



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**MÔNICA DE SOUSA PITA**

**INFLUÊNCIA DA COINFECCÃO POR *TRYPANOSSOMA  
CRUZI* NA RESPOSTA IMUNE E NO DESFECHO CLÍNICO  
DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA DA ÁREA  
ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA.**

Salvador, BA  
2023

**MÔNICA DE SOUSA PITA**

**INFLUÊNCIA DA COINFEÇÃO POR *TRYPANOSSOMA CRUZI* NA RESPOSTA IMUNE E NO DESFECHO CLÍNICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA DA ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho  
Co Orientadora: Dra. Andréa Souza Magalhães

Salvador, BA  
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F866 Pita, Mônica de Sousa

Influência da coinfeção por *Trypanossoma Cruzi* na resposta imune  
e no desfecho clínico de pacientes com Leishmaniose cutânea da área  
endêmica de corte de pedra/Mônica de Sousa Pita. – Salvador, 2023.

50 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho; Coorientadora:  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Andréa Souza Magalhães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.

Dedico esse trabalho ao meu esposo pelo apoio e incentivo, aos meus filhos pela colaboração nas horas difíceis e aos cientistas brasileiros pela resiliência em tempos tão desafiadores.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, Senhor de todas as coisas, por permitir essa minha passagem no plano terreno.

Aos meus pais pelo dom da vida, principalmente a minha mãe Miguelina Maria Cruz dos Santos, pelos valores a mim passados. Também à minha segunda mãe, Catarina Maria da Cruz, por todo amor e dedicação que tem por mim.

Ao meu companheiro de vida, meu esposo e amigo, por todo apoio em tudo que faço na vida.

Aos meus filhos Daniel e Jefferson Junior e meu neto Guilherme, por tornarem minha vida muito melhor.

Ao meu orientador, Lucas Pedreira de Carvalho, pela gentileza de me acolher em seu laboratório, pelos ensinamentos e pela maravilhosa condução dos trabalhos.

À minha coorientadora Andréa Santos Magalhães, pela paciência, persistência, por acreditar em mim e principalmente pelos ensinamentos.

A Rúbia Suely Costa, por toda colaboração ao trabalho, e suas contribuições valiosas.

Ao PPGIm por me dar a oportunidade de realizar mais uma etapa valorosa em minha vida.

Aos meus colegas do Serviço de Imunologia-HUPES, por todo apoio e solidariedade, especialmente a Lívia Maria Alves de Oliveira, Jordana Batista Santana e Carvel Suprien, pelos momentos de ajuda valorosos.

Aqueles que foram vistos dançando, foram julgados insanos, pelos que não podiam escutar a música”.

(Friedrich Nietzsche)

## RESUMO

Em diversas áreas da América Latina, a distribuição geográfica da leishmaniose cutânea (LC) se sobrepõe a áreas de transmissão da doença de Chagas, sendo a infecção por *Trypanosoma cruzi* documentada em 12 a 70% dos pacientes com sintomas clínicos de leishmaniose. O objetivo deste estudo foi investigar se a coinfeção com *T. cruzi* de pacientes com LC causada por *Leishmania braziliensis* está associada à indução clínica da leishmaniose. Foi realizado um inquérito sorológico com cento e oitenta soros de pacientes com LC causada por *L. braziliensis*, onde foram utilizadas proteínas quiméricas específicas do *T. cruzi* para detectar a coinfeção nesses pacientes. Foram identificados 20 pacientes com LC coinfectados com *T. cruzi*, todos com títulos de anticorpos anti-*Leishmania* superiores aos pacientes infectados apenas pela *Leishmania*. Quanto a produção de citocinas, IL-6 foi a que apresentou maiores níveis no grupo de pacientes coinfectados comparado com o grupo somente com leishmaniose. Não houve diferença estatística na produção de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$  entre pacientes coinfectados com *Leishmania braziliensis* e *T. cruzi*. Em relação ao desfecho clínico, quatorze (70%) dos vinte pacientes coinfectados falharam a terapia com antimônio, enquanto sessenta e oito pacientes (42%) dos cento de sessenta pacientes infectados apenas por *Leishmania*, falharam. Esses resultados indicam que a coinfeção pode interferir na resposta imune, e influencia na resposta ao tratamento de pacientes com LC causada por *L. braziliensis*.

Palavras-Chave: Leishmaniose; Doença de Chagas; coinfeção; Resposta imune; Desfecho clínico.

## ABSTRACT

In several areas of Latin America, the geographic distribution of cutaneous leishmaniasis (CL) overlaps with areas of Chagas disease transmission ranging from 12 to 70% of patients with clinical symptoms of leishmaniasis. The aim of this study was to investigate whether coinfection with *T. cruzi* of patients with CL caused by *Leishmania braziliensis* is associated with clinical induction of leishmaniasis. A case-control study was carried out with one hundred and eighty sera from patients with CL caused by *L. braziliensis*, where chimeric proteins specific to *Trypanosoma cruzi* were used to detect coinfection with Chagas disease. We identified 20 patients with CL who were coinfecting with *T. cruzi*, all of whom had higher anti-*Leishmania* antibody titers than patients infected with *Leishmania* alone. As for the production of cytokines, IL-6 was the one with the highest levels in the group of co-infected patients compared to the group with leishmaniasis alone. There was no statistical difference in the production of IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$  between patients coinfecting with *Leishmania braziliensis* and *T. cruzi*. With regard to clinical outcome, fourteen (70%) of the co-infected patients failed antimonial therapy, and of patients with *Leishmania* infection alone, a total of sixty-two (42%) failed. These results indicate that co-infection can interfere with the immune response and influence the response to treatment of patients with CL caused by *L. braziliensis*.

Key words: Leishmaniasis; Chagas disease; Coinfection; Immune response; Clinical outcome.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Complexo HUPES</b>	Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>IDRM</b>	Intradermorreação de Montenegro
<b>IFN-gamma</b>	Interferon-gamma
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	“Interleukin 1 beta” Interleucina 1- beta (IL-1 $\beta$ )
<b>IL-10</b>	“Interleukin 10” Interleucina 10 (IL-10)
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetase induzida (Inducible nitric oxide synthase)
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LM</b>	Leishmaniose mucosa
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NK</b>	Natural Killer cell (células assassinas naturais)
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBMC</b>	Células Mononucleares do sangue Periférico
<b>qPCR</b>	“Polimerase Chain Reaction real-time” Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real
<b>SLA</b>	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
<b>SVS</b>	Secretaria de Vigilância da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa da endemicidade mundial da Leishmaniose Tegumentar.....	09
<b>Figura 2.</b> Centro de referência em leishmaniose, Corte de Pedra Bahia.....	10
<b>Figura 3.</b> Hotspots de leishmaniose cutânea.....	11
<b>Figura 4.</b> Incidência mundial da Doença de Chagas.....	14
<b>Figura 5.</b> Produção de IgG Total.....	25
<b>Figura 6.</b> Produção de citocinas de todos os pacientes.....	26
<b>Figura 7.</b> Produção de citocinas em pacientes que falharam.....	27
<b>Figura 8.</b> Produção de citocinas em pacientes que curaram.....	28

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA: .....	9
2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana .....	9
2.1.1 Resposta imune e imunopatogênese da leishmaniose cutânea causada pela <i>Leishmania (viannia) braziliensis</i> .....	12
2.2 Aspectos epidemiológicos e clínicos da Doença de Chagas.....	13
2.2.1 Resposta imune e imunopatogênese da Doença de Chagas .....	16
2.3 Coinfecção entre Leishmaniose Tegumentar e Doença de Chagas .....	17
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS .....	18
3.1 Hipótese .....	18
3.2 Objetivos.....	18
3.2.1 Objetivo Geral.....	18
3.2.2 Objetivos Específicos.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1 População do estudo .....	19
4.2 Cálculo amostral .....	19
4.4 Desenho experimental.....	20
4.5 Definição de Casos .....	20
4.5.1 Leishmaniose Cutânea.....	20
4.5.2 Leishmaniose Cutânea coinfectados com <i>T. cruzi</i> .....	21
4.6 Critérios de Inclusão .....	21
4.7 Critérios de Exclusão .....	21
5 MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....	21
5.1 Determinação sorológica para Imunoglobulina IgGTotal anti- <i>Leishmania</i> .....	21
5.2 Determinação sorológica das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ e TNF .....	22
5.3 Determinação sorológica da infecção por <i>T. cruzi</i> com proteínas quiméricas .....	23
6 RESULTADOS .....	25
7 DISCUSSÃO .....	30

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
9 REFERÊNCIAS .....	35

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos. A doença é causada por diferentes espécies de *Leishmania*, com manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas, que podem curar espontaneamente, até graves lesões mucocutâneas desfigurantes. (NEVES, 2016. REIS, 2006). Além disso, podem ser resistentes ao tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde.

