitária e o estabelecimento da infecção. Surpreendentemente, a *Leishmania* fagocitada é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior do fagolisossomo do macrófago, um ambiente hostil caracterizado por baixo pH e enzimas líticas (CONDE et al., 2022; COSTA-DA-SILVA et al., 2022 e OMONDI et al., 2022).

A coinfeção, definida pela presença simultânea de dois ou mais patógenos em um único hospedeiro, representa um desafio significativo para a saúde pública, especialmente em regiões tropicais e subtropicais onde a coexistência de diversas doenças infecciosas é comum (VENTER et al., 2022). Entretanto, apesar da relevância epidemiológica da coinfeção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* em áreas de coendemia, o intrincado balanço da resposta imune nesse cenário permanece amplamente desconhecido. As interações complexas entre esses parasitas intracelulares e o sistema imunológico do hospedeiro podem desviar as respostas protetoras direcionadas a cada patógeno individualmente, com consequências imprevisíveis para a patogênese, a progressão da doença e a eficácia das abordagens terapêuticas. Ainda não está totalmente elucidado se a presença de um parasita modula a resposta imune de forma a exacerbar ou atenuar a infecção pelo outro, ou se mecanismos de competição intracelular influenciam a carga parasitária e a ativação imune. Compreender as nuances da resposta imune na coinfeção é necessário para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico clínico e tratamento mais precisas e para a otimização de intervenções terapêuticas que considerem as interações sinérgicas ou antagônicas entre esses importantes patógenos.

## **1.5. Justificativa do Estudo**

A investigação da modulação da resposta imune na coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* apresenta-se como um tema de grande relevância para a saúde pública, considerando a ocorrência de ambas as parasitoses em áreas endêmicas e a possibilidade de coinfecções em populações expostas. Em regiões com distribuição geográfica sobreposta, a coexistência desses parasitas aumenta o risco de infecções mistas em hospedeiros humanos e animais (HERRERA et al., 2022). Estudos recentes têm demonstrado a complexidade das coinfecções envolvendo parasitas intracelulares, particularmente o filo Apicomplexa, e seu impacto na resposta imune. Pesquisas revelam que coinfecções podem levar a interações complexas, incluindo competição por recursos intracelulares e modulação da resposta imune do hospedeiro (VENTER et al., 2022; BRANDÃO et al., 2023). Por exemplo, estudos sobre coinfecções por diferentes espécies de *Plasmodium*, o parasita da malária, têm revelado que a presença de uma espécie pode alterar a dinâmica de infecção e a gravidade da doença causada por outra, com implicações para a patogênese da malária e a eficácia do tratamento (BRANDÃO et al., 2023). Além disso, pesquisas exploram os mecanismos moleculares subjacentes a essas interações, como a modulação da expressão de microRNAs e outras moléculas regulatórias (BRANDÃO et al., 2023), que podem influenciar a resposta imune do hospedeiro e a sobrevivência dos parasitas. A ocorrência de coinfecções por parasitas tripanosomatídeos, como *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, é uma realidade em áreas endêmicas sobrepostas (HERRERA et al., 2022), com potenciais implicações para a patogênese e o tratamento das doenças resultantes. Um estudo de caso recente investigou os efeitos do tratamento com antimoníato de meglumina na resposta imune de um paciente com coinfecção por leishmaniose mucosa e doença de Chagas, revelando uma modulação na produção de citocinas e na população de células T regulatórias, o que destaca a complexidade das interações imunológicas nesse cenário clínico (REZENDE-OLIVEIRA et al., 2020).

Nesse contexto, este estudo contribuirá para o conhecimento da imunopatologia das doenças parasitárias, ao investigar como a coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* modula a resposta imune do hospedeiro. A compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos nessa interação parasito-parasito-hospedeiro é fundamental para elucidar os possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos da coinfecção e seu impacto no curso clínico das doenças. Além disso, os resultados desta pesquisa poderão ter um potencial impacto no desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento, ao identificar alvos terapêuticos e biomarcadores

associados à coinfecção, bem como subsidiar a elaboração de medidas de controle mais eficazes em áreas de coendemia.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar o impacto da coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* na modulação da resposta imune *in vitro* e *in vivo*, e investigar os mecanismos moleculares imunopatológicos envolvidos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Estimar a porcentagem de células infectadas e quantificar os parasitas intracelulares em macrófagos RAW 264.7 em infecções únicas e coinfecção com *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*.
- Quantificar a carga parasitária de *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* em macrófagos RAW 264.7 em infecções únicas e coinfecção com *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*.
- Avaliar o perfil de polarização de macrófagos RAW 264.7 (M1/M2) em infecções únicas e coinfecção com *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*. pela expressão gênica de iNOS, arginase e Ym1.
- Mensurar a expressão de genes relacionados ao inflamassoma (ASC, NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP5, NLRP9 e NLRP10) em macrófagos RAW 264.7 em infecções únicas e coinfecção.
- Quantificar a produção de citocinas IL-6, IL-10, IL-12p70 no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 em infecções únicas e coinfecção com *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*.
- Quantificar a carga parasitária nos tecidos (pata, sangue, coração, baço e fígado) de camundongos Balb/c em infecções únicas e coinfecção, nos tempos de 7, 15 e 30 dias após a infecção.
- Realizar análise histopatológica do coração de camundongos Balb/c em infecções únicas e coinfecção, 30 dias após a infecção.
- Quantificar a produção de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 e IL-10 no soro de camundongos Balb/c em infecções únicas e coinfecção, nos tempos de 7, 15 e 30 dias após a infecção.
- Estimar a expressão gênica de NLRP1, NLRP3, NLRP9 e ASC e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e genes de polarização de macrófagos (iNOS, Arginase-1 e Ym1) em tecidos (pata, coração e baço) de camundongos Balb/c em infecções únicas e coinfecção, 7 dias após a infecção.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Aspectos Éticos e Local de Estudo**

A presente pesquisa foi conduzida em estrita conformidade com as diretrizes de biossegurança vigentes. Os protocolos experimentais que envolveram a utilização de animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA), sob o protocolo nº 23117.016293/2024-11 (documentação completa em anexo).

As etapas experimentais foram realizadas no Laboratório de Tripanossomatídeos, com o apoio das instalações de redes de laboratórios multiusuários (RELAM), do Campus Umuarama, Laboratório de Imunoparasitologia e Laboratório de Histologia, todos localizados no Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

#### **3.2 Parasitos**

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivados em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI) (HIMEDIA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sob temperatura controlada de 26 °C. Para os ensaios de infecção experimental, foram utilizados parasitos em fase estacionária, predominantemente promastigotas metacíclicos, que representam a forma infectante do protozoário.

Tripomastigotas de *T. cruzi* foram mantidos em cultura de células VERO, utilizando meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de SFB, antibióticos e outros suplementos. As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C, sob atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.3. Células**

Linhagem de macrófagos RAW 264.7 (macrófagos derivadas de um tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson em um camundongo fêmea BALB/c) foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células foram cultivadas em frascos de cultura de tecido, incubadas a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, na densidade de 5 x 10<sup>6</sup> células por poço, e incubadas durante 24 horas para adesão. Após esse período, as células foram submetidas aos tratamentos experimentais, conforme o desenho experimental abaixo:

- **Grupo 1 (Controle Não Infectado):** Células mantidas em meio de cultura sem parasitas ou estímulos.
- **Grupo 2 (Infecção com *T. cruzi*):** Células infectadas com *T. cruzi* (3 parasitas/célula).
- **Grupo 3 (Infecção com *L. (L.) amazonensis*):** Células infectadas com *L. (L.) amazonensis* (10 parasitas/célula).
- **Grupo 4 (Coinfecção):** Células infectadas simultaneamente com *T. cruzi* (3 parasitas/célula) e *L. (L.) amazonensis* (10 parasitas/célula).

Após a infecção, as células foram incubadas por um período de quatro horas em seguida as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover parasitas extracelulares, o meio de cultura foi reposto e as células foram incubadas para análise nos tempos de 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h dependendo do ensaio.

Durante todo o processo, foram realizados monitoramentos diários da morfologia celular e da confluência da cultura, utilizando microscopia de luz invertida.

Findo cada ponto temporal, o sobrenadante e as células foram coletados e, imediatamente, armazenadas em freezer -80 °C.

### **3.4. Animais**

Neste estudo, foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA-UFU) sob condições padrão de luz-escuro (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C), com acesso irrestrito a água e ração. A linhagem foi selecionada por polarizar a resposta imune para o perfil Th2, o que a torna mais suscetível a infecções intracelulares, como as infecções por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*.

Todos os procedimentos de cuidado, manipulação e eutanásia dos animais seguiram as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e os fundamentos internacionais de bem-estar animal, conforme a Resolução Normativa nº 37 de 15/02/2018, que estabelece as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.

Foram utilizados 60 camundongos Balb/c, distribuídos em quatro grupos experimentais, com cinco animais por grupo, e submetidos à eutanásia em três pontos temporais distintos (7, 15 e 30 dias após a infecção):

- **Grupo 1 (Controle):** Animais não infectados.
- **Grupo 2:** Animais infectados exclusivamente com *T. cruzi*.

- **Grupo 3:** Animais infectados exclusivamente com *L. (L.) amazonensis*.
- **Grupo 4:** Animais infectados simultaneamente com *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*.

A infecção foi realizada mediante inoculação de  $1 \times 10^7$  parasitas por pata, em uma das patas traseiras de cada animal, usando PBS como veículo. Em cada ponto temporal foram coletadas amostras de sangue por plexo orbital com os animais anestesiados e seguido de eutanásia e cuidadosamente removidos os órgãos: coração, baço, fígado e patas infectadas para análises subsequentes. Uma parte de corações (septo interventricular) foi fixado em solução de formalina a 10% por um período mínimo de 24 horas e os outros órgãos para análises de parasitismo e expressão gênica foram imediatamente armazenadas em freezer -80 °C.

### **3.5. Ensaios de Invasão e Multiplicação Intracelular**

#### **3.5.1. Ensaio de Invasão**

As células foram fixadas com solução de Bouin, coradas com Giemsa e descoradas com xilol e acetona. As lâminas foram preparadas e as imagens foram adquiridas utilizando microscopia de luz (Nikon ECLIPSE E100) usando objectiva de 40x. Para quantificar a invasão (24h), a porcentagem de células infectadas por campo foi determinada em trinta campos e o número de parasitas intracelulares foi contado em 100 células infectadas.

#### **3.5.2. Ensaio de Multiplicação Intracelular**

Em cada ponto temporal (48h, 72h e 96h), as células foram fixadas com solução de Bouin, coradas com Giemsa e descoradas com xilol e acetona. As lâminas foram preparadas e as imagens foram adquiridas por microscopia de luz (Nikon ECLIPSE E100) usando objectiva de 40x. A multiplicação intracelular foi quantificada pela contagem do número de parasitas intracelulares em 100 células infectadas e determinação da percentagem de células infectadas em 30 campos em cada tempo acima referenciada.

### **3.6. Determinação do Parasitismo em macrófagos RAW 264.7**

Para a determinação do parasitismo, as amostras de células RAW 264.7 coletadas nos diferentes pontos temporais (24h, 48h, 72h e 96h) foram retiradas do freezer e mantidas em gelo. O DNA total foi extraído, usando tampão de lise contendo SDS para romper as membranas, e Proteinase K para degradação das proteínas associadas ao DNA e na inativação de nucleases, o DNA foi então precipitado com álcool etílico absoluto e centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos. Após a lavagem com etanol 70%, o pellet de DNA foi ressuspenso em água ultrapura e a concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas por

espectrofotometria da *Thermo Scientific NanoDrop Series Spectrophotometers* e prosseguiu-se com a determinação do parasitismo por qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa), utilizando uma curva padrão para cada parasita para determinar a carga parasitária.

A reação de qPCR foi conduzida no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)*, utilizando o software *StepOne™ Software v2.3 para análise* dos dados. Os reagentes utilizados foram do kit "SYBR Green qPCR Master Mix Low ROX" da Nova Biotecnologia. foram usados primers específicos para cada gene e parasitas (em anexo).

### **3.7. Determinação da Expressão Gênica em macrófagos RAW 264.7**

Para a determinação da Expressão Gênica, as amostras de células RAW 264.7 coletadas nos diferentes pontos temporais (6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h) foram retiradas do freezer e mantidas em gelo. O RNA total foi extraído, homogeneizando a amostra em TRIzol para lise celular e inativação de RNases. A seguir, foi adicionado clorofórmio para a separação das fases, onde o RNA permaneceu na fase aquosa (superior). O RNA foi precipitado com álcool isopropílico e o *pellet* foi lavado com etanol 75%. Por fim, o RNA foi ressuspenso em água livre de Rnase e concentração e a pureza do RNA extraído foram determinadas por espectrofotometria da *Thermo Scientific NanoDrop Series Spectrophotometers*. A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído, utilizando o kit comercial "qScript cDNA Synthesis Kit" da Nova Biotecnologia, seguindo as instruções do fabricante.

A expressão gênica dos genes de inflamassomas (ASC, NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP5 NLRP9, NLRP10), genes de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) e genes de perfil de macrófagos M1(iNos) e M2 (Ym1 e Arginase-1) foi quantificada por RT-qPCR usando Primers específicos para cada gene de interesse foram utilizados (em anexo). A reação de RT-qPCR foi conduzida no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)*, utilizando o kit "SYBR Green qPCR Master Mix Low ROX" da Nova Biotecnologia. O gene GAPDH foi utilizado como gene de referência (*housekeeping*) para normalização dos dados. A variação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). O software *StepOne™ Software v2.3* foi utilizado para análise dos dados.

### **3.8. Dosagem de Citocinas Th1/Th2 no Sobre-nadante de Macrófagos Infectados e Estimulados**

A quantificação das citocinas IL-6, IL-10 e IL-12 foi feita por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, utilizando kits de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* da BD (*Becton, Dickinson and Company*), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Para cada amostra e para cada citocina, foram realizados ensaios em duplicata. As absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro de microplacas (*Thermo Scientific Multiskan FC Microplate Photometer*) no comprimento de onda recomendado pelo kit (450nm). As concentrações das citocinas foram determinadas através da interpolação dos valores de absorbância em curvas padrão construídas com os padrões recombinantes fornecidos nos kits. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) meio.

### **3.9 Análise Histopatológica do Coração de Camundongos Balb/c Infectados**

Os tecidos fixados foram submetidos a uma série de banhos de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%) para remover a água. Os tecidos desidratados foram imersos em xitol para remover o álcool e tornar os tecidos transparentes. Os tecidos diafanizados foram infiltrados com parafina líquida em estufa a 60°C. Blocos de parafina contendo os tecidos foram seccionados em cortes finos (5 µm) utilizando um micrótomo (Leica-RM2125 RTS). Os cortes histológicos foram montados em lâminas de vidro e submetidos a um processo de desparafinização e reidratação.

As lâminas foram coradas com hematoxilina para evidenciar os núcleos celulares e, em seguida, com eosina para corar o citoplasma e a matriz extracelular. As lâminas coradas foram novamente desidratadas, diafanizadas e montadas com lamínulas utilizando meio de montagem. As lâminas coradas com HE foram analisadas em microscópio de luz (Nikon ECLIPSE E100) usando objectiva de 40x para avaliar a presença de infiltrado inflamatório e alterações histopatológicas. Para quantificar a intensidade da inflamação, um escore inflamatório foi estabelecido. Vinte campos microscópicos aleatórios foram selecionados em cada lâmina, e o número de agregados de leucócitos presentes em cada campo foi contado. A presença de mais de 20 leucócitos em um agregado foi considerada indicativa de infiltração (MICHAILOWSKY et al., 2002). O score inflamatório foi determinado pela média do número agregados de leucócitos por campo.

### **3.10 Dosagem de Citocinas no Plasma de Camundongos Infectados**

Após a coleta das amostras de sangue por punção do plexo orbital dos camundongos Balb/c anestesiados nos tempos de 7, 15 e 30 dias pós-infecção, o plasma foi separado por

centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos e armazenado em alíquotas a -80 °C até o momento da análise.