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o principal agente etiológico da LTA no Brasil, sendo registrados aproximadamente 21.000 casos/ano de LTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Na Bahia, observa-se ampla dispersão e transmissão principalmente na área rural, sendo endêmica em praticamente todo estado, com surtos epidêmicos registrados em várias localidades, dentre elas, a região de Corte de Pedra. Em 2021, no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro, foram registrados 1.370 casos novos confirmados de Leishmaniose Tegumentar, dispersos em 161 municípios, apresentando coeficiente de incidência de 9,2 casos/100 mil habitantes. (COSTA, 2012, SESAB,2022).

No que diz respeito à imunopatologia da LTA, há evidências recentes do envolvimento de perfis de subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 e Treg Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) e CD8<sup>+</sup>, bem como algumas citocinas produzidas por essas células, como, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , bem como a expressão de iNOS em todo o espectro clínico imunopatológico da doença causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. (CAMPOS, 2018).

A resposta imune do tipo Th1 associada à expressão significativa de células T CD8<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$  e iNOS deve ser enfatizada na determinação da resistência contra infecções leishmanias. Este é, em geral, o perfil de resposta imune encontrado na maioria das formas clínicas de LTA (LCL, LCD e LM) com exceção de LCD, que é caracterizada por uma forte resposta imune do tipo CD4<sup>+</sup>/Th2 associada a baixos níveis de CD8<sup>+</sup> T células e alta expressão de citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . (CAMPOS, 2018).

O padrão de resposta imune da infecção causada por *L. braziliensis* é do tipo Th1, com produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  associadas com a ativação macrófagica e destruição parasitária, neste ambiente inflamatório, as células TCD4, TCD8 e natural Killer (NK) exercem um papel fundamental na produção de IFN- $\gamma$  para o controle do parasito. Enquanto os mecanismos que levam ao perfil Th2, induzem a produção de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  e participam da imunorregulação (CASTRO, 2013. DANTAS, et al. 2014). Embora a

resposta imune Th1 seja importante para controlar o crescimento do parasita e prevenir a proliferação e disseminação de *Leishmania*, há evidências substanciais de que a ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a produção de citocinas pró-inflamatórias estão associadas à intensidade da resposta inflamatória e patologia. Na LC, há uma produção exacerbada de fator de necrose tumoral (TNF) e interferon (IFN)- $\gamma$  e uma correlação direta entre a frequência de células T CD4 expressando IFN- $\gamma$  e TNF com o tamanho da úlcera (COSTA, 2017).

A literatura mostra que indivíduos em fase muito precoce da doença, ou seja, antes do aparecimento de úlceras, têm maior probabilidade de falha na terapia com SbV. A SbV continua sendo a primeira linha de tratamento para leishmaniose tegumentar no Brasil, e estudos que investigam a resposta terapêutica a essa droga relatam taxas de falha de até 70%, dependendo do estágio e da forma clínica da doença. (FRANCA, 2021).

A resposta Th1 prejudicada está associada à falha terapêutica. O aumento da frequência de células T CD8<sup>+</sup> e a alta produção de citocinas inflamatórias, granzima B e MMP-9 contribuem para a imunopatologia. (CARVALHO, 2021).

Em várias áreas da América Latina, a distribuição geográfica da LTA se sobrepõe a áreas de transmissão da doença de Chagas. Estudos epidemiológicos relatam essa coinfeção e destacam a importância para o planejamento do sistema de vigilância e estratégia de prevenção (HOYOS et al, 2016. CHIARAMONTE et al, 1996).

A tripanossomíase americana é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que afeta mais de cinco milhões de pessoas em 21 países da América Latina. Somente no Brasil, estima-se que 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas em 2014, na Bahia, cerca de 8.000 pessoas são portadoras da fase crônica da doença (SANTOS et al, 2018; SESAB, 2015).

Anticorpos anti *T. cruzi*, encontrados no soro de pacientes crônicos, são capazes de estimular a proliferação de linfócitos T e B em portadores da doença de Chagas onde a progressão para a fase crônica é acompanhada de um aumento na resposta celular com produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias pelas células T CD4<sup>+</sup> e monócitos (MENEZES et al, 2017). Um estudo realizado em pacientes com leishmaniose e coinfectados com *T. cruzi*, mostrou um perfil de diferenciação de células T maior em pacientes com LC e LM infectados pelo *T. cruzi* em comparação aos pacientes infectados apenas com *Leishmania* (PARODI et al., 2016).

O estudo da influência de coinfeção com *T. cruzi* na resposta imune e no desfecho clínico de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana pode ser importante na conduta

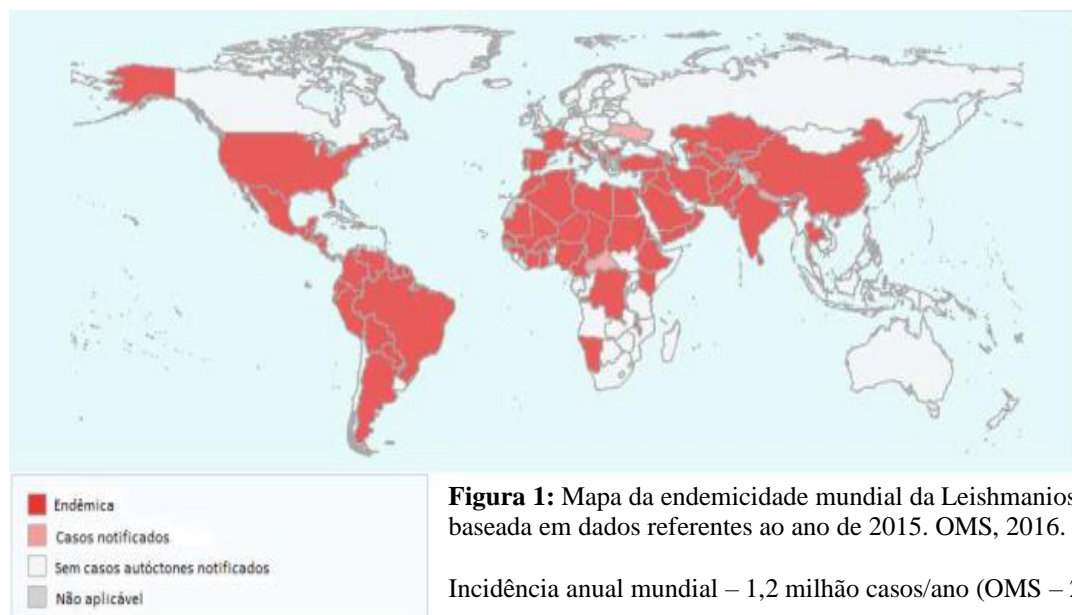
e acompanhamento do tratamento dos pacientes que têm um desfecho clínico desfavorável, falham a terapia e necessitam repetir o ciclo de tratamento com antimonial pentavalente preconizado pelo Ministério da saúde.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA:

### 2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, que provoca úlceras na pele e mucosas. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil, há sete espécies de *Leishmania* envolvidas na ocorrência de casos de leishmaniose. As mais importantes são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L.(V.) braziliensis*. A doença é transmitida ao ser humano pela picada das fêmeas de flebotomíneos infectadas onde as atividades laborais no campo, realizadas preferencialmente por homens adultos, estão principalmente relacionadas ao risco de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

A Leishmaniose Tegumentar tem ampla distribuição mundial e, no continente americano, há registro de casos desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. (Fig. 1).



**Figura 1:** Mapa da endemicidade mundial da Leishmaniose Tegumentar baseada em dados referentes ao ano de 2015. OMS, 2016.

Incidência anual mundial – 1,2 milhão casos/ano (OMS – 2018).

No Brasil, em média, são registrados cerca de 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes nos últimos 5 anos. A região Norte apresenta o

maior coeficiente (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes). (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Na Bahia observa-se ampla dispersão e a transmissão ocorre principalmente na área rural pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, sendo endêmica em praticamente todo estado, com surtos epidêmicos registrados em várias localidades, dentre elas, a região de Corte de Pedra. Em 2021, no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro, foram registrados 1.370 novos casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar, dispersos em 161 municípios, apresentando coeficiente de incidência de 9,2 casos/100 mil habitantes. Quando comparado ao mesmo período de 2020 (1.206 casos confirmados), observa-se incremento de 13,6% no número de casos confirmados. A macrorregião Sul concentrou o maior número de casos (701 casos; 51,1%). (COSTA, 2012, SESAB,2022).

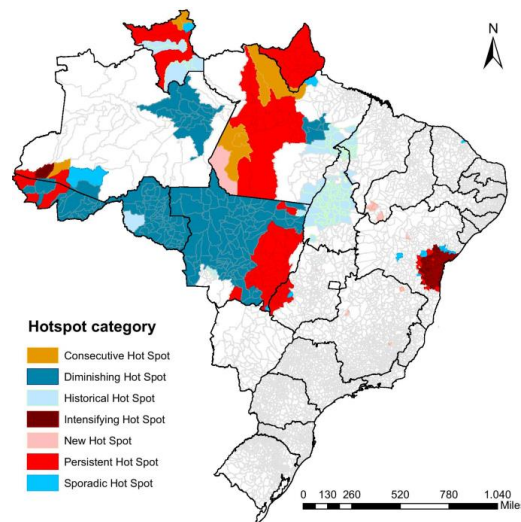
No distrito de Corte de Pedra, localizado aproximadamente 280 Km ao sul de Salvador são registrados altos índices de prevalência, sendo uma das mais importantes áreas de transmissão de *L. braziliensis* no Brasil, onde é mantido o Centro de saúde de referência para diagnóstico e tratamento das Leishmanioses que atende cerca de 1.000 casos/ano. (MACHADO et al, 2002; SCHRIEFER et al, 2009; SESAB, 2016). (Fig 2).



**Figura 2:** Centro de referência em leishmaniose no Distrito de Corte de pedra, Tancredo Neves – Bahia. Fonte: atarde.com.br

Uma tendência geral de diminuição na incidência de LC foi encontrada na análise temporal dos “hotspots” classificados como históricos ou redutores. No entanto foi identificado um “hotspot” localizado no litoral da Bahia, além de outros persistentes e recentes localizados principalmente no Amapá (AP), grande parte de Roraima (RO), leste do Acre (AC), oeste do Pará e sul do Mato Grosso do Sul (MS) (PORTELLA, 2021) (Fig. 3).





**Figura 3.** Hotspots de leishmaniose cutânea usando a análise de Ord Gi e categorizados de acordo com sua tendência temporal usando o teste Mann Kendall Trend (período de tempo que varia de 2001 a 2017). Fonte: Portela, et al, 2021.

A *Leishmania* possui um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, os flebótomos. A transmissão da *Leishmania* ocorre através do repasto sanguíneo de flebótomos fêmeas, momento no qual a forma infectante do parasita, promastigota metacíclica, é injetada no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva do vetor. Essa forma então, se diferencia na forma amastigota que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema fagocitário mononuclear. Os flebotomíneos transmissores da *Leishmania* pertencem à ordem Diptera e existem dois gêneros de importância médica, *Phlebotomus* (vetores na Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia*. (NEVES, 2016).

As manifestações clínicas refletem o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitas no sistema fagocitário mononuclear, e a resposta imune do hospedeiro. A infecção por *L. braziliensis* resulta em três formas clínicas distintas, as quais fazem parte do espectro da LTA: a Leishmaniose Cutânea (LC) é caracterizada por uma ou mais úlceras tegumentares bem delimitadas, de bordas elevadas e fundo granuloso. A evolução clínica da LC é descrita primeiramente com o aparecimento de uma linfadenopatia seguida pela formação de uma pápula e enfim o aparecimento da úlcera no local da picada (BITTENCOURT e BARRAL et al, 1992; BITTENCOURT e BARRAL et al, 1995; MACHADO et al, 2002). A Leishmaniose Mucosa (LM) é definida por lesões que atingem a mucosa nasal podendo também envolver boca, laringe e faringe. A Leishmaniose Disseminada (LD), forma emergente da doença,

caracteriza-se pela presença de dez ou mais lesões papulosas, acneiformes e ulceradas em duas ou mais áreas distintas do corpo (TURETZ et al, 2002).). Em Corte de Pedra, a LC representa cerca de 90% dos casos de LTA, enquanto a LM e a LD representam aproximadamente 4,5 e 3 % dos casos, respectivamente (JIRMANUS et al, 2012).

O diagnóstico da LTA abrange um conjunto de fatores que englobam aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais que se complementam (BITTENCOURT e BARRAL, 1991) e o tratamento das formas clínicas da LTA é feito através do antimonial pentavalente SbV, introduzido no Brasil a mais de 70 anos e comercializado como droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (MACHADO, 2007).

### 2.1.1 Resposta imune e imunopatogênese da leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania (viannia) braziliensis*.

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que infecta e se multiplica dentro dos macrófagos e de células dendríticas. Na Leishmaniose Tegumentar Americana, causada pela *L. braziliensis*, as células TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e natural killer exercem um papel fundamental na produção de INF- $\gamma$  para o controle do parasita (DANTAS, et al. 2014). INF- $\gamma$  ativa macrófagos a produzirem TNF, citocina inflamatória que em sinergia com IFN- $\gamma$  produzem uma resposta imune exacerbada que conduz ao dano tecidual (SILVA, et al. 2007).

Em todas as formas clínicas da LTA, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, tem sido descrito que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2 (PIRMEZ et al., 1993; BACELLAR et al., 2002). Pacientes que contraem a forma cutânea localizada desenvolvem uma resposta do tipo Th1 no nível das lesões, com produção das citocinas inflamatórias: IL-12; IL-2; INF- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . (PAVANELLI et al, 2008). No caso das lesões mucocutâneas, que constituem uma forma crônica associada à destruição a resposta imune é do tipo Th1 e Th2, enquanto pacientes com a forma difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2 (REIS et al, 2006).

O evento crucial para indução da resposta imune efetora contra a *Leishmania* é a eficiente ativação de células capazes de produzir citocinas que levem à ativação de macrófagos, via IFN- $\gamma$ , resultando na síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares (REIS et al, 2006). Esta ativação induz aumento da produção de ROS, elementos necessários para que haja o controle da

replicação parasitária. Por outro lado, uma forte resposta inflamatória, pode causar dano tecidual, o que é observado na infecção por *L. braziliensis* (CARVALHO, 2012). A célula T CD4<sup>+</sup> é a que mais contribui para a produção de IFN- $\gamma$  e esta resposta inflamatória exacerbada está também presente in situ, nas lesões de LTA causada por *L. braziliensis* (BACELLAR, 2002; FARIA, 2005; MACHADO, 2007).

O óxido nítrico é um potente microbicida, além de induzir apoptose, acredita-se que ele pode permitir a falta de resposta dos linfócitos se estiver em baixas concentrações. Níveis baixos e persistentes de NO têm sido envolvidos no estabelecimento e manutenção da falta de resposta de linfócitos em diferentes modelos experimentais de infecções parasitárias (SANMARCO et al., 2016).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos e as células NK são capazes de destruir células infectadas por *Leishmania* e promover patologia (BRODSKYN, 1998; NOVAIS, 2013; CARDOSO 2013). Adicionalmente, o desenvolvimento da lesão cutânea se associa com o aumento da frequência de células T CD8<sup>+</sup> (FARIA, 2005). Foi demonstrado que a ativação do inflamassoma NLRP3 e a secreção de IL-1 $\beta$  são consequência da citotoxicidade mediada pelas células T CD8<sup>+</sup> resultando em inflamação crônica e aumentando a imunopatologia (NOVAIS, 2017; CARVALHO, 2015).

## **2.2 Aspectos epidemiológicos e clínicos da Doença de Chagas**

Doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é uma doença tropical parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida principalmente por insetos da subfamília *Triatominae* (NEVES, 2016; Brazilian Journal of Health Review, 2018, RASSI, et al, 2010). A doença de Chagas atinge cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo mundo, e é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países continentais da América Latina (OMS, 2022). (FIG. 4).



**Figura 4:** Incidência mundial – 6 a 7 milhões pessoas infectadas. Áreas endêmicas - 21 países continentais da América Latina. FONTE: (OMS – 2022)

No Brasil 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). No estado da Bahia, a doença está presente em praticamente todos os municípios, apresentando diferentes potenciais risco de transmissão vetorial. (SESAB, 2012).

Segundo a OMS, nas últimas décadas o padrão epidemiológico da doença mudou de uma doença rural para uma doença predominantemente urbana, principalmente devido à mobilidade populacional, urbanização e emigração. Como consequência, o aumento do número de casos foi detectado no Canadá e nos Estados Unidos da América, e em muitos países europeus e alguns africanos, do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental.