A quantificação das citocinas inflamatórias IL-6, IL-10, IL-18, e IL-1 $\beta$  no plasma dos camundongos foi realizada utilizando a técnica *de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* sendo IL-6 e IL-10 avaliados por kits da BD (*Becton, Dickinson and Company*) (IL-6 e IL-10) e *IL-18 e IL-1B por kits* da *Thermo Fisher Scientific* (IL-18, e IL-1 $\beta$ ) seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Para cada amostra de plasma e para cada citocina, foram realizados ensaios em duplicata. As absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro de microplacas (*Thermo Scientific Multiskan FC Microplate Photometer*) no comprimento de onda (450nm) recomendado para cada kit. As concentrações das citocinas foram determinadas através da interpolação dos valores de absorbância em curvas padrão construídas com os padrões recombinantes fornecidos nos kits. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL) de plasma.

### **3.11.1. Determinação do Parasitismo por qPCR em Tecidos de Camundongos Balb/c**

Amostras de tecido (pata, sangue, coração, baço e fígado) dos camundongos Balb/c nos tempos experimentais (7, 15 e 30 dias após a infecção) foram retiradas do freezer, mantidas em gelo e macerado. O DNA total foi extraído das amostras de tecido usando tampão de lise contendo SDS para romper as membranas, e Proteinase K para degradação das proteínas associadas ao DNA e na inativação de nucleases, o DNA foi então precipitado com álcool etílico absoluto e centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e a concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas por espectrofotometria da *Thermo Scientific NanoDrop Series Spectrophotometers*.

A quantidade de DNA de *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* em cada amostra de tecido foi determinada por qPCR. Primers específicos para cada parasita foram utilizados para amplificar regiões específicas do DNA parasitário (em anexo). A reação de qPCR foi conduzida no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)*, utilizando o kit "SYBR Green qPCR Master Mix Low ROX" da Nova Biotecnologia. Os dados foram expressos como a quantidade relativa de DNA parasitário em relação ao DNA total da amostra de tecido. A relação entre a carga parasitária e os diferentes tratamentos experimentais foi avaliada por meio de análise de regressão linear, com as fórmulas construída a partir de uma curva padrão.

### **3.11.2. Quantificação da Expressão Gênica por RT-qPCR em Tecidos**

Amostras de tecido (pata, sangue, coração, baço e fígado) dos camundongos Balb/c nos

tempos experimentais (7, 15 e 30 dias após a infecção) foram retiradas do freezer, mantidas em gelo e macerado. O RNA total foi extraído homogeneizando a amostra em TRIzol para lise celular e inativação de RNases. A seguir, foi adicionado clorofórmio para a separação das fases, onde o RNA permaneceu na fase aquosa (superior). O RNA foi precipitado com álcool isopropílico e o *pellet* foi lavado com etanol 75%. Por fim, o RNA foi ressuspensos em água livre de Rnase e a concentração e a pureza do RNA extraído foram determinadas por espectrofotometria da *Thermo Scientific NanoDrop Series Spectrophotometers*. A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído, utilizando o kit comercial "*qScript cDNA Synthesis Kit*" da Nova Biotecnologia, seguindo as instruções do fabricante.

A expressão gênica dos genes de inflamassomas (ASC, NLRP1, NLRP3 e NLRP9) e genes de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) e genes de perfil de macrófagos M1(iNos) e M2 (Ym1 e Arginase-1) foi quantificada por RT-qPCR usando primers específicos para cada gene de interesse foram utilizados (em anexo). A reação de RT-qPCR foi conduzida no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)*, utilizando o kit "*SYBR Green qPCR Master Mix Low ROX*" da Nova Biotecnologia. O gene GPDH foi utilizado como gene de referência (*housekeeping*) para normalização dos dados. A variação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). O Software *StepOne™ Software v2.3* foi utilizado para análise dos dados.

### **3.12. Análise Estatística**

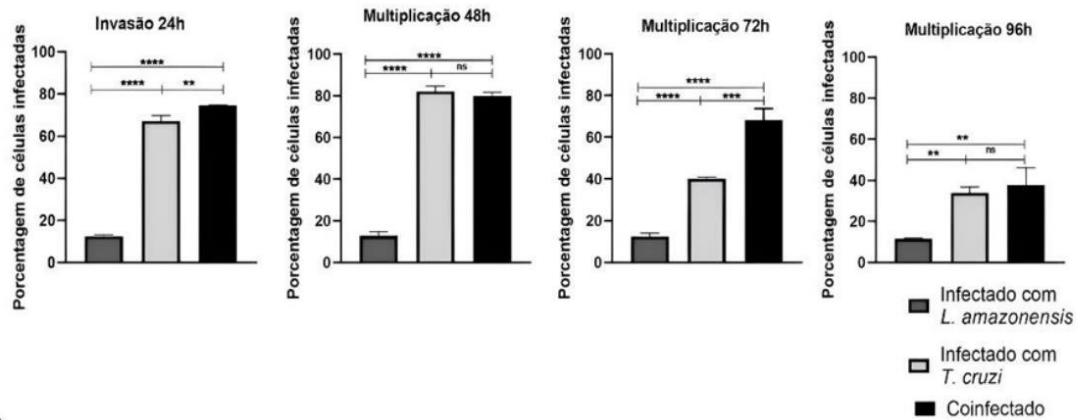
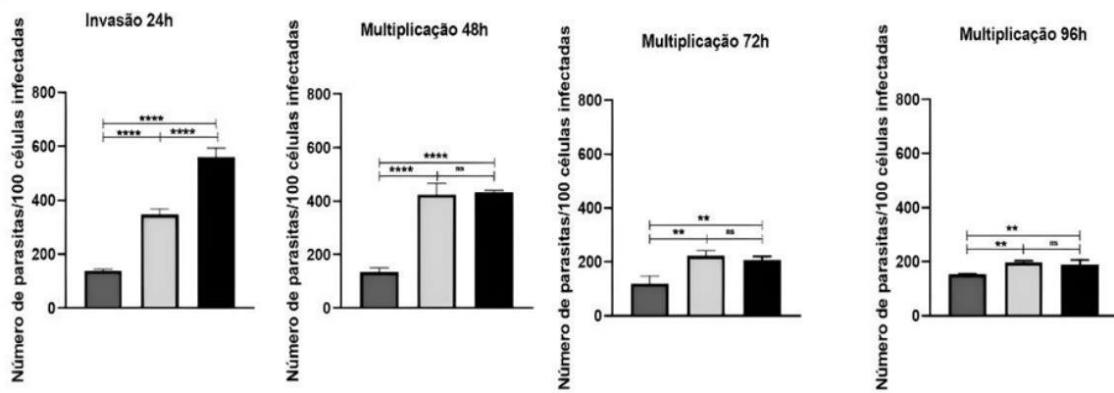
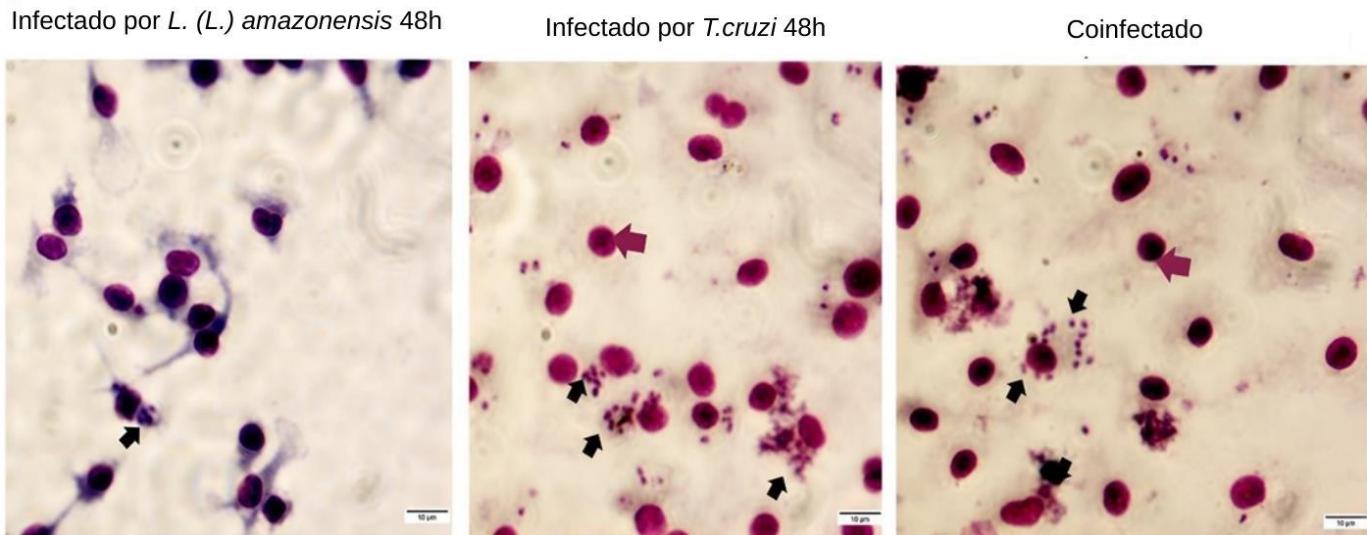
Os dados obtidos nos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram submetidos à análise estatística utilizando o Software GraphPad Prism, versão 8, com a normalidade da distribuição dos dados sendo avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. Para comparações entre dois grupos, o teste t de Student foi utilizado para dados com distribuição normal, enquanto o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado para dados sem distribuição normal. Já para comparações entre múltiplos grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida dos testes post-hoc de Tukey ou Sidak, para dados com distribuição normal; para dados sem distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Em todos os casos, os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, com um valor de  $p < 0.05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

## **4. Resultados**

### **4.1. *T. cruzi* apresenta maior capacidade replicativa que *L. (L.) amazonensis* em infecção única de macrófagos**

A coinfecção por diferentes patógenos é uma realidade complexa que pode influenciar significativamente a progressão da doença e a resposta do hospedeiro. Nesse estudo investigamos se a interação de *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* com macrófagos, células que desempenham um papel central na resposta imune inata contra ambos os parasitas, no entanto, *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* desenvolveram mecanismos para sobreviver e se replicar dentro dessas células, estabelecendo infecções persistentes. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados *in vitro* com *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*, individualmente e em coinfecção. Avaliamos a porcentagem de células infectadas e o número de parasitas em cada 100 células infectadas em diferentes tempos após a infecção.

Conforme ilustrado na Figura 5, observou-se diferenças significativas na capacidade de infecção e proliferação entre *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*. Em infecções individuais, *T. cruzi* demonstrou maior capacidade de invadir e de se multiplicar dentro dos macrófagos quando comparado com *L. (L.) amazonensis*. Essa diferença foi evidente tanto na porcentagem de células infectadas quanto no número de parasitas por célula. Em coinfecções, a carga parasitária total foi significativamente maior em comparação com a infecção por *L. (L.) amazonensis*. No entanto, não houve diferença significativa em relação à infecção por *T. cruzi* isolado, sugerindo que este último é o principal responsável pelo aumento observado na coinfecção.

**A****B****C**

**Figura 5 Capacidade de Invasão e Multiplicação de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em Macrófagos RAW 264.7.** (A) Gráficos mostrando a porcentagem de macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* ou ambos (Coinfectado) nos tempos de 24 horas (Invasão), 48, 72 e 96 horas (Multiplicação) pós-infecção. (B) Gráficos mostrando o número de parasitas por 100 macrófagos infectados nos mesmos pontos de tempo. Os dados nos gráficos (Painéis A e B) representam a média ± o desvio padrão da média (SD) de três experimentos independentes, com a contagem de pelo menos 100 células por condição experimental em cada experimento. As significâncias estatísticas foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey: ns = não significativo, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  e \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . (C) Fotomicrografias representativas de macrófagos RAW 264.7 infectados aos diferentes tempos, corados com Giemsa. As setas pretas indicam os parasitas intracelulares e a seta vermelha aponta para o núcleo do macrófago. A barra de escala em cada imagem representa 10  $\mu$ m.

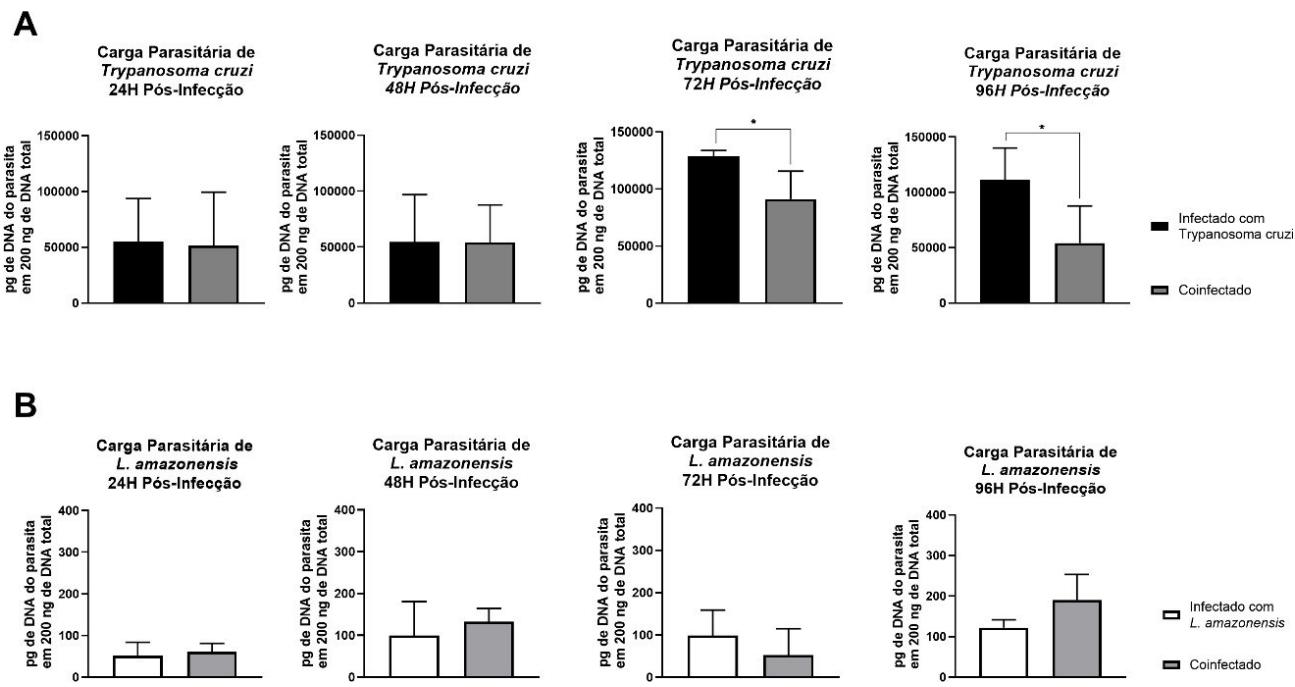
#### **4.2. *L. (L.) amazonensis* altera o ambiente intracelular, tornando-o menos permissivo à replicação de *T. cruzi* nas fases mais tardias da infecção**

Para confirmarmos a contribuição de cada parasita na coinfecção e distinguir a carga específica de *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* dentro dos macrófagos coinfetados, realizamos ensaios de qPCR utilizando primers específicos para cada patógeno. Conforme apresentado na figura 6, a quantificação da carga parasitária por qPCR revelou padrões distintos para cada parasita nos diferentes tempos pós-infecção.

Para *T. cruzi* (figura 6A), na infecção isolada, observou-se uma tendência de aumento da carga parasitária ao longo do tempo. Em 72 horas pós-infecção, a carga de *T. cruzi* no grupo infectado isoladamente foi significativamente maior em comparação com o grupo coinfetado ( $p < 0.05$ ). Similarmente, em 96 horas pós-infecção, a carga de *T. cruzi* no grupo infectado isoladamente também foi significativamente maior em comparação com o grupo coinfetado ( $p < 0.05$ ). Nos tempos iniciais de 24 horas e 48 horas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na carga de *T. cruzi* entre os grupos infectados isoladamente e coinfetados.

Por outro lado, a quantificação de *L. (L.) amazonensis* por qPCR (figura 6B) demonstrou que a carga parasitária desse protozoário se manteve em níveis baixos e estáveis em todos os tempos avaliados (24h, 48h, 72h e 96h pós-infecção), tanto nas infecções individuais quanto nas coinfecções. Em nenhum dos pontos de tempo houve diferença estatisticamente significativa na carga de *L. (L.) amazonensis* entre os grupos infectados isoladamente e coinfetados.

A observação de que a carga de *T. cruzi* é significativamente menor nos macrófagos coinfetados com *L. (L.) amazonensis* em 72h e 96h pós-infecção sugere uma interferência ou modulação negativa da presença de *L. (L.) amazonensis* sobre a replicação ou sobrevivência de *T. cruzi* nas fases mais tardias da infecção *in vitro*. Isso pode indicar uma competição por recursos celulares, uma alteração no ambiente intracelular do macrófago (como mudanças em vias metabólicas ou de resposta imune), ou até mesmo um mecanismo de inibição direta ou indireta de *L. (L.) amazonensis* sobre *T. cruzi* nessas células.



**Figura 6: Avaliação da Carga Parasitária de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em Macrófagos RAW 264.7 ao Longo do Tempo.** (A) Carga parasitária de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos infectados apenas com *Trypanosoma cruzi* (barras pretas) ou coinfectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (barras cinzas); (B) Carga parasitária de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em macrófagos infectados apenas com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (barras brancas) ou coinfectados com *Trypanosoma cruzi* (barras cinzas). A quantificação da carga parasitária por qPCR foi realizada utilizando curvas padrão específicas para o DNA de cada parasita. As curvas padrão foram geradas a partir de diluições conhecidas de DNA purificado dos respectivos parasitas, permitindo a extração da quantidade de DNA parasitário nas amostras infectadas os dados representam a média ± o desvio padrão da média (SD) de três experimentos independentes, com três réplicas técnicas por condição experimental. As significâncias estatísticas foram determinadas pelo teste t de Student com um nível de significância de  $p < 0,05$ . Os asteriscos representam a significâncias estatísticas.

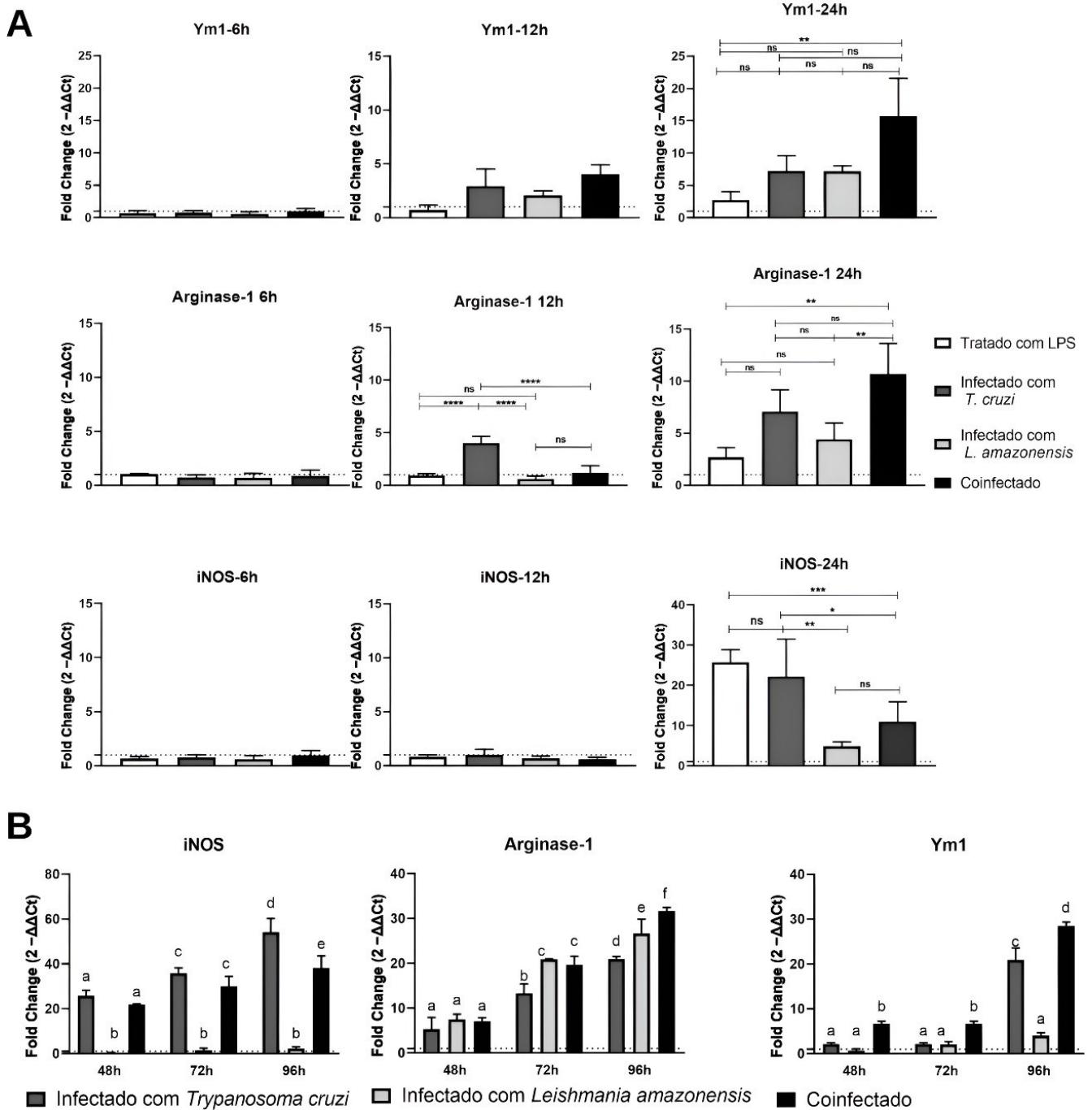
#### 4.3. Coinfecção promove perfil misto de ativação M1/M2 em macrófagos

A resposta imune do hospedeiro a infecções parasitárias intracelulares, como aquelas causadas por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*, é um processo complexo e dinâmico que depende fundamentalmente da polarização de macrófagos. O perfil M1, que é pró-inflamatório, é necessário para o controle da infecção, enquanto o perfil M2 pode, por outro lado, favorecer a persistência do patógeno.

Considerando que o perfil de ativação desses fagócitos pode ser explorado pelos parasitas para garantir sua sobrevivência, avaliamos o perfil dominante em coinfecções. Para isso, quantificamos pelo método Delta Delta Ct a expressão gênica de marcadores-chave: iNOS para o perfil M1 e Arginase 1 (Arg-1) e Ym1 para o perfil M2.

A análise de dados (Figura 7A) demonstram que a coinfecção estabelece um fenótipo de macrófago misto, mas com um claro favorecimento do perfil M2, mantido de forma prolongada (Figura 7B). Em relação ao marcador do perfil M1 (iNOS), foi significativamente suprimido na coinfecção em comparação com a infecção única por *T. cruzi*. A tendência de supressão observada nas primeiras 24 horas permaneceu consistente e evidente ao longo de todo o período de 96 horas, o que sugere que a coinfecção impede de forma sustentada a ativação da via M1, necessário para a eliminação de parasitas intracelulares. Em contraste, os marcadores do perfil M2, como Arginase-1 e YM 1, apresentaram uma indução acentuada e sustentada na coinfecção. Os altos níveis de expressão observados nas primeiras 24 horas mantiveram-se elevados até 96 horas. Essa indução prolongada sugere que o ambiente intracelular criado pela coinfecção favorece de forma persistente a diferenciação de macrófagos para um estado de reparo e imunossupressão, o que pode comprometer a eficácia da resposta imune do hospedeiro contra os parasitas.

Os dados sugerem que a coinfecção não apenas altera a resposta imune celular, mas estabelece um novo equilíbrio imunológico caracterizado por uma supressão sustentada do perfil M1 e uma indução persistente do perfil M2 ao longo de todo o ciclo de infecção.



**Figura 7: Análise da expressão gênica de macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* e/ou *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** (A) Expressão relativa dos genes Ym1, Arginase-1 e iNOS em macrófagos *in vitro* após infecção. Os macrófagos foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS) 100ng/ml ou infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ou coinfetados com ambos por 6, 12 e 24 horas. (B) Cinética de Expressão relativa dos genes iNOS, Arginase-1 e Ym1 em macrófagos *in vitro* infectados por 48, 72 e 96 horas. Os macrófagos foram infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ou coinfetados. Os níveis de expressão foram determinados por RT-qPCR e normalizados pelo gene de referência GAPDH ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada usando ANOVA de uma via (A) e duas vias (B) com o teste de Tukey post-hoc. O asterisco (\*) indica a significância entre as condições: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  e ns (não significativo). Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística entre os grupos no mesmo ponto de tempo e letras iguais indicam ausência de diferença estatística.

#### **4.4. Coinfecção Modula a Expressão de Genes Relacionados ao Inflamassoma**

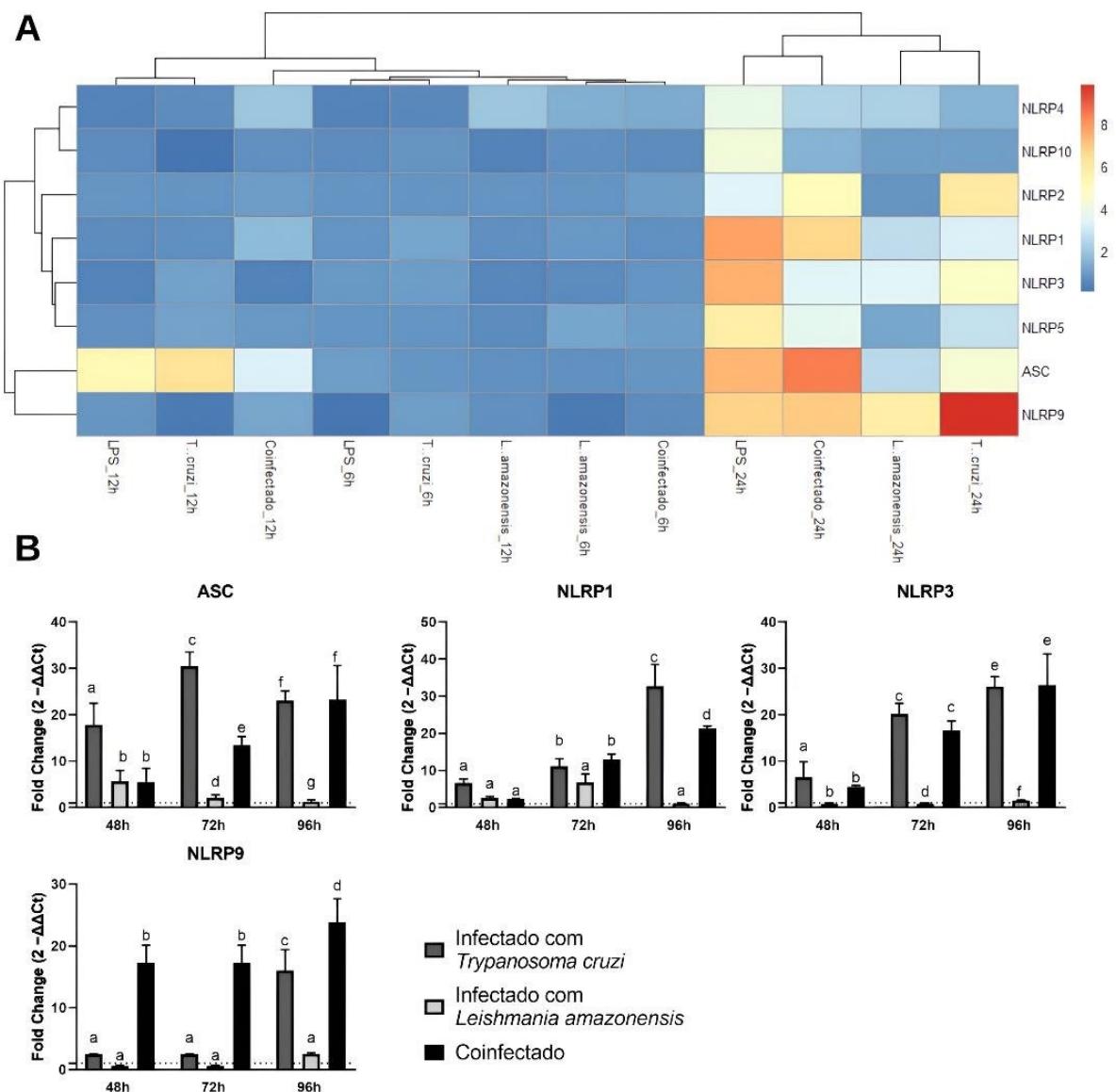
Os inflamassomas são complexos proteicos intracelulares que atuam como sentinelas do sistema imune inato. Ao detectar sinais de perigo, como componentes de patógenos (vírus, bactérias e parasitas) ou danos celulares, eles se ativam e desencadeiam uma resposta inflamatória robusta, culminando na liberação de citocinas importantes como a IL-1beta e a IL-18. Com intuito de determinar quais inflamassomas são ativados e como a coinfeção modula essa resposta imunológica, avaliamos a expressão gênica de NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP5, NLRP9, NLRP10 e a proteína adaptadora ASC. A análise do mapa de calor revela uma clara progressão temporal e uma modulação específica da expressão gênica em cada condição experimental. Nos pontos de tempo iniciais de 6 e 12 horas, a resposta imune é incipiente, mas já se observa uma leve indução da expressão gênica, aproximadamente duas vezes maior que o controle (Figura 8A). Isso indica que, embora a resposta seja modesta, ela já está em curso. O padrão de cores em tons de azul, que domina o gráfico, indica que a ativação de genes como NLRP1, NLRP3, NLRP4, NLRP5, NLRP9 e a proteína adaptadora ASC está em níveis mínimos. Este achado sugere que, nas fases iniciais da infecção, o sistema imunológico ainda não ativou de forma robusta as vias do inflamassoma.

Aos 24h, o cenário de expressão gênica se altera drasticamente e apresenta padrões distintos entre os grupos. Na infecção isolada por *T. cruzi*, observa-se a ativação máxima de ASC, NLRP1, NLRP3 e NLRP9. A coluna de *T. cruzi* em 24h é dominada por cores quentes, com o gene NLRP9 e a proteína ASC atingindo seus mais altos níveis de expressão, representados por um tom de vermelho intenso. Esse resultado comprova que *T. cruzi* é um potente indutor do inflamassoma, e a resposta do hospedeiro a este parasita é excepcionalmente robusta e generalizada.

Em contrapartida, a infecção isolada por *L. (L.) amazonensis* continua a mostrar uma expressão gênica muito baixa. A quase total ausência de cores quentes na coluna referente a esta infecção em 24h indica que *L. (L.) amazonensis* possui mecanismos de evasão imune que evitam a ativação do inflamassoma. Este comportamento pode ser uma das razões para sua capacidade de estabelecer infecções crônicas.

Por fim, a coinfeção com *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* em 24h revela um padrão de ativação distinto e modulado. A expressão de genes como NLRP1, NLRP3, NLRP9 e ASC é significativamente elevada, sugerindo uma resposta robusta do inflamassoma. No entanto, uma comparação direta com a infecção isolada por *T. cruzi* demonstra que, embora a coinfeção

ative os mesmos genes, a intensidade da resposta é menor. A presença de *L. (L.) amazonensis* parece atenuar ligeiramente o pico de ativação do inflamassoma que *T. cruzi* induziria isoladamente. Este achado sugere que a coinfecção não é meramente a soma das duas infecções, mas um evento que modula a resposta, possivelmente resultando em um estado de inflamação menos "explosivo" e mais sustentado.