Devido ao alto número de pessoas que permanecem sem diagnóstico ou sem tratamento, combinado com as áreas com transmissão ativa remanescente, estima-se que 75 milhões de pessoas estejam em risco de infecção. Estimativas de 2015 referem que mais de 80% das pessoas com a doença no mundo não têm acesso a diagnóstico, o que garante o elevado impacto de morbimortalidade e custo social da DC. (OMS, 2022).

O *T. cruzi* possui em seu ciclo biológico tipo heteroxênico nos hospedeiros vertebrado e invertebrado em várias formas evolutivas. Nos hospedeiros vertebrados e na cultura de tecidos são encontradas intracelularmente as formas amastígotas e extracelularmente as formas tripomastígotas, presentes no sangue circulante. As formas tripomastígotas são infectantes para células *in vitro* e para vertebrados. A infecção ocorre pela penetração de

tripomastígotas metacíclicos (eliminados nas fezes ou na urina de triatomíneos, durante o hematofagismo) na pele ou mucosa íntegra. (NEVES, 2016).

A transmissão também pode ocorrer através de transfusão sanguínea, transmissão vertical (da mãe para o feto), amamentação, ingestão de alimentos contendo fezes ou urina contaminadas do vetor ou até ingestão do vetor esmagado em alimentos.

A doença de Chagas se apresenta nas formas aguda (sintomática), e crônica (indeterminada ou assintomática, cardíaca ou entérica (megacólon). A fase aguda apresenta as manifestações clínicas como: febre, mal-estar, falta de apetite, edemas (inchaço) localizados na pálpebra ou em outras partes do corpo, aumento do baço e do fígado e distúrbios cardíacos. Na fase crônica muitos pacientes podem passar um longo período, ou mesmo toda a sua vida, sem apresentar nenhuma manifestação da doença, embora sejam portadores do *T. cruzi*. Em outros casos, a doença prossegue ativamente, passada a fase inicial, podendo comprometer muitos setores do organismo, salientando-se o coração e o aparelho digestivo. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico e deve ser realizado utilizando-se dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou frações semipurificadas do parasito ou a IFI) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi*). (LIMA, 2017; TEIXEIRA, 2015; LIMA, 2019). Na doença de Chagas crônica ocorre uma diminuição substancial da parasitemia e presença de vários anticorpos IgG específicos. O desempenho dos ensaios com antígenos purificados ou recombinantes de *T. cruzi*, varia muito devido às preparações de antígeno usadas para detectar os anticorpos anti *T. cruzi*, além de heterogeneidade genética entre cepas circulantes (SANTOS et al., 2018).

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde é o benzonidazol, que deve ser utilizado em pessoas que tenham a doença aguda assim que ela for identificada. No caso dos portadores da doença crônica, a indicação desse medicamento é para aqueles pacientes assintomáticos e com exames sem alterações (forma indeterminada) ou em formas clínicas iniciais, devendo ser avaliados individualmente. (LIMA, 2019; TEIXEIRA, 2015). A profilaxia é muito importante para controle da transmissão. Um dos mecanismos de controle para impedir a multiplicação dos vetores dentro das residências é utilizar o inseticida aplicado por equipe capacitada.

### 2.2.1 Resposta imune e imunopatogênese da Doença de Chagas

A maioria dos indivíduos infectados com o protozoário *Trypanosoma cruzi* encontra-se na forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC), que é caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório na musculatura lisa e estriada, composto por células mononucleares que proliferam e produzem citocinas pró e anti-inflamatórias, mesmo na ausência de morbidade aparente. Citocinas anti-inflamatórias são importantes para a regulação da inflamação, impedindo que ocorram danos teciduais exacerbados mediados pela imunidade a evolução clínica da doença. (SOUZA et al, 2016).

Quando há o predomínio de citocinas inflamatórias, ocorre evolução para a forma cardíaca da doença. Ainda não está bem esclarecido se a evolução para as diferentes formas da doença é determinada pela resposta imune do hospedeiro, ou se a susceptibilidade genética direciona para a forma cardíaca ou indeterminada da doença. (MENEZES et al, 2017). Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de se caracterizar, fenotípica e funcionalmente, diferentes populações celulares e assim compreender seu papel no estabelecimento de respostas protetoras ou patogênicas frente à infecção com o *Trypanosoma cruzi*. (MENEZES et al, 2017). (FIG. 13).

O processo inflamatório na fase crônica da doença de Chagas evidencia a atividade celular dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no tecido cardíaco, embora um número menor de células natural killer (NK), macrófagos e células B também estejam presentes. Na doença de Chagas crônica assintomática ou indeterminada, a presença de células NK aliada à presença de células Treg e células T Natural Killer (NKT) ou macrófagos são responsáveis pelo controle dos mecanismos inflamatórios. (MENEZES et al, 2017).

A capacidade dos tripomastigotas de invadir células T pode desempenhar um papel crucial na imunopatogênese característica da doença de Chagas. A persistência do parasita em níveis baixos nas células-alvo é a marca registrada da fase crônica indeterminada ou assintomática. Um dos principais mecanismos de defesa contra o *T. cruzi* é exercido pelo óxido nítrico (NO), que é produzido pela NO sintase induzível, entre outras enzimas, presentes em monócitos/macrófagos e cardiomiócitos. (VELGE et al, 1991, SANMARCO et al., 2016).

Sabe-se que os anticorpos líticos podem neutralizar as formas tripomastigotas do *T. cruzi* impedindo, assim, a infecção de novas células pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Além disso, observou-se níveis mais altos de subtipos de imunoglobulina IgG3

somente na forma cardíaca, quando comparados com a forma indeterminada. (VERÇOSA, 2006).

### 2.3 Coinfecção entre Leishmaniose Tegumentar e Doença de Chagas

Em várias áreas da América Latina a distribuição geográfica da Leishmaniose tegumentar sobrepõe-se as áreas de transmissão da doença de Chagas variando entre 12 a 70% dos pacientes com sintoma clínico para leishmaniose. (Gil, 2011; CHIARAMONTE et al, 1999; Dias, 2013; Veja et al, 2013).

Pesquisadores em estudo de caso-controle na Argentina encontram uma proporção de 16,6% de pacientes com infecção mista com *Leishmania Sp* e *T.cruzi* dentro do grupo de pacientes com leishmaniose, onde a prevalência foi de 0,17% em relação a 9,73% de soroprevalência da infecção por *T.cruzi* (HOYOS, et. al 2016). Num estudo conduzido num hospital em Los Yungas, na Bolívia, dos 29 pacientes, 8 (27,6%) apresentaram infecção por mais de uma espécie de *Leishmania*, 17 (58,6%) apresentaram infecção por *T. cruzi* e 4 (13,8%) apresentavam infecção mista por *Leishmania* e *T. cruzi*. Os pacientes com a clínica compatível com leishmaniose tegumentar e coinfectados com *T. cruzi*, não apresentavam anormalidades cardíacas típicas da doença de Chagas (BASTRENA et al, 2003). No Paraguai outro estudo mostrou que 8% de 101 pacientes avaliados e infectados por *L. braziliensis* estavam coinfectados com *T.cruzi* (MARTINEZ, 2018).

O maior estudo de prevalência foi realizado no Brasil e relatou a frequência de coinfecção de *L. braziliensis*, *L. infantum* (*L. chagasi*) e *T. cruzi* em uma amostra de 1.100 (Hum mil e cem) pessoas aparentemente saudáveis que viviam em aldeias de rápido crescimento na periferia da cidade de São Luiz do Maranhão. Esse estudo mostrou que 1% do total de indivíduos avaliados, estavam infectados com *L. braziliensis* e *T. cruzi*. Nenhum participante tinha sinais de infecção passada por leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral ou doença de Chagas. (MARTINEZ et al., 2018).

As reações cruzadas entre infecção por *leishmania* e por *T. cruzi* conferem dificuldade na especificidade dos testes diagnósticos e conseqüentemente na detecção da coinfecção, pois as semelhanças filogenéticas entre esses patógenos afetam a precisão dos testes devido as semelhanças antigênicas. (MARTÍNEZ et al., 2018 HOYOS, 2016, FRANK et al., 2003). Além disso, as técnicas de imunodiagnóstico também se configuram como uma limitação na condução de tratamento dos indivíduos com doença de Chagas, uma vez que também dependem do estágio da doença e dos sintomas clínicos. A diversidade de ensaios existentes

no mercado com diferentes antígenos, representa uma carência de um padrão de diagnóstico. O desempenho dos ensaios com antígenos purificados ou recombinantes de *T. cruzi*, varia muito devido às preparações de antígeno usadas para detectar os anticorpos anti *T. cruzi*, além de heterogeneidade genética entre cepas circulantes (SANTOS et al., 2018).