**Figura 8:Análise da expressão gênica de inflamassomas em macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* e/ou *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** (A) Mapa de calor da expressão relativa dos genes de inflamassomas NLRPs e ASC em macrófagos in vitro. As células foram tratadas com lipopolissacárido (LPS) ou infectadas com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ou coinfetadas com ambos por 6, 12 e 24 horas. A expressão gênica foi determinada por RT-qPCR e o mapa de calor foi gerado no software RStudio. A coloração (escala de azul a vermelho) indica a magnitude da expressão em relação às células controle não-infetadas, conforme a barra de cor. (B) Cinética da expressão relativa dos genes ASC, NLRP1, NLRP3 e NLRP9 em macrófagos infectados por 48, 72 e 96 horas. As células foram infectadas com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ou coinfetadas. A expressão gênica em todos os painéis foi normalizada pelo gene de referência GAPDH (2<sup>-ΔΔCt</sup>). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias com o teste de Tukey post-hoc. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa entre os grupos e letras iguais indicam ausência de diferença estatística

#### **4.5. Coinfecção Modula a Resposta Imune de Forma Paradoxal, Criando Um Perfil Misto e Desequilibrado das Citocinas Th1 e Th2**

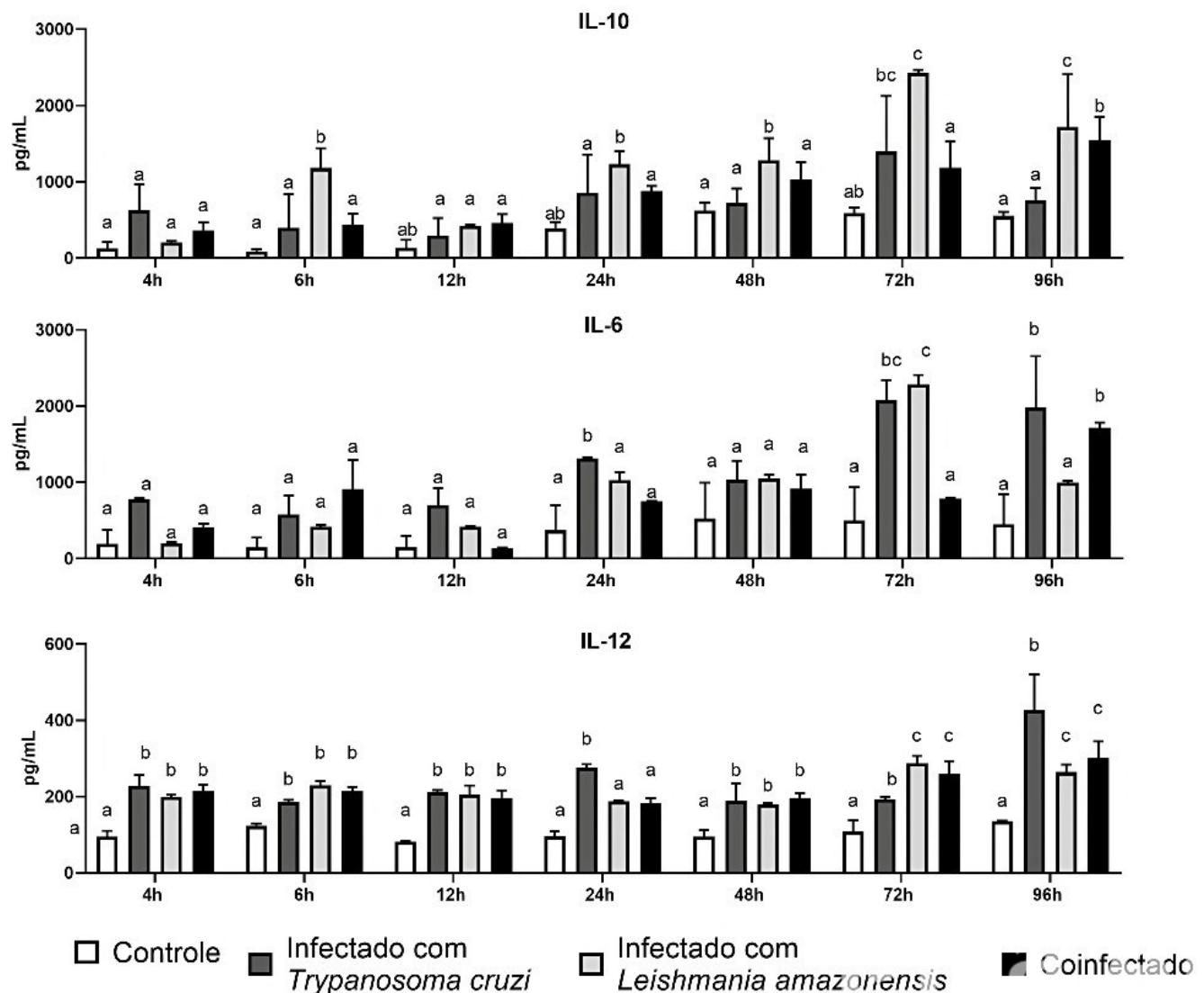
As citocinas são mediadores cruciais da comunicação celular no sistema imunológico, orquestrando a resposta do hospedeiro a infecções e inflamações. Em nosso estudo, investigamos a expressão de citocinas-chave que refletem o balanço entre a resposta pró-inflamatória e a anti-inflamatória. Analisamos a IL-12, uma citocina fundamental para a indução da resposta Th1 e para a ativação de células Natural Killer (NK) e macrófagos, que é essencial no combate a patógenos intracelulares. Em contrapartida, avaliamos a expressão da IL-10, uma citocina com potente ação anti-inflamatória e imunossupressora, que frequentemente limita os danos teciduais, mas pode ser explorada por parasitas para evadir a resposta imune. Por fim, incluímos a IL-6, uma citocina multifuncional com papéis tanto pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios, que atua na diferenciação de células T e na resposta de fase aguda.

A análise da produção de citocinas em macrófagos RAW 264.7 (figura 9) revelou uma modulação distinta da resposta imune em cenários de infecção única e coinfeção, fornecendo informações cruciais sobre a interação celular entre *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*. Os dados demonstram que a infecção única por *T. cruzi* induz uma resposta imunológica pró-inflamatória robusta e de fase aguda, caracterizada por um pico inicial de produção de IL-6 e níveis consistentemente elevados de IL-12 ao longo do tempo

Em contraste, o perfil de citocinas no grupo coinfetado apresenta uma dinâmica significativamente alterada. A coinfeção resultou em uma produção de IL-12 substancialmente mais baixa em comparação com a infecção única por *T. cruzi*. Dado o papel central de IL-12 na indução da resposta Th1, a sua atenuação sugere que *L. (L.) amazonensis* está ativamente manipulando o ambiente do macrófago para suprimir um dos mecanismos-chave de controle de *T. cruzi*. Essa modulação pode ser atribuída à capacidade de *L. (L.) amazonensis* de subverter vias de sinalização, criando um microambiente intracelular menos hostil para a replicação parasitária.

Simultaneamente à supressão de IL-12, a coinfeção induziu uma produção de IL-10 notavelmente maior, especialmente nos estágios finais da infecção. Como principal citocina anti-inflamatória, o aumento de IL-10 é uma forte indicação de que a coinfeção estabelece um ambiente imunossuppressor. Essa resposta pode ser vista como uma estratégia de sobrevivência de *L. (L.) amazonensis*, que se beneficia de uma resposta imune atenuada, mas também pode beneficiar *T. cruzi* ao comprometer o controle da replicação.

Por fim, a dinâmica da IL-6 no grupo coinfectado é particularmente intrigante. Enquanto a infecção por *T. cruzi* sozinha induziu um pico de produção de IL-6 em 24h, a coinfecção levou a um pico mais tardio e significativamente mais elevado (96h). Isso sugere que a coinfeção não apenas suprime certas vias, mas também desregula o cronograma da resposta inflamatória, prolongando a produção de mediadores inflamatórios.



**Figura 9 Análise da produção de citocinas em macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* e/ou *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** Níveis de citocinas IL-10, IL-6 e IL-12 (em pg/mL) em sobrenadantes de cultura de macrófagos. As células foram infectadas in vitro com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ou coinfectadas com ambos por períodos de 4, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. O grupo Controle corresponde a macrófagos não infectados. Os níveis de citocinas foram quantificados por ELISA. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias com o teste de Tukey post-hoc. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

#### **4.6. Coinfecção por *L. (L.) amazonensis* exacerba a miocardite induzida por *T. cruzi***

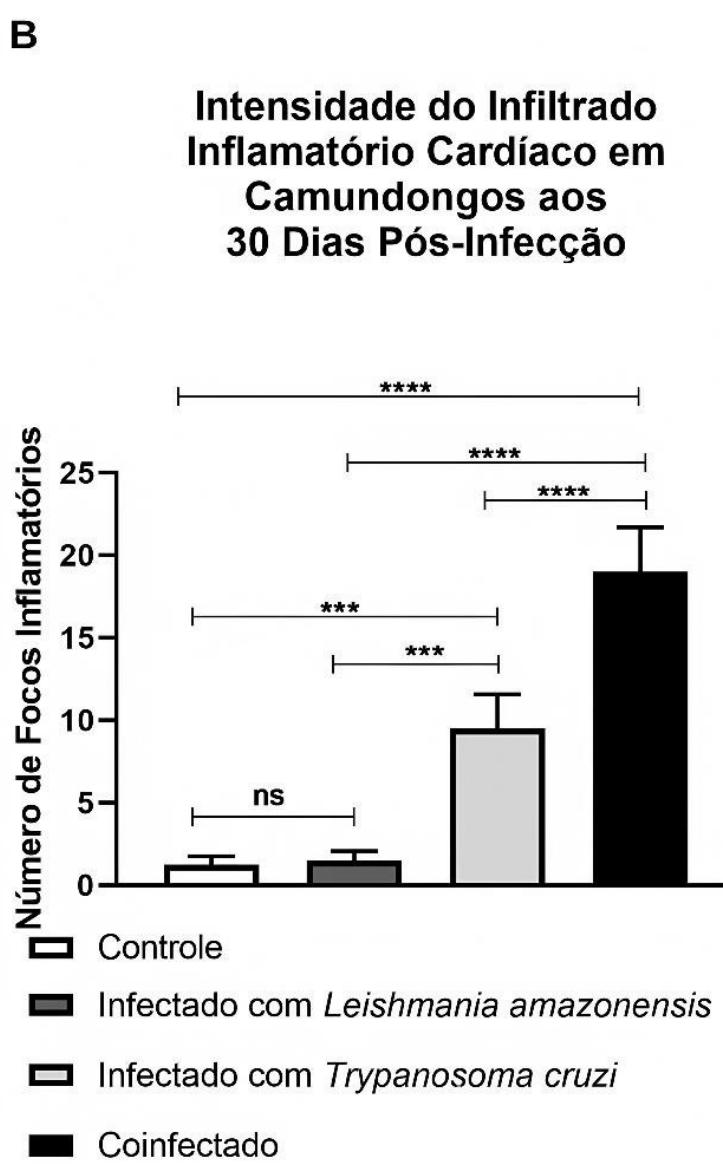
A doença de Chagas, causada pelo protozoário *T. cruzi*, é caracterizada por seu notável tropismo pelo tecido cardíaco, resultando em miocardite inflamatória crônica, fibrose progressiva e disfunção cardíaca. O papel da coinfecção por outros parasitas, como *L. (L.) amazonensis*, na modulação dessa resposta inflamatória ainda é pouco compreendido. Neste estudo, avaliamos o impacto da coinfecção por *L. (L.) amazonensis* na inflamação cardíaca em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi*.

A avaliação do infiltrado inflamatório cardíaco revelou diferenças marcantes entre os grupos experimentais ao longo do tempo. Nos grupos controle e infectado apenas por *L. (L.) amazonensis*, o número de infiltrados inflamatórios permaneceu baixo e constante em todos os tempos avaliados, sem alterações significativas (Figura 10B).

Nos animais infectados por *T. cruzi*, observou-se um aumento progressivo do infiltrado inflamatório no miocárdio, com pico aos 30 dias pós-infecção. No entanto, a coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* resultou em um infiltrado significativamente mais intenso em todos os tempos avaliados, com aumento acentuado aos 30 dias ( $p < 0,0001$ ), atingindo uma média de aproximadamente 19 infiltrados por campo, em comparação aos cerca de 9 infiltrados observados no grupo infectado apenas por *T. cruzi*.

A análise morfológica confirmou esses achados, evidenciando áreas extensas de infiltração leucocitária nos tecidos cardíacos dos animais coinfetados, particularmente no tempo tardio. Esses focos inflamatórios apresentaram maior densidade celular e distribuição mais difusa em comparação aos grupos com infecção única.

Esses dados indicam que a presença de *L. (L.) amazonensis*, embora isoladamente não induza inflamação cardíaca significativa, contribui para amplificar a resposta inflamatória induzida por *T. cruzi* durante a coinfecção. A intensificação da miocardite nesses animais sugere um possível sinergismo patológico entre os parasitas, com implicações diretas para a gravidade da cardiopatia chagásica em cenários de coinfecção.



**Figura 10. Análise Histopatológica da Inflamação Cardíaca em Camundongos.** (A) Mostra cortes histológicos de tecido cardíaco ( $5 \mu\text{m}$ ) corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A coloração com HE permite a visualização de núcleos celulares (em azul-arroxeados) e do citoplasma e matriz extracelular (em tons de rosa). Foram analisados quatro grupos: Controle (sadio), infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, infectado com *Trypanosoma cruzi* e Coinfectado. As setas laranjas indicam os focos de infiltrado inflamatório (agregados de leucócitos). A barra de escala em cada imagem representa  $10\mu\text{m}$ . Apresenta a quantificação da inflamação cardíaca. (B) A intensidade da inflamação foi avaliada pelo escore inflamatório, determinado pela média do número de agregados de leucócitos em 20 campos microscópicos aleatórios de cada lâmina. Um agregado foi considerado como a presença de mais de 20 leucócitos juntos. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa (\*\* para  $p < 0,001$  e \*\*\*\* para  $p < 0,0001$ ) e ns para não significativo, conforme o teste de comparação múltipla de Tukey

#### **4.7. Coinfecção por *L. (L.) amazonensis* sugere tropismo exacerbado de *T. cruzi* para coração e baço**

Com o objetivo de investigar possíveis fatores associados ao agravamento da miocardite observada nos animais coinfecados, foi realizada a quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* em diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados isoladamente ou em coinfecção. As análises foram conduzidas nos dias 7, 15 e 30 pós-infecção por meio de PCR quantitativo (qPCR), utilizando DNA extraído de amostras de coração, pata, sangue, baço e fígado. Os resultados estão apresentados nas Figuras 11A e 11B.

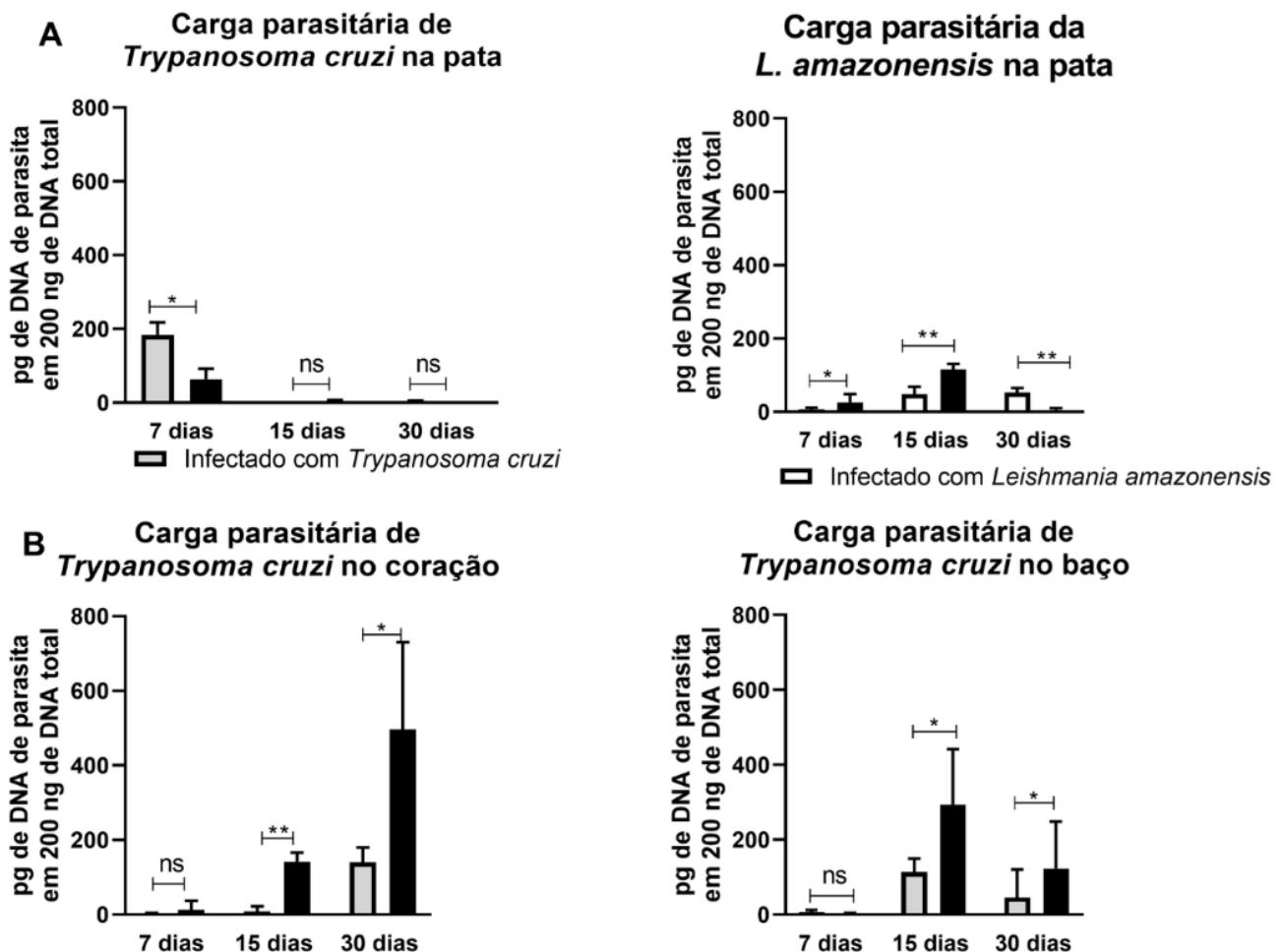
Para *T. cruzi*, a carga parasitária foi detectada em todos os órgãos analisados. No grupo infectado exclusivamente por *T. cruzi*, observou-se acúmulo progressivo do parasita, com maior carga no coração aos 30 dias pós-infecção (média  $\approx$  500 pg/200 ng de DNA total), seguida pelo baço ( $\approx$  100 pg/200 ng), fígado ( $\approx$  50 pg/200 ng), e níveis mais baixos na pata e sangue. Nos animais coinfecados, houve aumento significativo da carga de *T. cruzi* no coração aos 30 dias ( $p < 0,05$ ), atingindo valores médios próximos a 1000 pg/200 ng. Também foi observada tendência de aumento no baço, enquanto os níveis no fígado, pata e sangue foram similares entre os grupos.

Para *L. (L.) amazonensis* (Figura 11), nos animais infectados exclusivamente com *L. (L.) amazonensis*, a maior carga parasitária foi detectada na pata aos 15 dias ( $p < 0,05$ ), com valores médios acima de 100 pg/200 ng e manutenção relativamente alta aos 30 dias ( $\approx$  80 pg/200 ng). Nos demais órgãos (baço, fígado, coração e sangue), a carga parasitária foi baixa ou não detectável (valores abaixo de 15 pg/200 ng), destacando-se que níveis inferiores a 15 pg foram considerados como não detectáveis.

Na coinfecção, houve redução significativa da carga de *L. (L.) amazonensis* no baço ( $p < 0,05$ ) e fígado aos 30 dias (ambos com médias inferiores a 5 pg/200 ng). Na pata, observou-se uma tendência de redução na carga parasitária, porém sem diferença estatística significativa. No coração e sangue, os níveis de *L. (L.) amazonensis* permaneceram baixos e semelhantes entre os grupos ao longo de toda a infecção.

Esses resultados indicam que, enquanto *L. (L.) amazonensis* se concentra predominantemente na pata, com carga parasitária detectável principalmente no grupo infectado isoladamente, a coinfecção com *T. cruzi* reduz a disseminação sistêmica de *L. (L.)*

*amazonensis*. Por outro lado, a presença de *L. (L.) amazonensis* parece favorecer o aumento da carga de *T. cruzi* em órgãos-alvo como coração e baço, contribuindo possivelmente para o agravamento da inflamação e fibrose cardíaca observados no modelo de coinfecção.



**Figura 11. Carga Parasitária de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em Tecidos de Camundongos Balb/c Infectados e Coinfectados.** (A) Carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na pata, (B) Carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* no coração e baço. A quantificação foi realizada nos dias 7, 15 e 30 após a infecção para os grupos de animais infectados apenas com *T. cruzi*, infectado por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e para os coinfectados. A carga parasitária foi determinada utilizando uma curva padrão para calcular o número de equivalentes de parasitas por grama de tecido, expressos em pg de DNA de parasita por 200 ng de DNA total do tecido. Os dados foram submetidos a análise estatística utilizando ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

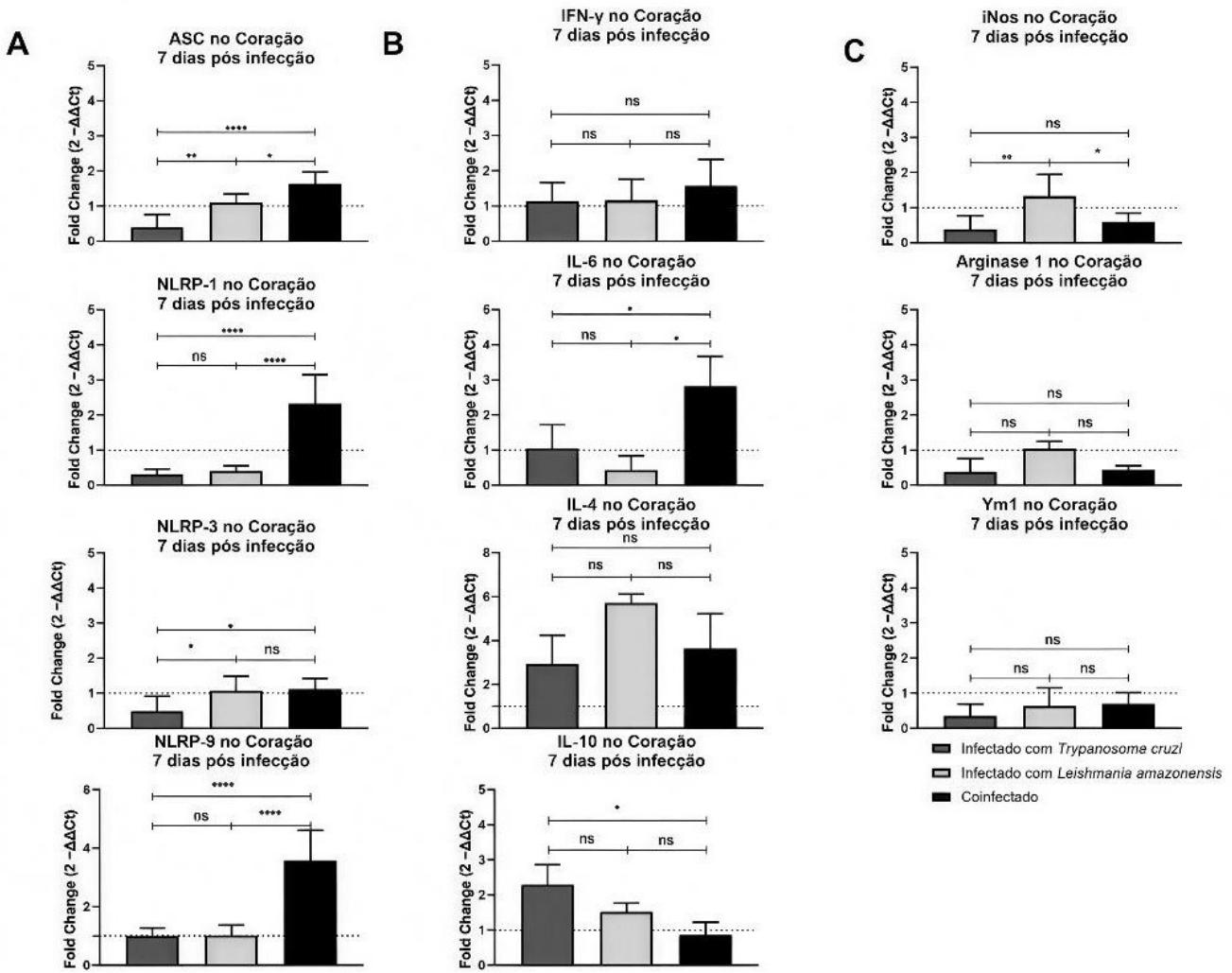
#### **4.8. A inflamação no coração dos coinfecções é ativada de forma excessiva, mas a resposta que seria necessária para controlar a replicação do parasita está inibida**

Considerando a observação prévia de exacerbação da infiltração leucocitária e maior parasitemia de *T. cruzi* no coração e baço, focamos posteriormente na elucidação dos mecanismos inflamatórios subjacentes, direcionando-se para a avaliação da ativação do inflamasoma, citocinas e o perfil de macrófagos, no coração, baco e pata.

O coração, apresentou uma resposta imunológica particularmente desregulada na coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*. Os dados indicam que a presença de ambos os parasitas leva a um cenário de inflamação amplificada e resposta imune efetora comprometida, que se correlaciona com uma carga parasitária significativamente maior de *T. cruzi* neste tecido.

A coinfecção desencadeou uma ativação massiva de genes do inflamasoma (Figura 12A), essenciais para a resposta imune inata. Observamos uma hiper-regulação dramática de ASC, NLRP-1 e NLRP-9, que atingiram níveis muito superiores aos encontrados nas infecções isoladas. Essa intensa ativação da via inflamatória foi confirmada pelo aumento significativo na expressão de IL-6, uma citocina central na resposta inflamatória.

Apesar dessa inflamação generalizada, a capacidade do hospedeiro de combater o parasita de forma eficaz pareceu estar comprometida. Notavelmente, a expressão de iNOS, um marcador necessário para a polarização de macrófagos M1 e para a eliminação de *T. cruzi*, foi suprimida no grupo coinfetado (Figura 12C). Esses dados sugerem que a coinfecção no coração cria um ambiente patológico no qual o hospedeiro é confrontado com uma inflamação intensa e ineficaz, que não é capaz de controlar a proliferação parasitária. Este cenário pode explicar a maior gravidade da doença observada em modelos de coinfecção, destacando o papel crítico das interações entre parasitas na modulação da resposta imune em órgãos vitais.



**Figura 12 Expressão relativa de genes no coração de camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (L.) amazonensis* ou coinfectados.** Os gráficos mostram o fold change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de ASC, NLRP1, NLRP3, NLRP9 (inflamassomas), IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4, IL-10 (citocinas) e iNOS, Arginase-1, Ym1 (marcadores M1/M2). O RNA cardíaco foi extraído, convertido em cDNA e analisado por RT-qPCR com SYBR Green, usando GAPDH como gene de referência. A linha pontilhada indica a expressão basal do controle não infectado. Dados apresentados como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo, 7 dias pós-infecção). Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001; ns = não significativo).

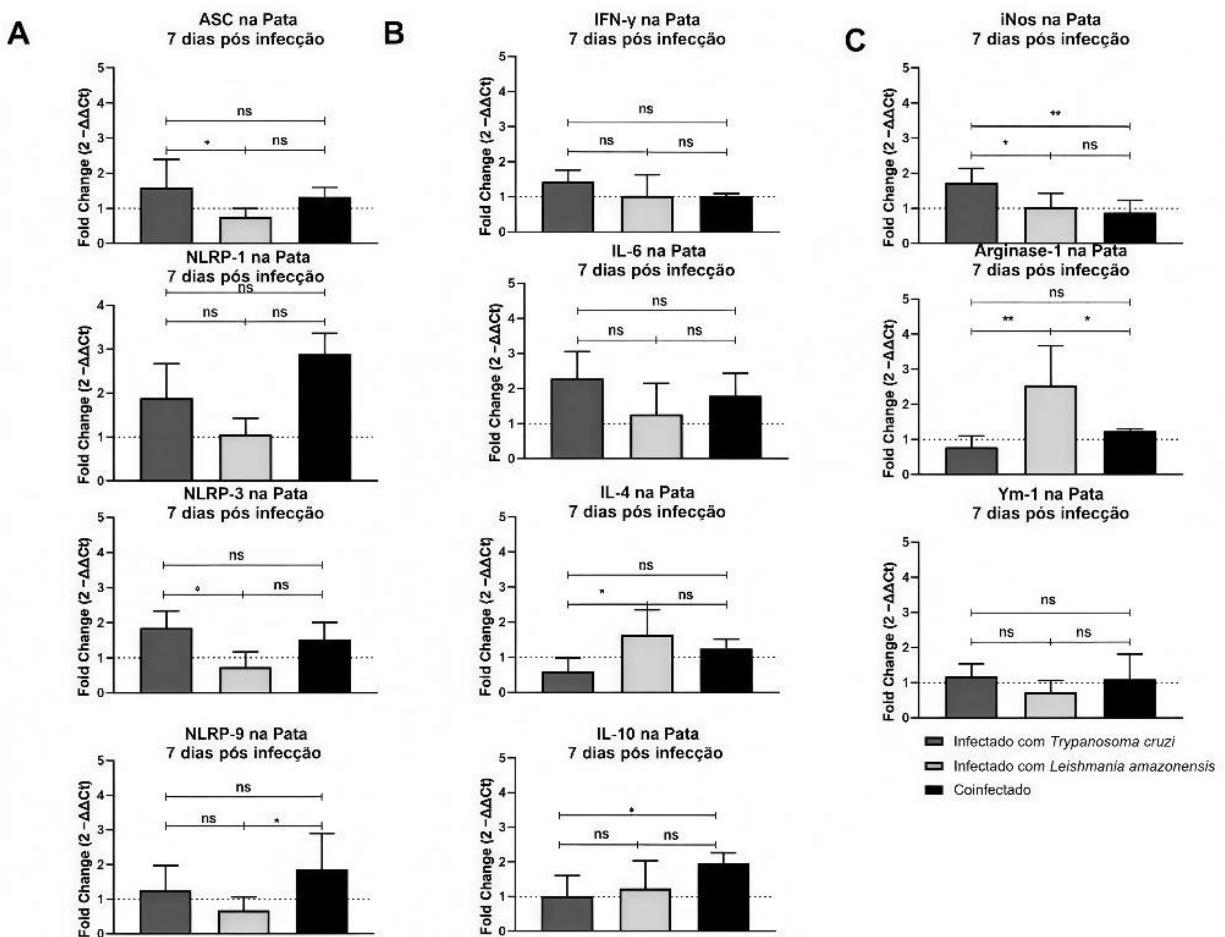
#### 4.9. A coinfecção estabelece um cenário imunológico atenuado e desequilibrado no local da infecção

A análise da pata, como sítio inicial da infecção, revela que a coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* não resulta em uma resposta imune intensa e eficaz, mas sim em uma supressão de importantes vias de defesa. Os dados demonstram que, nesse local, os parasitas interagem de forma a prejudicar a capacidade do hospedeiro de montar uma resposta imune clara e coordenada.

Um dos achados mais notáveis é que a coinfeção impede que os macrófagos, células cruciais para o controle da infecção, se polarizem eficientemente (Figura 13C). A expressão de iNOS, um marcador do perfil M1 (pró-inflamatório), e de Arginase-1, um marcador do perfil M2 (anti-inflamatório), foi significativamente menor nos camundongos coinfetados em comparação com as infecções isoladas. Isso indica que, ao invés de uma resposta M1 para combater *T. cruzi* ou uma resposta M2 para controlar *L. (L.) amazonensis*, a coinfeção leva a uma espécie de "anulação" das vias de defesa, deixando a resposta imune local desorganizada.

A supressão imunológica na pata também se reflete no perfil de citocinas (Figura 13B). A expressão de IL-4, uma citocina central para a resposta Th2 e para o controle da leishmaniose, foi significativamente reduzida. Embora não tenha havido uma ativação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  ou IL-6, essa supressão da IL-4 reforça a ideia de que a resposta imune modulada pela *L. (L.) amazonensis* está sendo atenuada pela presença de *T. cruzi*.