A imunopatologia da coinfeção ainda é incerta. Foi documentado um maior perfil de diferenciação fenotípica de células T (CD4+ e CD8+), em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa infectados com *T. cruzi* em comparação com os pacientes somente infectado por *Leishmania*. Além disso, uma associação entre a diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> e a duração da doença foi encontrada no primeiro ano de infecção, com aumento progressivo de marcadores para a expressão de CD27 e CD28 altamente diferenciados ao longo do tempo. Pacientes com boa resposta à terapia mostraram predominância de células T CD8<sup>+</sup> diferenciadas precocemente enquanto pacientes com recidivas frequentes apresentaram padrão oposto (PARODI, 2016).

### **3. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótese**

A coinfeção com *T. cruzi* de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* está associada com o desfecho clínico desfavorável da doença.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar se a coinfeção por *T. cruzi* de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* está associada com o desfecho clínico desfavorável.

##### **3.2.2 Objetivos Específicos**

Determinar a prevalência de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* e coinfectados com *T. cruzi*, em uma área de transmissão de *L. braziliensis*.

Caracterizar a produção de citocinas e IgG anti-*Leishmania*, nos pacientes com leishmaniose cutânea infectados por *L. braziliensis* coinfectados por *T. cruzi*.



Correlacionar a produção de citocinas e de IgG anti-Leishmania, com o tempo de cura e o desfecho clínico dos pacientes não infectados e coinfectados pelo *T.cruzi*.

Verificar o efeito da coinfeção no desfecho clínico.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 População do estudo**

Foram selecionados cento e oitenta pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, do banco de soro do SIM (Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos) de pacientes atendidos na área endêmica em Corte de Pedra-BA, através das fichas clínicas dos indivíduos que faziam parte do projeto.

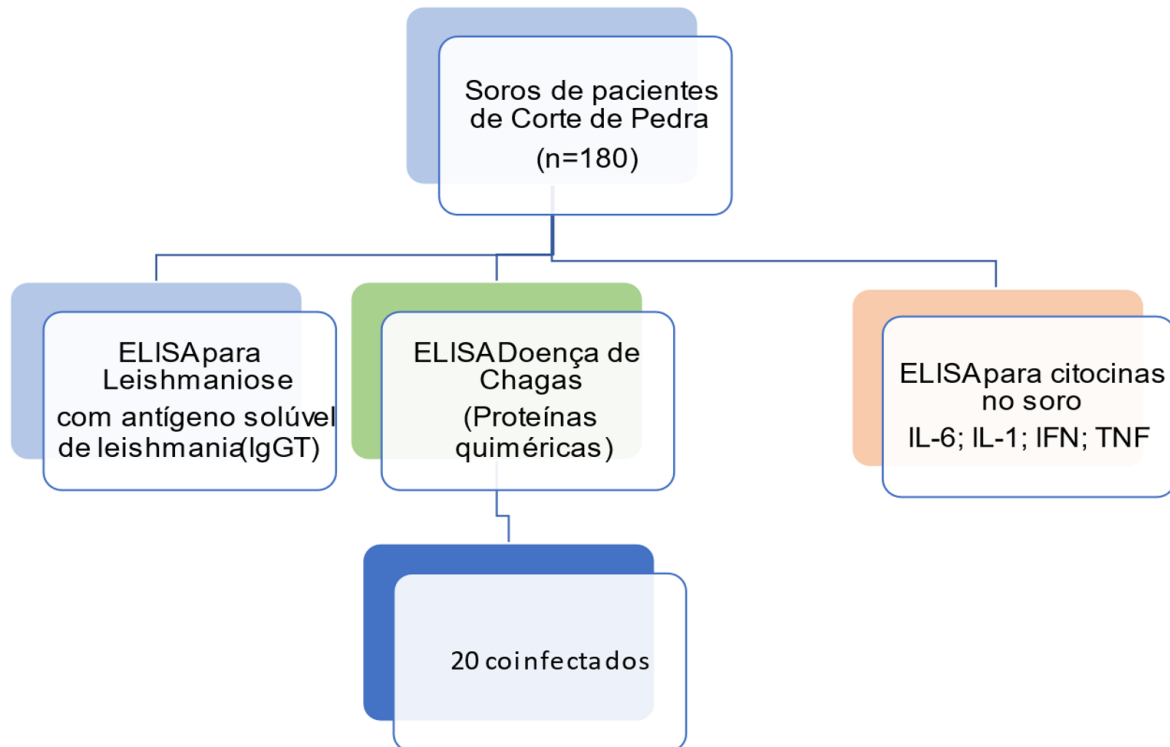
### **4.2 Cálculo amostral**

Para determinar a prevalência de coinfeção por *T. cruzi* na área de transmissão de *L. braziliensis* no Baixo Sul do Estado da Bahia, utilizamos uma amostra piloto de 180 pacientes com LC. Considerando um poder de 95% e  $p < 0,05$ , precisamos recrutar 151 pacientes com LC.

Para os estudos de falha terapêutica, utilizamos as proporções de indivíduos curados no dia 90 após início do tratamento, em uma amostra de pacientes com LC sem infecção por *T. cruzi* (75%) e de LC coinfectados por *T. cruzi* (30%). Considerando um poder de 80% e  $p < 0,05$ , precisamos recrutar 19 indivíduos de cada grupo.

## 4.4 Desenho experimental

Estudo caso-controle



Trata-se de um estudo caso-controle realizado com cento e oitenta (180) soros da soroteca de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) da área endêmica de Corte de Pedra-BA. Foram utilizadas 10 amostras de controles saudáveis para determinação do cutoff da sorologia frente ao antígeno de *Leishmania*.

## 4.5 Definição de Casos

### 4.5.1 Leishmaniose Cutânea

Definida pela presença de uma lesão ulcerativa com bordas elevadas, fundo granuloso sem comprometimento da mucosa nasal com duração da doença maior que 30 dias e confirmação diagnóstica por documentação do DNA de *L.braziliensis* pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), identificação de amastigota em estudo histopatológico e avaliação clínica de equipe multidisciplinar na área endêmica.

Os pacientes com LC foram tratados com antimonial pentavalente (Glucantime; Sanofi Aventis) na dose de 20 mg/kg/dia por 20 dias, por via intravenosa e avaliados a 30 dias para avaliar a resposta a terapia. Os pacientes foram acompanhados até a completa repitelização

das lesões, sem a presença de crostas ou bordas elevadas no dia 90. Após os noventa dias, os pacientes que permaneceram com lesão ativa receberam nova série do antimônio ou foram tratados com outra droga como Miltefosina.

#### **4.5.2 Leishmaniose Cutânea coinfectados com *T. cruzi***

Soros do banco de estudo de leishmaniose que tiveram sorologia positiva para doença de chagas utilizando as proteínas quiméricas específicas do *T. Cruzi* realizadas pelo Laboratório de Saúde Pública – LASP, da FIOCRUZ-BA

#### **4.6 Critérios de Inclusão**

Indivíduo de qualquer gênero, com idade superior a 15 anos e inferior a 60 anos atendidos que apresentaram diagnóstico para leishmaniose baseada na definição de casos descrita acima.

#### **4.7 Critérios de não inclusão**

Indivíduos que apresentarem história pregressa de doença cutânea ou mucosa, gestantes ou acometidas com outras doenças infecciosas e ou imunossupressora.

#### **4.8 Considerações Éticas**

O presente estudo foi suportado pelo projeto intitulado “Papel de células da resposta inata na patogênese da infecção por *Leishmania braziliensis*” aprovado pelo CEP da Faculdade de Medicina da Bahia – UFBA no dia no dia 01 de dezembro de 2015 com parecer n° 1.343.070.