A análise dos genes do inflamasoma confirma a natureza desequilibrada da resposta na pata (Figura 13A). A coinfeção supriu a expressão de NLRP-3, que é um componente importante na resposta contra *T. cruzi*. No entanto, a expressão de NLRP-9 foi aumentada. Essa modulação seletiva e, em certa medida, contraditória, das vias de inflamação sugere que a coinfeção ativa e inibe diferentes caminhos, resultando em uma resposta que não é capaz de controlar efetivamente nenhum dos parasitas. Isso sugere que na pata, que é o primeiro palco de uma interação parasitária que leva a uma resposta imune inicial atenuada e desequilibrada. A incapacidade de polarizar macrófagos e a supressão de citocinas-chave pode ser o fator necessário que permite a disseminação dos parasitas e contribui para a patologia mais grave observada em órgãos vitais como o coração.



**Figura 13 Expressão relativa de genes na pata de camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (L.) amazonensis* ou coinfectados.** Os gráficos mostram o fold change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) da expressão de ASC, NLRP1, NLRP3, NLRP9 (inflamassomas), IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4, IL-10 (citocinas) e iNOS, Arginase-1, Ym1 (marcadores M1/M2). O RNA foi extraído do tecido da pata, convertido em cDNA e analisado por RT-qPCR com SYBR Green, utilizando GAPDH como gene de referência. A linha pontilhada indica a expressão basal do grupo controle não infectado. Dados apresentados como média  $\pm$  DP ( $n = 5$  animais/grupo, 7 dias pós-infecção). Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns = não significativo)

#### 4.10. A coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* inibe certas vias de resposta imunológica no baço

A análise da resposta imune no baço, um órgão linfoide secundário necessário, revela um padrão de modulação e atenuação distinto daquele observado no coração. A coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* parece inibir certas vias de resposta imunológica, em vez de amplificá-las.

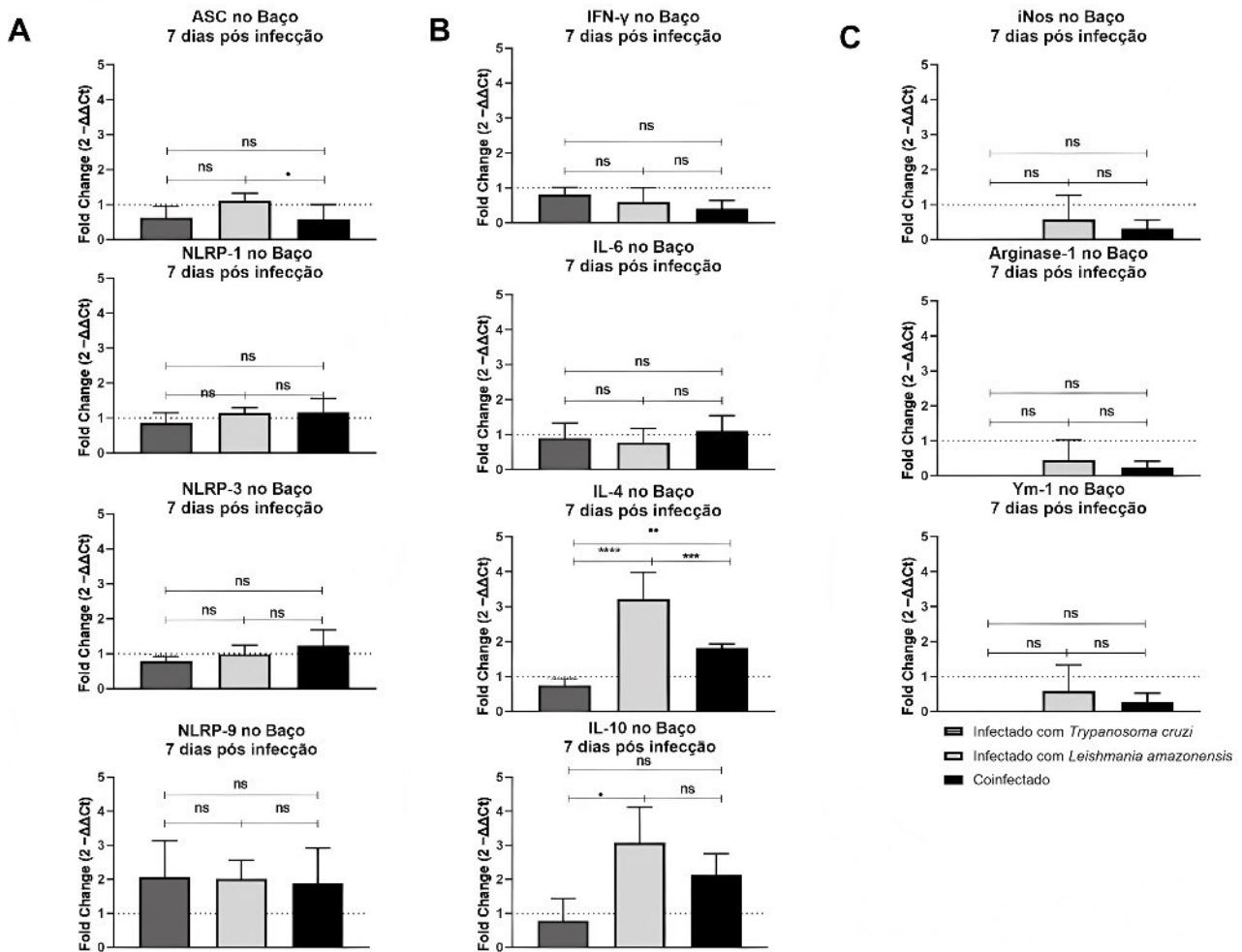
A expressão de citocinas no baço (Figura 14B) demonstra uma supressão da resposta Th2. A infecção isolada por *L. (L.) amazonensis* induziu níveis significativamente mais altos

de IL-4 e IL-10, citocinas associadas à resposta Th2 e anti-inflamatória, respectivamente. No entanto, a presença de *T. cruzi* na coinfecção pareceu anular essa resposta, com a expressão de IL-4 e IL-10 sendo reduzida para níveis similares aos da infecção por *T. cruzi* isolada.

Em contraste com a dramática ativação de inflamasomas no coração, a resposta no baço foi mais contida (Figura 14B). Embora a coinfecção tenha induzido um aumento significativo na expressão de ASC, a expressão dos genes NLRP-1, NLRP-3 e NLRP-9 não foi significativamente alterada. Isso sugere uma ativação parcial e não coordenada da via do inflamasoma no baço.

No que se refere à polarização de macrófagos (14C), a coinfecção não teve um impacto notável na expressão de iNOS e Arginase-1. Diferentemente da pata e do coração, onde a polarização foi alterada, o baço manteve um perfil de expressão estável, indicando uma resposta de macrófagos menos reativa.

o baço apresenta um perfil imunológico de modulação e atenuação, com a coinfecção suprimindo a resposta de citocinas-chave que seriam importantes para o controle de *L. (L.) amazonensis*, mas sem a ativação maciça de inflamasomas e a alteração da polarização de macrófagos observada em outros órgãos.



**Figura 14 Expressão relativa de genes no baço de camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (L.) amazonensis* ou coinfectados.** Os gráficos mostram o fold change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) da expressão de ASC, NLRP1, NLRP3, NLRP9 (inflamassomas), IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4, IL-10 (citocinas) e iNOS, Arginase-1, Ym1 (marcadores M1/M2). O RNA esplênico foi extraído, convertido em cDNA e analisado por RT-qPCR com SYBR Green, tendo GAPDH como gene de referência. A linha pontilhada indica a expressão basal do grupo controle não infectado. Dados apresentados como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo, 7 dias pós-infecção). Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001; ns = não significativo).

#### 4.11. A Coinfecção induz uma resposta inflamatória sistêmica prolongada e desregulada

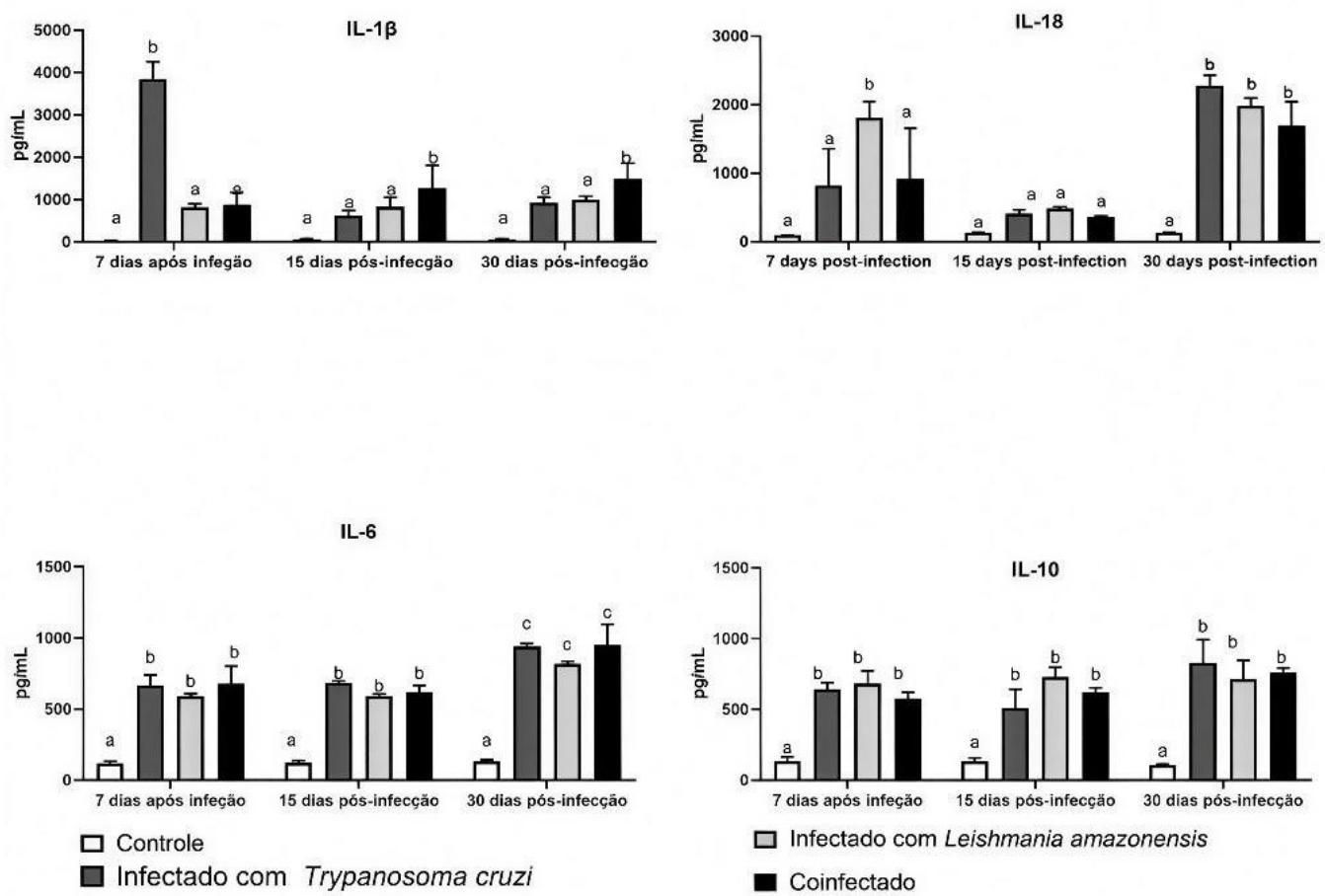
A analisamos o perfil de citocinas séricas para avaliar a resposta inflamatória sistêmica em camundongos coinfectados por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*, comparando-a com as infecções isoladas ao longo de 30 dias. A dosagem dessas citocinas na circulação sanguínea permite uma visão abrangente de como a resposta imune do hospedeiro se manifesta em todo o organismo, para além dos tecidos específicos.

O perfil de citocinas séricas demonstrou uma clara exacerbão da inflamação em fases tardias da coinfecção. Embora os níveis de IL-1beta e IL-18 fossem inicialmente mais elevados

na infecção isolada por *T. cruzi* aos 7 dias, o grupo coinfetado apresentou uma tendência de aumento contínuo dessas citocinas (Figura 15). Aos 30 dias, os níveis de IL-18 no grupo coinfetado foram significativamente maiores do que nas infecções isoladas, indicando uma ativação sistêmica prolongada e amplificada da via do inflamasoma. De forma similar, a coinfecção induziu uma elevação acentuada de IL-6. Aos 30 dias, os níveis séricos de IL-6 no grupo coinfetado foram os mais altos entre todos os grupos, sugerindo uma inflamação sistêmica mais acentuada e duradoura.

Em um aparente esforço para controlar essa inflamação, os níveis de IL-10 foram consistentemente elevados em todos os grupos de infecção em comparação com o grupo controle. O grupo coinfetado, em particular, manteve níveis de IL-10 significativamente altos aos 30 dias, comparáveis aos da infecção por *L. (L.) amazonensis* isoladamente. A persistência de altos níveis de IL-10 em um contexto de inflamação sistêmica crescente, evidenciada pela elevação de IL-18 e IL-6, sugere que a resposta regulatória é insuficiente para controlar a resposta inflamatória exacerbada.

Os resultados séricos corroboram as análises teciduais, sugerindo que a coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* leva a uma resposta imunológica inata desregulada e prolongada. A ativação sustentada de citocinas pró-inflamatórias na circulação, em conjunto com uma resposta regulatória que não consegue controlar efetivamente a inflamação, pode ser um fator-chave na patogênese mais grave observada em modelos de coinfecção.



**Figura 15 Níveis séricos de citocinas em camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (L.) amazonensis* ou coinfectados.** As concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 e IL-10 foram determinadas por ELISA nos tempos de 7, 15 e 30 dias pós-infecção em animais controles, infectados individualmente ou coinfectados. Os resultados são expressos em pg/mL (média  $\pm$  DP; n = 5 animais/grupo). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey, e letras distintas sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## 5. Discussão

A coinfecção por múltiplos patógenos é um cenário clinicamente relevante em regiões endêmicas, e o estudo de suas interações é fundamental para a compreensão da modulação da resposta imune e da patobiologia das doenças. Nesse contexto, a alta prevalência da co-endemia por *T. cruzi* e *Leishmania spp.*, documentada em estudos recentes como o de FERRER et al. (2024), justifica a necessidade de aprofundar a investigação sobre a sua interação no hospedeiro. Reconhecendo essa realidade epidemiológica, investigamos a modulação da resposta imune *in vivo* e *in vitro* na coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*, buscando desvendar os mecanismos imunopatológicos subjacentes a essa condição.

A análise da capacidade de invasão e multiplicação em macrófagos revelou que *T. cruzi* possui uma vantagem marcante sobre *L. (L.) amazonensis* em ambiente monocelular, isso porque *T. cruzi* é um parasita altamente eficiente em invadir, escapar de fagolisossomos e replicar-se em diferentes tipos celulares, especialmente macrófagos (ANDRADE e ANDREWS, 2010). Essa competência está associada à expressão de proteínas de superfície, como transialidases e mucinas, que favorecem tanto o reconhecimento celular quanto a manipulação da maquinaria do hospedeiro (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002). Enquanto *L. (L.) amazonensis* utiliza lipofosfoglicanos (LPGs) para se ligar a receptores na célula hospedeira (KAUSHAL et al., 2023 e MAZUMDER et al., 2023), *T. cruzi* emprega uma estratégia distinta, ele utiliza a trans-sialidase, uma enzima que modifica a superfície celular tanto do parasita quanto da célula hospedeira, facilitando a adesão e a invasão (FREIRE-DELIMA et al., 2016 e CAMPO et al., 2016).