## **5 MÉTODOS EXPERIMENTAIS**

### **5.1 Determinação sorológica para Imunoglobulina IgGTotal anti-*Leishmania***

Os ensaios foram realizados em microplacas transparentes de fundo plano de 96 poços revestidas com antígeno diluído Lb001 (10ug/mL) de *L. braziliensis* em tampão carbonato

(carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6) e incubadas a 4°C durante a noite. Após três ciclos de lavagem com PBS-0,05% Tween 20 (PBS-T; pH 7,4), as microplacas foram incubadas com tampão de bloqueio solução salina tamponada com fosfato 0,05 M (PBS; pH 7,4 / SFB 10%) por uma hora, e passaram por quatro ciclos de lavagem. As amostras de soro foram diluídas a 1:50 em solução salina tamponada com fosfato 0,05 M (PBS; pH 7,4 / SFB 10%), depois, foram pipetadas nas microplacas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, todos os poços foram lavados 5 vezes e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos com IgG anti-humano de murino conjugado com peroxidase diluído 1:10.000 em solução salina tamponada com fosfato 0,05 M (PBS; pH 7,4 / SFB 10%). Após um ciclo de 5 lavagens, 50ul de TMB (Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina) foi adicionado, seguido de incubação por 15 min à temperatura ambiente (RT) no escuro. A reação colorimétrica foi interrompida pela adição de 50 ul de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 N e lida em espectrofotômetro de microplacas em um comprimento de onda de absorbância de 450 nm onde depois foram analisadas pelo Programa Instat e Prisma 5.0.

## **5.2 Determinação sorológica das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ e TNF**

A determinação sorológica foi feita de acordo com a técnica ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante dos kits comerciais da marca BD OptEIA™ para IL-6, IL-1 beta, IFN-gama e TNF-alfa. Esses ensaios foram realizados em microplacas de fundo plano de 96 poços (Thermo Scientific Nunc) revestidas anticorpo de captura anti IL-6, IL-1Beta, IFN-gama e TNF-alfa diluídos 1:250 em tampão carbonato (carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6) e incubadas Over Nighth. As microplacas foram então lavadas 3 vezes com PBS-0,05% Tween 20 (PBS-T; pH 7,4) e incubadas com tampão de bloqueio solução salina tamponada com fosfato 0,05 M (PBS; pH 7,4 / SFB 10%) por uma hora. Posteriormente, todos os poços foram lavados 3 vezes com PBS-0,05% Tween 20 (PBS-T; pH 7,4). Em seguida foram pipetados a curva padrão diluída a partir da concentração de 1000pg e 100ul das amostras, depois foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Todos os poços foram lavados com PBS-0,05% Tween 20 (PBS-T; pH 7,4) por 5 vezes. Então, pipetou-se o anticorpo de detecção (conjugado biotilado diluído (1:250) em (PBS; pH 7,4 / SFB 10%) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente, depois, foram realizados 7 ciclos de lavagem e adicionados 100 ul de TMB (Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina) sendo incubado por 15 min à temperatura ambiente no escuro. As reações colorimétricas foram interrompidas

pela adição de 50 µl de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1N (Solução STOP) e lidas em espectrofotômetro de microplacas em um comprimento de onda de absorvância de 450 nm.

### 5.3 Determinação sorológica da infecção por *T. cruzi* com proteínas quiméricas

A determinação sorológica da infecção causada pelo *T. cruzi* foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos indiretos no formato ELISA, padronizados em um estudo anterior (SANTOS et al., 2016b; SANTOS et al., 2017a). As microplacas de poliestireno (UV-Star<sup>®</sup> Microplate, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria), foram sensibilizadas com 100 µl de solução carbonato/bicarbonato contendo 25 ng dos antígenos IBMP-8.1, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 e 12,5 ng da molécula IBMP-8.2. Em seguida, foram adicionados 100 µl da solução WellChampion<sup>™</sup> (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) para bloqueio e estabilização dos antígenos. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, foram esvaziadas por inversão e colocadas em estufa a 37° C por 20 minutos para secagem.

As amostras foram diluídas 100 vezes em tampão PBS 1x pH 7.4 e adicionadas às microplacas sensibilizadas com os antígenos IBMP. Foram utilizados cinco controles positivos e cinco negativos, diluídos na mesma proporção (1:100) posteriormente utilizados para determinar do (*cut-off*), em seguida, 100 µL das amostras diluídas foram adicionadas na placa e incubadas a 37° C por 60 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µl de anti-globulina humana (anti-IgG) conjugada à peroxidase diluída 40.000 vezes (anticorpo cedido por Bio-Manguinhos, FIOCRUZ-RJ) e incubadas em estufa a 37° C por 30 min. Ao final do segundo ciclo de lavagem, foram adicionados 100 µl da solução reveladora TMB Plus (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup) e incubadas a temperatura ambiente por 10 min na ausência de luz. Para finalizar a reação foi adicionado 50 µL da solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,2M) e o resultado final foi lido a 450 nm.

Os pontos de corte foram calculados individualmente para cada antígeno a partir dos controles positivos e cinco negativos para a doença de Chagas, os quais foram diagnosticados anteriormente através de dois testes sorológicos com preparações antigênicas distintas, a saber: ELISA Chagas III (BIOSChile, Ingeniería Genética S.A., Santiago, Chile), que utiliza extrato total das cepas Mn e Tulahuen como antígenos, e Gold ELISA Chagas (batch CHA132A; Rem, São Paulo, Brazil), que emprega uma mistura de antígenos recombinantes e lisados purificados da forma epimastigota de cepas brasileiras do *T. cruzi*.

Os valores das densidades ópticas obtidos foram exportados para o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., EUA). A partir disso, foi calculada a área abaixo da curva

ROC (AUC – *area under ROC*) utilizando um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para obtenção dos valores dos pontos de corte. Após definição dos pontos de corte por microplaca, foi realizada a normalização dos dados, a qual teve o objetivo de evitar a variabilidade inerente a cada microplaca. Para isso, foi calculado o índice de reatividade (IR) para cada amostra, como descrito abaixo: *Índice de reatividade (IR) = DO da Amostra / Valor do CO*. Foi considerada negativa toda amostra com IR inferior a 1,00 e positiva todas aquelas com IR igual ou superior a 1,00. Com o objetivo de evitar erros sistemáticos, foi estabelecido como critério de repetição todas as amostras com IR entre 0,80 e 1,20. A partir da obtenção dos valores do IR de cada amostra, os resultados foram representados em gráficos pelo GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., EUA).

## 6 RESULTADOS

**Tabela 1. Características clínicas e demográficas de pacientes com leishmaniose cutânea coinfectados com *T. cruzi*.**

A tabela 1 mostra que não houve diferença entre a média de idade (28 e 31 anos) dos pacientes coinfectados e os infectados somente com *Leishmania*, respectivamente ( $p>0,05$ ). O gênero foi predominantemente masculino, sendo em 90% dos pacientes coinfectados e 66% somente infectados por *Leishmania*. Não houve diferença nos tamanhos das papulas (em média) da reação intradérmica de Montenegro entre os dois grupos de pacientes ( $p>0,05$ ). Quanto a presença de linfadenopatia foi maior nos coinfectados ( $p>0,05$ ). Em relação a área de lesão, os pacientes coinfectados apresentaram maior área ( $p< 0,0001$ ), porém quanto ao número de lesões não difere entre os grupos ( $p>0,05$ ).

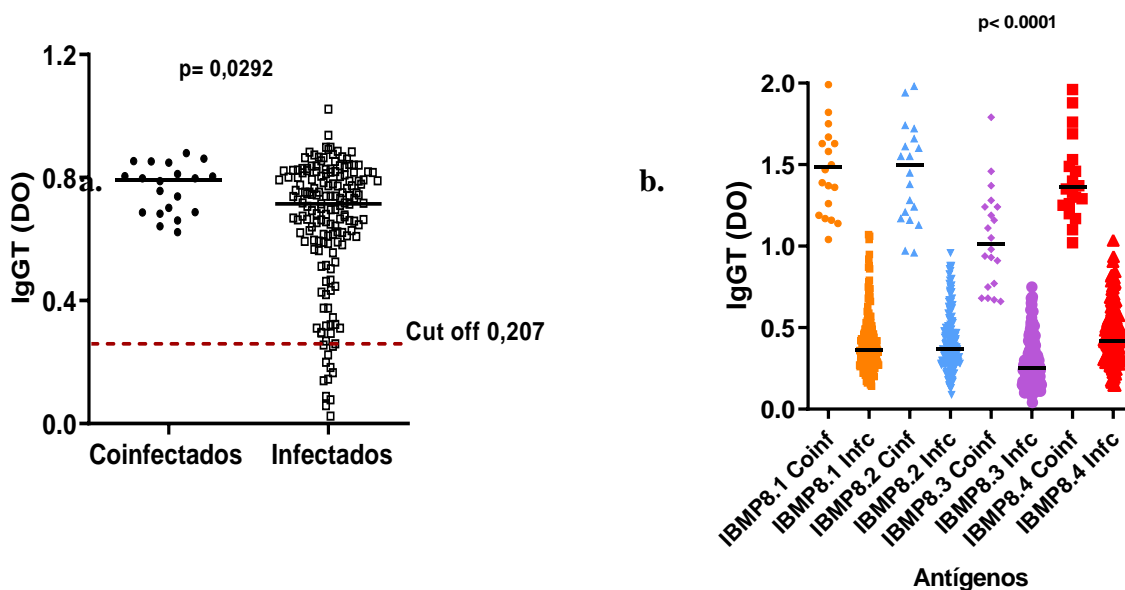
A tabela apresenta ainda, dados do desfecho clínico da infecção por *Leishmania braziliensis*, onde a cura em até noventa (90) dias é considerada um desfecho favorável. Os pacientes coinfectados falharam mais ao tratamento (70%), quando comparados aos pacientes apenas com infecção por *Leishmania*, onde (42%) falharam. O tempo para cura observado em dias de doença em 13 pacientes dos 20 coinfectados e 128 pacientes infectados somente com leishmania foi maior nos pacientes coinfectados ( $p>0,05$ ).

<b>Características</b>	<b>Coinfectados (n=20)</b>	<b>Infectados (n=160)</b>	<b>Valor p</b>
Idade (ano; M±SD)	(28±8)	(31±12)	>0.05
n (%) de masculino	18 (90)	100 (66)	> 0,01
IDRM <sup>+</sup>	(14±3)	(16±6)	>0.05
Área da lesão	(388±464)	(217±325)	< 0,0001
Tempo de cura (dias)	(105±58)	(86±41)	>0,05%
Linfadenopatia n (%)	19 (95%)	111(69%)	<0,05%
Número de lesões (mais de 1 lesão)	4 (20%)	33 (21%)	>0,05%
<b>Desfecho Clínico</b>			
Falha >90 n (%)	14(70)	68(42)	< 0.03

#Unpaired test. \*qui quadrado. IDRM – intradermoreação reação de Montenegro positiva

**Figura 5 – Produção de IgG Total frente aos antígenos de *Leishmania braziliensis* e *T. cruzi*.**

Foram realizadas sorologia para dosagem de IgG Total frente aos antígenos de *Leishmania* e proteínas quiméricas do *T. cruzi*, onde foram detectados vinte indivíduos coinfectados (11%). As amostras dos coinfectados apresentaram títulos de anticorpos anti-*Leishmania* mais elevados em comparação com pacientes infectados apenas com *Leishmania*, com níveis séricos de IgGT acima do cut off em ambos os grupos, contudo, os títulos mais acima do cutoff foram no grupo de pacientes coinfectados ( $p < 0,001$ ). (Figura 5 a). Frente às proteínas quiméricas do *T. cruzi*, foram detectados títulos mais elevados nos coinfectados para as quatro proteínas utilizadas ( $p < 0,0001$ ). (Figura 5b).



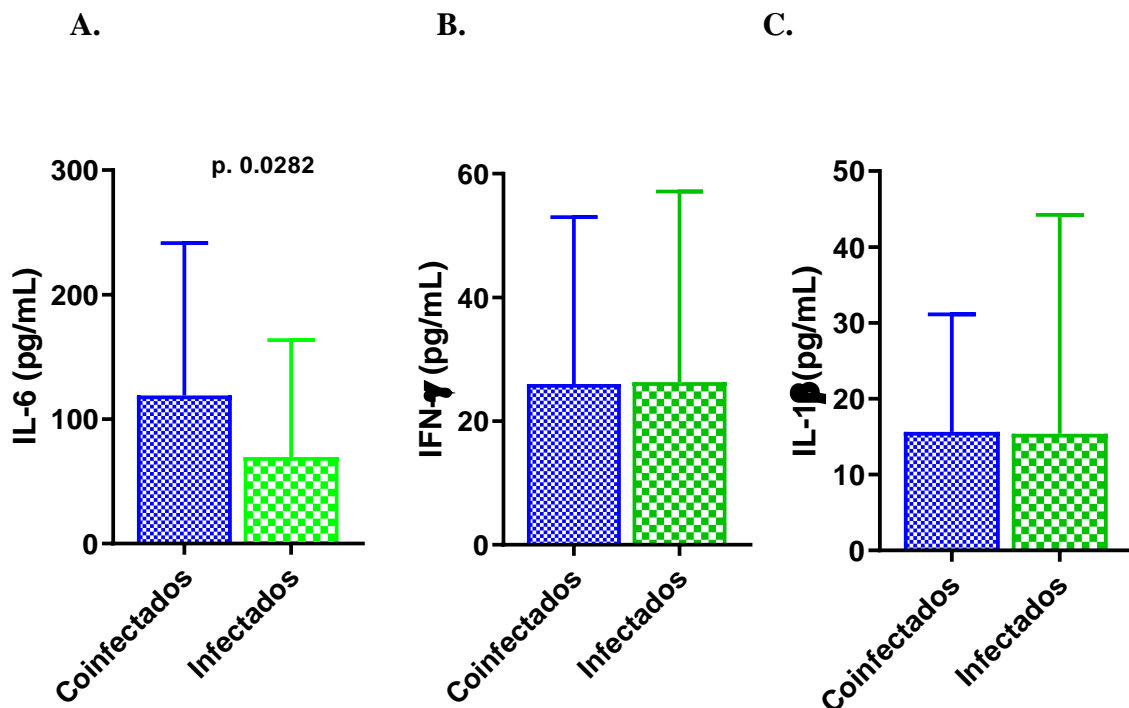
**Figura 5. Identificação sorológica dos pacientes com Leishmaniose cutânea a partir do antígeno solúvel de leishmania.** (A) Pacientes com LC (n=200). Pacientes infectados com leishmania e *T.cruzi* (n=20) e pacientes infectados com leishmania (n=180). (B) **Identificação dos pacientes a partir das proteínas quiméricas para *T. cruzi*.** Foram utilizadas as proteínas do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP 8.1, 8.2, 8.3). A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney  $*p < 0,05$  e a técnica utilizada para determinação sorológica ELISA Indireta (Enzyme-linked immunosorbent assay)



**Figura 6. Produção de citocinas pró-inflamatórias de pacientes com leishmaniose cutânea e coinfectados pelo *T. cruzi*.**

Quando comparadas as citocinas em todos os pacientes do grupo de estudo, a produção de IL-6 foi maior no grupo de pacientes coinfectados ( $p < 0,0282$ ), quando comparados com os pacientes somente infectados com *Leishmania*. Não houve diferença estatística significativa na produção de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  em pacientes com LC e coinfectados com *T. cruzi*. (Figuras 6 A-C).

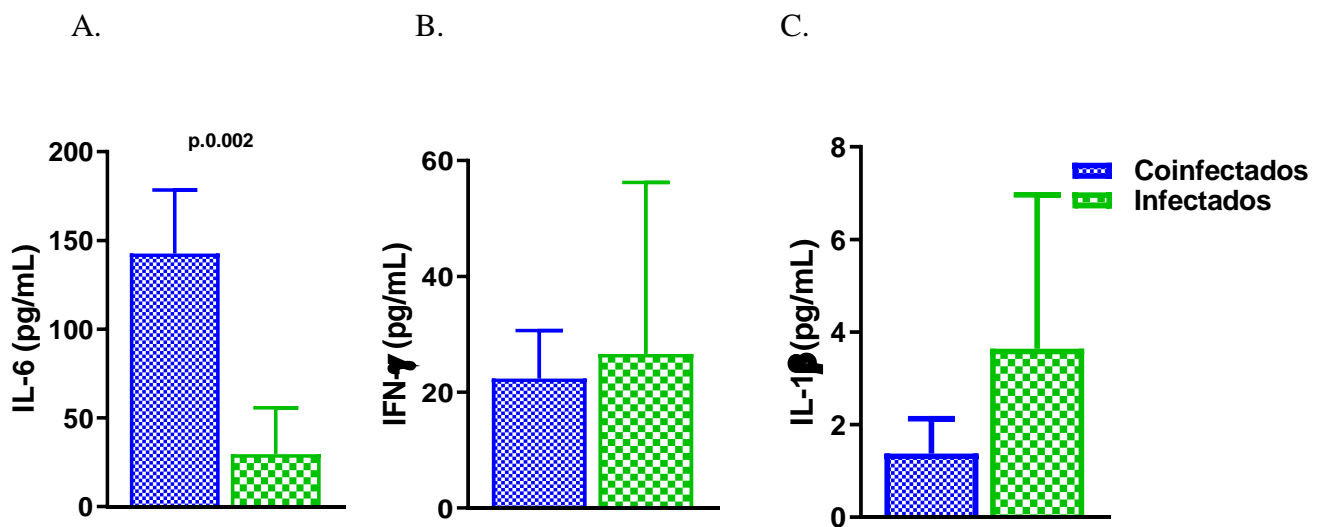
A produção de TNF nos pacientes coinfectados foi abaixo do limite de detecção do Kit, havendo produção apenas nos pacientes somente infectados por *Leishmania*.