A capacidade de multiplicação de *T. cruzi* foi significativamente maior em comparação à *L. (L.) amazonensis*. Essa disparidade pode ser necessariamente influenciada pela localização intracelular de cada parasita. Ao escapar para o citoplasma (CARADONNA e BURLEIGH, 2011), *T. cruzi* acessa um ambiente rico em nutrientes e fatores de crescimento, o que favorece sua proliferação exponencial. Em contraste, *L. (L.) amazonensis*, confinada ao vacúolo parasitóforo (YOUNG e KIMA, 2019), enfrenta um ambiente mais restrito e com recursos limitados, o que restringe sua multiplicação. Essa diferença nas condições ambientais intracelulares, combinada com a ação da trans-sialidase e a capacidade de induzir um rearranjo mais drástico do citoesqueleto, contribui para a maior eficiência de invasão e multiplicação de *T. cruzi*, conferindo-lhe uma vantagem adaptativa na infecção. Embora *T. cruzi* prefira o ambiente citoplasmático, foi demonstrado que ele pode se diferenciar em formas amastigotas

dentro de vacúolos quiméricos, estruturas formadas pela coinfecção com *L. (L.) amazonensis* (PESSOA et al., 2016). Esse achado pode justificar a diferença na multiplicação observada entre a coinfecção e a infecção exclusiva por *T. cruzi* neste estudo.

Durante a coinfecção, observamos uma redução significativa da carga de *T. cruzi* em tempos tardios (72–96h), sugerindo que a presença de *L. (L.) amazonensis* suprime a proliferação de *T. cruzi* nas fases tardias. Essa interferência pode ocorrer por competição por nutrientes, consumo de arginina ou modulação de vias sinalizadoras pró-inflamatórias (GIRAUD et al., 2018).

A coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* estabelece um cenário imunológico complexo e paradoxal no hospedeiro. Este achado se alinha com as observações de PITA (2023), que investigou a coinfecção por *T. cruzi* em pacientes com Leishmaniose Cutânea, e corrobora estudos anteriores, como o de RODRIGUES et al. (2010), que já evidenciavam que a presença de mais de um parasita pode desregular a resposta imune. Em nosso estudo, demonstramos que, em vez de uma resposta imune aditiva, a interação entre os parasitas resulta em um desequilíbrio que compromete a defesa do hospedeiro nos sítios de infecção inicial. Esse desajuste imunológico levou a uma patologia exacerbada em órgãos-alvo, como o coração. A integração dos achados *in vitro* e *in vivo* foi fundamental para a compreensão dessa dinâmica, revelando um efeito imunomodulador que vai além da simples soma das patologias.

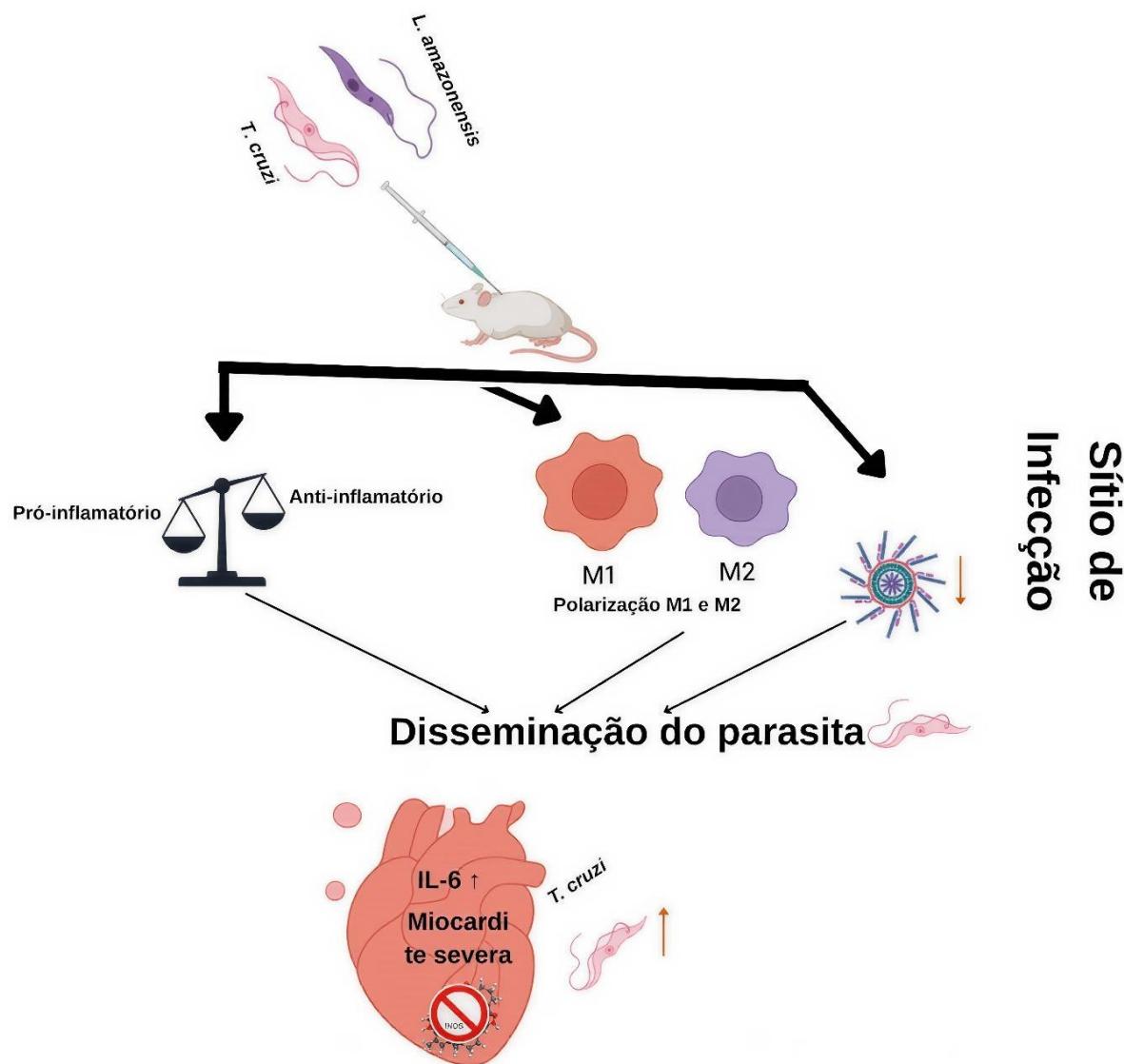
Analisamos a polarização de macrófagos que é um processo dinâmico e crucial na resposta imune do hospedeiro, permitindo que essas células se adaptem a diferentes microambientes para desempenhar funções variadas, desde a eliminação de patógenos até a reparação tecidual (SILVA et al., 2013 e HUANG et al., 2018). Demonstramos que a coinfecção por *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* induz um perfil de resposta imune em que os macrófagos exibem uma polarização mista, caracterizada pela expressão de marcadores pró-inflamatórios (M1) e anti-inflamatórios (M2). Essa coexistência pode ser explicada pela capacidade intrínseca dos parasitas de modular a resposta do hospedeiro. Por exemplo, a *Leishmania* possui mecanismos para evadir a resposta oxidativa da polarização M1 (NUNES et al., 2025), enquanto a infecção por *T. cruzi* parece "preparar" os macrófagos para uma resposta mais intensa a estímulos subsequentes (TY et al., 2019). Essa polarização mista pode ser um fator central na patogênese observada. A ativação M1 busca controlar a infecção através da produção de citocinas inflamatórias, mas a presença simultânea de uma resposta M2 pode estar atenuando essa ação, comprometendo a eliminação efetiva dos parasitas. Essa dualidade

na resposta dos macrófagos contribui para um cenário de inflamação excessiva e, ao mesmo tempo, ineficaz, que leva ao agravamento do dano tecidual, como a miocardite exacerbada observada nos dados. Esse desequilíbrio imunológico mediado pelos macrófagos é um ponto chave para entender como a coinfecção altera o desfecho da doença de Chagas, levando a uma desregulação que se estende para a resposta imune adaptativa. Este cenário está alinhado com o que foi observado por PARODI et al. (2016), que demonstrou que a coinfecção altera o perfil de diferenciação de linfócitos T CD4+ e T CD8+, com um aumento no perfil de células T de memória e exaustão.

Essa modulação também se manifestou na produção de citocinas e na ativação do inflamassoma. A infecção por *T. cruzi* isoladamente induziu a produção robusta de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e ativou de forma potente o inflamassoma (NLRP1, NLRP3, ASC, NLRP9). Em contraste, como observado em Lich e seus colaboradores (2007) a infecção por *L. (L.) amazonensis* atenuou essa resposta, suprimindo a IL-12 e ativando inflamassomas com funções reguladoras, como NLRP2 e NLRP5. A coinfecção resultou em uma modulação combinada: a produção de IL-12 foi substancialmente mais baixa, sugerindo que *L. (L.) amazonensis* manipulou o ambiente intracelular para atenuar a resposta Th1. Simultaneamente, a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, aumentou de forma notável, criando um ambiente imunossupressor que pode beneficiar a sobrevivência de ambos os parasitas.

*L. (L.) amazonensis* é conhecida por modular epigeneticamente as respostas dos macrófagos, levando a uma supressão de sinais pró-inflamatórios como *NF-kB* e a uma redução na ativação do inflamassoma (KAMHAWI e SERAFIM, 2020) e ao atenuar as respostas iniciais M1 e do inflamassoma, *L. (L.) amazonensis* pode prejudicar o desenvolvimento de uma resposta Th1 sistêmica robusta e eficaz, que é necessária para controlar a disseminação de *T. cruzi* (PAROLI et al., 2018), o que sustenta ainda sugerindo que *L. (L.) amazonensis* manipulou o ambiente intracelular para atenuar a resposta Th1 em coinfecção e resultados semelhantes, onde um patógeno secundário exacerba uma infecção primária ao desviar a

resposta imune, foram observados em outros modelos de coinfecção, como coinfecções com helmintos e *T. cruzi* (RODRIGUES et al., 2017)



**Figura 16: Impacto na Resposta Imune e Progressão da Doença de Chagas na Coinfecção por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** A coinfecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* leva a um desequilíbrio (pró e anti) inflamatório no sítio de infecção, com uma polarização mista de macrófagos M1/M2 e uma redução da expressão de vias inflamatórias essenciais. Essa modulação compromete a resposta imune do hospedeiro, levando a uma piora no controle parasitário local, à maior disseminação de *Trypanosoma cruzi* e ao agravamento da miocardite chagásica. Esse processo é possivelmente mediado pelo aumento de IL-6 e pela inibição da expressão de iNOS, que resultam em uma inflamação que é intensa, mas ineficaz para eliminar o parasita

As interações observadas *in vitro* se refletiram e foram amplificadas nos tecidos *in vivo*. No sítio de infecção inicial (pata), a coinfecção resultou em uma "anulação" das vias de defesa, onde a expressão de iNOS e Arginase-1 foi significativamente menor, deixando a resposta imune local desorganizada. A supressão de citocinas cruciais, como a IL-4, e a modulação seletiva do inflamassoma (supressão de NLRP3 vs. aumento de NLRP9) reforçam a ideia de um balanço imunológico comprometido que permite a disseminação dos parasitas.

As consequências dessa falha local se manifestaram dramaticamente no coração. Em contraste com a resposta atenuada na pata, o miocárdio dos animais coinfetados apresentou uma inflamação excessiva e ineficaz. Houve uma hiper-regulação dramática de genes do inflamassoma (ASC, NLRP-1, NLRP-9) e de citocinas como a IL-6, que contribuem para o dano tecidual. No entanto, a capacidade do hospedeiro de eliminar o parasita foi comprometida pela supressão da expressão de iNOS nesse tecido. Essa inflamação paradoxal — intensa, mas inútil para o controle parasitário — se correlaciona diretamente com o aumento significativo da carga de *T. cruzi* no coração e com a exacerbada da miocardite, um achado central da patogênese da doença de Chagas (LIBIN et al., 2023).

Adicionalmente, os resultados no baço indicam que a coinfecção inibe a resposta de citocinas-chave, como IL-4 e IL-10, que seriam importantes para o controle da leishmaniose, sem a ativação maciça do inflamassoma. O perfil sistêmico corrobora essa desregulação, com níveis persistentemente altos de IL-18 e IL-6 no soro, evidenciando uma inflamação prolongada e desregulada que a resposta regulatória mediada por IL-10, que também se manteve alta, não foi capaz de controlar.

## **6. Conclusão**

Em infecções isoladas, *T. cruzi* demonstra uma superioridade replicativa sobre *L. (L.) amazonensis* em macrófagos, destacando sua intrínseca capacidade de proliferação. No entanto, o cenário da coinfecção é paradoxal: a presença de *L. (L.) amazonensis* suprime a replicação de *T. cruzi* em ambiente isolado, mas, em última análise, facilita sua patogênese sistêmica in vivo, resultando em um desfecho de doença mais grave.

A coinfecção não se manifesta como um processo aditivo, mas sim como uma interação complexa na qual os parasitas modulam a resposta do hospedeiro em diferentes níveis. A supressão das vias de defesa nos sítios de infecção inicial, como a pata, permite a disseminação dos parasitas. Isso leva a uma inflamação excessiva e ineficaz no coração, resultando em uma cardiopatia mais severa. Essa é uma explicação aprofundada de como a coinfecção pode alterar o equilíbrio imunológico e culminar em um desfecho de doença mais grave.

Esses achados sublinham a importância de considerar as coinfecções para o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença de Chagas em regiões endêmicas.

## 7.Referências Bibliográficas

- 1 ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., & PILLAI, S. (2018). Imunologia celular e molecular (9<sup>a</sup> ed.). **Elsevier Brasil**.
- 2 ALVAR, J., VÉLEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., den BOER, M., & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 5, e35671, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- 3 ANDRADE, L. O., & ANDREWS, N. W. (2010). **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 762–774, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2456>
- 4 BARROS, Michaele Fernanda Rezende de. Parasitas e resposta imunitária: a ação da resposta inata. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – **Centro Universitário de Brasília**, Brasília, 2016.
- 5 BATES, P. A. (2018). Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 529–530, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>
- 6 BERN, C., MONTGOMERY, S. P., HERWALDT, B. L., RASSI, A., MARIN-NETO, J. A., DANTAS, R. O., ... & KIRCHHOFF, L. V. (2011). Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: A systematic review. **JAMA**, [S. l.], v. 305, n. 5, p. 519–528, 2011. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.64>
- 7 BONNEY, K. M., & ENGMAN, D. M. (2015). Chagas heart disease pathogenesis: One mechanism or many? **Current Molecular Medicine**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 466–481, 2015. <https://doi.org/10.2174/1566524015666150619094212>
- 8 BRANDÃO, Y. O., & MOLENTO, M. B. (2023). A systematic review of Apicomplexa looking into epigenetic pathways and the opportunity for novel therapies. **Pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 2, 299, 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020299>
- 9 BURLEIGH, B. A., & WOOLSEY, A. M. (2002). **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 32, n. 7, p. 1089–1098, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00059-7)
- 10 CAMPO, V. L., MARTINS-TEIXEIRA, M. B., & CARVALHO, I. (2016). *T. cruzi* invasion into host cells: A complex molecular targets interplay. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 13, p. 1084–1097, 2016. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160707230238>

- 11 CARADONNA KL, BURLEIGH BA. Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol.* 2011;76:33-61. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5. PMID: 21884886.
- 12 CEVIDANES, A., Di CATALDO, S., MUÑOZ-SAN MARTÍN, C., LATROFA, M. S., HERNÁNDEZ, C., CATTAN, P. E., OTRANTO, D., & MILLÁN, J. (2023). Co-infection patterns of vector-borne zoonotic pathogens in owned free-ranging dogs in central Chile. **Veterinary Research Communications**, [S. l.], v. 47, p. 575–585, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10009-6>
- 13 CONCEIÇÃO, M. J., CARLOTO, A. E., VINAUD-DE-MELO, E., SILVA, I. M., & COURAS, J. R. (2013). Prevalence and morbidity data on *Schistosoma mansoni* infection in two rural areas of Jequitinhonha and Rio Doce Valleys in Minas Gerais, Brazil. **Parasitology**, [S. l.], v. 2013, p. 1–4, 2013.
- 14 CONDE, L., MACIEL, G., de ASSIS, G. M., FREIRE-DE-LIMA, L., NICO, D., VALE, A., ... & MORROT, A. (2022). Humoral response in Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 12, 1063291, 2022. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1063291>
- 15 COSTA-DA-SILVA, A. C., NASCIMENTO, D. d. O., FERREIRA, J. R. M., GUIMARÃES-PINTO, K., FREIRE-DE-LIMA, L., MORROT, A., ... & FREIRE-DE-LIMA, C. G. (2022). Immune responses in leishmaniasis: An overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [S. l.], v. 7, n. 4, 54, 2022. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>
- 16 COURAS, J. R., & VIÑAS, P. A. (2010). Chagas disease: A new worldwide challenge. **Nature**, [S. l.], v. 465, n. 7301, p. S6–S7, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09221>
- 17 COURAS, J. R., ALBAJAR VIÑAS, P., BRUM-SOARES, L. M., de SOUZA, A. S., & XAVIER, S. S. (2013). Morbidity of Chagas heart disease in the microregion of Rio Negro, Amazonian Brazil: A case control study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 108, p. 1009–1013, 2013. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130128>
- 18 CROFT, S. L., SUNDAR, S., & FAIRLAMB, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
- 19 DA SILVA, A. A., TEIXEIRA, T. L., TEIXEIRA, S. C., MACHADO, F. C., dos SANTOS, M. A., TOMIOSSO, T. C., ... & SILVA, C. V. (2017). Galectin-3: A friend but not a foe during *T. cruzi* experimental infection. **Frontiers in Cellular and**

**Infection Microbiology**, [S. l.], v. 7, 463, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00463>

- 20 ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. (2023). **Surveillance atlas of infectious diseases**. Disponível em: <https://atlas.ecdc.europa.eu>.
- 21 FERREIRA, C., de LIMA, M. I. S., GONÇALVES, R. S., & TAFURI, W. L. (2020). Current challenges and prospects for treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (L.) amazonensis* . **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, 574457, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.574457>
- 22 FERRER, E.; AGUILAR, C. M.; VIETTRI, M.; TORRELLAS, A.; LARES, M.; DIAZ, M.; DELGADO, O.; FELICIANGELI, M. D.; HERRERA, L. Chagas Disease and Leishmaniasis, Sympatric Zoonoses Present in Human from Rural Communities of Venezuela. **Acta Parasitologica**, v. 69, p. 616–627, 2024.
- 23 FREIRE-DE-LIMA, L., FONSECA, L. M., OELTMANN, T., MENDONÇA-PREVIATO, L., & PREVIATO, J. O. (2015). The trans-sialidase, the major *T. cruzi* virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 1142–1149, 2015. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv057>
- 24 FREITAS-MESQUITA, A. L., et al. (2021). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 11, 710235, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.710235>
- 25 GIRAUD, E., et al. (2018). **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, 417, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00417>
- 26 GREGORY, D. J., et al. (2008). **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 180, n. 7, p. 4836–4845, 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4836>
- 27 HERRERA, L., MOROCOIMA, A., LOZANO-ARIAS, D., GARCÍA-ALZATE, R., VIETTRI, M., LARES, M., & FERRER, E. (2022). Infections and coinfections by trypanosomatid parasites in a rural community of Venezuela. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 121, n. 2, p. 635–643, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07417-z>
- 28 HORTA, M. F., ANDRADE, L. O., MARTINS-DUARTE, É. S., & CASTRO-GOMES, T. (2020). Cell invasion by intracellular parasites – the many roads to infection. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 133, n. 4, jcs232488, 2020. <https://doi.org/10.1242/jcs.232488>
- 29 HUANG, X.; LI, Y.; FU, M.; XIN, H.-B. Polarizing Macrophages In Vitro. In: Rousselet, G. (Ed.). **Macrophages: Methods and Protocols**. Springer New York, 2018a. p. 119–126.

- 30 KAUSHAL, R. S., NAIK, N., PRAJAPATI, M., RANE, S., RAULJI, H., AFU, N. F., UPADHYAY, T. K., & SAEED, M. (2023). Leishmania species: A narrative review on surface proteins with structural aspects involved in host-pathogen interaction. **Chemistry & Biology Drug Design**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 332–356, 2023. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14227>
- 31 LICH, J. D., et al. (2007). **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 37, p. 27195–27205, 2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703170200>
- 32 MACALUSO, G., GRIPPI, F., Di BELLA, S., BLANDA, V., GUCCIARDI, F., TORINA, A., ... & CANNELLA, V. (2023). A review on the immunological response against *T. cruzi*. **Pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 2, 282, 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020282>
- 33 MARIN-NETO, J. A., RASSI, A. Jr., OLIVEIRA, G. M. M., CORREIA, L. C. L., RAMOS JÚNIOR, A. N., ... & DIAS, J. C. P. (2023). SBC guideline on the diagnosis and treatment of patients with cardiomyopathy of Chagas disease – 2023. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 120, n. 6, e20230269, 2023. <https://doi.org/10.36660/abc.20230269>
- 34 MAZUMDER, S., SINHA, A., GHOSH, S., SHARMA, G. C., PRUSTY, B. M., MANNA, D., ... & DASGUPTA, S. (2023). Leishmania LPG interacts with LRR5/LRR6 of macrophage TLR4 for parasite invasion and impairs macrophage functions. **Pathogens and Disease**, [S. l.], v. 81, ftad019, 2023. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftad019>
- 35 MICHAILOWSKY, V., SILVA, N. M., ROCHA, C. D., VIEIRA, L. Q., LANNES-VIEIRA, J., & GAZZINELLI, R. T. (2001). Pivotal role of interleukin-12 and interferon- $\gamma$  axis in controlling tissue parasitism and inflammation during *T. cruzi* infection. **American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 159, n. 5, p. 1723–1733, 2001.
- 36 MURPHY, K., WEAVER, C., & JANEWAY JR., C. A. (2016). Janeway's immunobiology (9th ed.). **Garland Science**.
- 37 NIEMI, J. P., et al. (2021). **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 15, 780184, 2021. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.780184>
- 38 NIO-KOBAYASHI, J. (2017). Tissue- and cell-specific localization of galectins and their potential functions in health and disease. **Anatomical Science International**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 25–36, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0366-6>
- 39 NUNES, A. P.; SANTOS-DESTRO, Y. M. dos; RODRIGUES, A. C. J.; DETONI, M. B.; CRUZ, E. M. S.; BERBERT, G. S.; PARK, B.; PIRES, M. F. M. K.; PAVANELLI,

- W. R.; PROVIDELLO, M. V. Under pressure: Updated insights into the mechanisms of Leishmania's defense in response to oxidative stress. **Life Sciences**, v. 377, p. 123779, 2025.
- 40 OMONDI, Z. N., ARSERIM, S. K., TÖZ, S., & ÖZBEL, Y. (2022). Host-parasite interactions: Regulation of Leishmania infection in sand fly. **Acta Parasitologica**, [S. l.], v. 67, p. 606–618, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00545-0>
- 41 PACHECO-FERNANDEZ, T., VOLPEDO, G., GANNAVARAM, S., BHATTACHARYA, P., DEY, R., SATOSKAR, A., ... & NAKHASI, H. L. (2021). Revival of leishmanization and leishmanin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 11, 639801, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.639801>
- 42 PAHO – Pan American Health Organization. (2023). **Epidemiological update: Chagas disease and leishmaniasis in the Americas**. Disponível em: <https://www.paho.org>.
- 43 PARODI, C.; GARCÍA BUSTOS, M. F.; BARRIO, A.; RAMOS, F.; GONZÁLEZ PRIETO, A. G.; MORA, M. C.; BARÉ, P.; BASOMBRÍO, M. A.; DE ELIZALDE DE BRACCO, M. M. American tegumentary leishmaniasis: T-cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms-co-infection with *Trypanosoma cruzi*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 4, p. 353–369, 2016.
- 44 PESSOA, C. C., FERREIRA, É. R., BAYER-SANTOS, E., RABINOVITCH, M., MORTARA, R. A., & REAL, F. (2016). *T. cruzi* differentiates and multiplies within chimeric parasitophorous vacuoles in macrophages coinfecte with *L. (L.) amazonensis*. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 84, n. 5, p. 1603–1614, 2016. <https://doi.org/10.1128/IAI.01470-15>
- 45 PÉREZ-MOLINA, J. A., & MOLINA, I. (2018). Chagas disease. **The Lancet**, [S. l.], v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- 46 PITA, M. S. **Influência da Coinfecção por Trypanossoma Cruzi na Resposta Imune e no Desfecho Clínico de Pacientes com Leishmaniose Cutânea da Área Endêmica de Corte de Pedra**. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2023.
- 47 PONTE-SUCRE, A., GAMARRO, F., DUJARDIN, J. C., BARRETT, M. P., LÓPEZ-VÉLEZ, R., GARCÍA-HERNÁNDEZ, R., ... & PADRÓN-NIEVES, M. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 12, e0006052, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

- 48 REZENDE-OLIVEIRA, K., GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C., SILVA, MV D., FARIA DE OLIVEIRA, R., REIS MACHADO, J., DE ALMEIDA SILVA TEIXEIRA, L., CASTELLANO, LRC, CORREIA, D., e RODRIGUES, V. (2020). Efeitos do tratamento com antimoniato de meglumina na produção de citocinas em um paciente com coinfecção por leishmaniose mucosa e doença de Chagas. *Medicina Tropical e Doenças Infecciosas*, 5 (2), 69. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020069>
- 49 RIBEIRO, I., SEIXAS, J., GARCIA, M. M., & MORILLO, C. A. (2022). New approaches to Chagas disease drug development: An update on preclinical and clinical candidates. **Drugs**, [S. l.], v. 82, n. 7, p. 741–757, 2022. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01723-3>
- 50 RODRIGUES, C. M.; VALADARES, H. M. S.; FRANCISCO, A. F.; ARANTES, J. M.; CAMPOS, C. F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; ARAUJO, M. S. S.; ARANTES, R. M. E.; CHIARI, E.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. J.; FARIA, A. M. C.; MACEDO, A. M. Co-infection with Different *Trypanosoma cruzi* Strains Interferes with the Host Immune Response to Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e846, 2010
- 51 SILVA, G. K., et al. (2013). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 9, e2479, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002479>
- 52 STANAWAY, J. D., & ROTH, G. (2015). The burden of Chagas disease: Estimates and challenges. **Global Heart**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 139–144, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.001>
- 53 TY, M. C.; LOKE, P.; ALBEROLA, J.; RODRIGUEZ, A.; RODRIGUEZ-CORTES, A. Immuno-metabolic profile of human macrophages after Leishmania and *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0225588, 2019.
- 54 VELLOZI, C. M. D., et al. (2023). **Parasitology Research**, [S. l.], v. 122, n. 5, p. 1405–1416, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07858-5>
- 55 VENTER, F., MATTHEWS, K. R., & SILVESTER, E. (2022). Parasite co-infection: An ecological, molecular and experimental perspective. **Proceedings of the Royal Society B**, [S. l.], v. 289, n. 1967, 20212155, 2022. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.2155>
- 56 WHO – World Health Organization. (2023a). **Leishmaniasis country profiles: Americas and global overview**. Disponível em: <https://www.who.int>.
- 57 WHO – World Health Organization. (2023b). **Leishmaniasis country profiles: African and Eastern Mediterranean regions**. Disponível em: <https://www.who.int>.

58 YOUNG J, KIMA PE. The *Leishmania* Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface. **Yale J Biol Med.** 2019 Sep 20;92(3):511-521. PMID: 31543712; PMCID: PMC6747952.

# Anexos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Reitoria

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais

Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 02 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: (34) 3225-8658 - [www.comissoes.propp.ufu.br/ceua](http://www.comissoes.propp.ufu.br/ceua) - [ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Coinfecção por Trypanosoma cruzi e Leishmania (L.) amazonensis: Um estudo da modulação da resposta imune in vitro e in vivo**”, protocolo nº **23117.016293/2024-11**, sob a responsabilidade de **Claudio Vieira da Silva** — que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica — encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA)** da **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**, em reunião **19 de abril de 2024**.

(We certify that the project entitled “**Coinfecção por Trypanosoma cruzi e Leishmania (L.) amazonensis: Um estudo da modulação da resposta imune in vitro e in vivo**” protocol **23117.016293/2024-11**, under the responsibility of **Claudio Vieira da Silva** – involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research – is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for **ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA)** from **FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA**, in meeting of **April 19th, 2024**).

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Inicio: <b>01/05/2024</b> Término: <b>01/04/2026</b>
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<b>Camundongo Isogênico BALB/c</b>
Número de animais	<b>20 animais</b>
Peso / Idade	<b>15g - 20g/ 5 - 6 semanas</b>
Sexo	<b>Macho</b>
Origem / Local	<b>REBIR/UFU</b>
Local onde serão mantidos os animais:	<b>REBIR/UFU</b>

Uberlândia, 22 de abril de 2024..

**LUIZ FERNANDO MOREIRA IZIDORO**  
Coordenador da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Portaria R Nº 2089/2024



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando Moreira Izidoro, Coordenador(a)**, em 22/04/2024, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5359862** e

**Tabela 1: Tabela de Primers Utilizados para Análise de Expressão Gênica**

	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverso Reverse</b>
<b>Citocinas e Moléculas de Resposta Imune</b>		
<b>Mouse TNF-<math>\alpha</math></b>	CAGCCTCTCTCATTCCCTGCTTG	CTGGAAAGACTCTCCCAGGTATA
<b>Mouse IL-6</b>	GGCCTTCCCTACTTCACAAG	ATTTCACGATTCCCAGAG
<b>Mouse IL-4</b>	GGCATTGAACGAGGTCA	AAATATGCGAACCACTTG
<b>Mouse IL-12p70</b>	TCAAACCAGACCCACCGAA	GCTGACCTCCACCTGCTGA
<b>Mouse IL-10</b>	ATTTGAATTCTGGTGAGAA	CACAGGGGAGAAATCGATGACA
<b>Mouse IFN-<math>\gamma</math></b>	CACGCCGTCTGG	TCTAGGCTTCAATGAGTGTGCC
<b>Mouse TGF-<math>\beta</math></b>	AGAGCCCTGGATACCACTATGC	CACTTCCAACCCAGGTCTCC
<b>Genes do Inflamassoma</b>		
<b>Mouse NLRP1a</b>	TTACATGAGCATGCCATTGC	ACTCCTGAAGACACAAGTGG
<b>Mouse NLRP2</b>	AAGGAGGCTAAAGCCAGAGG	TCTTGGTTACACAATGCCAG
<b>Mouse NLRP3</b>	TGTGAGAAGCAGGTTCTACTCT	GGATCCTCCTGACCAGTTGG
<b>Mouse NLRP4 e</b>	ATATCCAAGTAGAAAAAGCC	GAGAGCCTCCTCAGCAAACAC
<b>Mouse NLRP5</b>	GAAAGCACAAATGGCTCCTCCA	CTGACGCCTGTTCCACTTCT
<b>Mouse NLRP9b</b>	CGAAAATCGAGAATTCTTCC	ACCTGTAGAACAGGCTTAAC
<b>Mouse NLRP10</b>	TCAAGACGCTGAAGTTCCACT	TGCTCCGTACATTGAATCAGTT
<b>Mouse ASC</b>	GTGAGGGCAGAGGCCATT	CTGAAAGTGTCCGAACCCG
<b>Marcadores de Ativação Macrófago</b>		
<b>Mouse Arginase-1 (Arg-1)</b>	TCACCTCGAGCTTGATGTG	CTGAAAGGAGCCCTGTCTTG
<b>Mouse Ym1</b>	GTACCCTGGTCTCGAGGAA	GCCTTGGAAATGTCTTCTTCAC
<b>Mouse iNOS</b>	CTTGCACGAGGAGAC	TCATGTTACTGAGGCTGAC

Gene de Referência		
GAPDH	GGTTGTCATGGGTGTGAACC	AAGAATGGGAGTTGCTGTTCA
Parasitas		
<i>Leishmania amazonensis</i>	GGGGTGGAGTCTGGCGT	ATTTTACACCAACCCCCAGTT
<i>T. cruzi</i>	CGCAAACAGATATTGACAGAG	TGTTCACACACTGGACACCAA