**Figura 6. Dosagem de citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  IL-1 $\beta$ , no soro.** Pacientes coinfectados N=20 e pacientes infectados com *Leishmania braziliensis* N = 162. (A) Produção de IL-1 $\beta$ . (B) Produção de IFN- $\gamma$ . (C) Produção de IL-6. (D) Produção de TNF- $\alpha$ . A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. \* $p < 0,05$  e a técnica utilizada para determinação sorológica ELISA Sanduiche (Enzyme-linked immunosorbent assay)

**Figura 7. Produção de IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , em pacientes com leishmaniose cutânea e coinfectados pelo *T. cruzi* que falharam ao tratamento com antimônio no dia 90 de acompanhamento.**

Quando comparados, os pacientes que falharam, a produção de IL-6 foi maior ( $p=0.002$ ) no grupo de pacientes coinfectados em relação aos pacientes somente infectados com *Leishmania*. Não houve diferença estatística significativa nos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , porém, observou-se níveis maiores dessas citocinas no grupo de pacientes infectados somente com *Leishmania braziliensis*. (FIGURA 7 A-C).

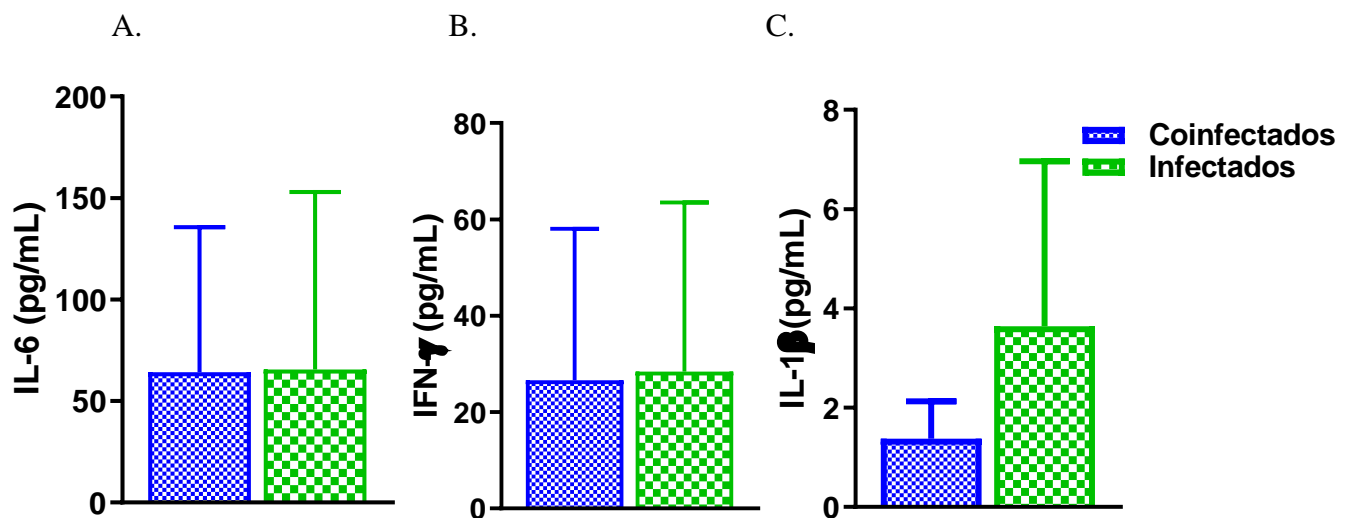


**Figura 7. Dosagem de citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  no soro dos pacientes que falharam ao tratamento.** Pacientes coinfectados N=20 e pacientes infectados com *Leishmania braziliensis* N = 71. (A) Produção de IL-6. (B) Produção de IFN- $\gamma$ . (C) Produção de IL-1 $\beta$ . Determinação sorológica pela técnica ELISA Sanduiche (Enzyme-linked immunosorbent assay). A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. \* $p<0,05$ .

**Figura 8. Produção de IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  em pacientes com leishmaniose cutânea e coinfectados pelo *T. cruzi* que curaram ao tratamento com antimônio até o dia 90 de acompanhamento.**

Quando comparados, as citocinas nos pacientes que curaram ao tratamento, não houve diferença estatística entre os grupos, porém houve maior produção de IL-1  $\beta$  nos pacientes somente infectados por *Leishmania*. (FIGURA 8 A-C).

Os resultados mostram que os pacientes coinfectados falham mais ao tratamento com antimonial indicando que a coinfeção pode interferir na resposta imune e na evolução clínica do indivíduo na infecção por *Leishmania*.



**Figura 8. Dosagem de citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  no soro dos pacientes que curaram até o dia 90 de tratamento.** Pacientes coinfectados N=20 e pacientes infectados com *Leishmania braziliensis* N = 84. (A) Produção de IL-6.. (B) Produção de IFN- $\gamma$ . (C) Produção de IL-1 $\beta$ . Determinação sorológica pela técnica ELISA Sanduiche (Enzyme-linked immunosorbent assay). A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. \*p<0,05.

## 7 DISCUSSÃO

A leishmaniose cutânea (LC) e a doença de Chagas são negligenciadas e atingem uma grande parcela da população mundial, principalmente em zonas rurais onde os indivíduos estão mais expostos a vetores que possam transmitir doenças. Nas regiões onde leishmaniose cutânea ocorre é frequente a presença de indivíduos parasitados com mais de um patógeno, este fato pode estar associado a vulnerabilidade da população à assistência a saúde e a condições de moradia. Em regiões endêmicas para *Leishmania* é comum a presença de indivíduos coinfectados por helmintos, bactérias e outros protozoários, isso indica a importância de compreender como o poliparasitismo pode interferir no tratamento tanto da LC como de outras patologias. (MARTINEZ et al, 2018, SHEN et al, 2019, SUPALI, 2010).

No caso de parasitos que estão incluídos na mesma família de classificação toxonômica, a reatividade cruzada nos testes sorológicos tem sido um desafio para os profissionais. Neste trabalho, para evitar reação cruzada com antígenos do gênero *Leishmania*, a coinfeção foi determinada através da soroprevalência de IgG *anti-Trypanossoma cruzi* com base das proteínas quiméricas IBMP8 e suas variantes antigênicas de 1 a 4 (SANTOS et al, 2018).

A soroprevalência da Doença de Chagas é bastante expressiva na Bahia chegando a 627 óbitos na última década e a maioria dos casos apresentam-se na fase crônica indeterminada. Na região endêmica de Corte de Pedra, mostramos que todos os pacientes coinfectados, recrutados para este estudo, com sorologia positiva para *Leishmania* apresentaram, no mínimo, positividade para três das quatro quimeras testadas para detectar coinfeção, demonstrando uma prevalência de 11% da Doença de Chagas, na fase crônica indeterminada. Assim como na Leishmaniose Cutânea, a Doença de Chagas também está relacionada a um perfil socioeconômico, sendo mais acometidos moradores da zona rural de baixa renda e escolaridade. Na área endêmica em estudo 90% dos indivíduos positivos para *T.cruzi* são adultos jovens do sexo masculino. Os indivíduos somente infectados com *Leishmania* 66% são do sexo masculino, o que pode ser explicado devido ao trabalho no campo, culturalmente ainda realizado principalmente por homens na área periurbana onde há maior exposição ao flebotomíneo.

A LTA é uma doença que apresenta ampla complexidade em diferentes aspectos, podendo ser resultante da interação entre a resposta imunológica do hospedeiro, das características genéticas das espécies envolvidas na infecção, aspectos epidemiológicos da área endêmica e possíveis coinfeções. A resposta imune exerce um papel importante no

controle das infecções, entretanto a resposta imune inflamatória exacerbada está associada à imunopatogênese das formas clínicas causadas por *L. braziliensis* (CARVALHO et al, 2012). Pacientes que apresentam produção elevada de IFN- $\gamma$  e TNF, podem desenvolver lesões cutâneas e mucosas (JESUS et al., 1998). Essas citocinas foram associadas ao tamanho da lesão e o aparecimento de formas mais graves da doença (ANTONELLI et al., 2005) o que reforça a importância da resposta imune na patogênese da doença. Não encontramos diferenças na produção IFN- $\gamma$  e TNF (dados não mostram) entre os pacientes com leishmaniose cutânea e os pacientes coinfectados com *T. cruzi*, o que é esperado pois a resposta Th1 é predominante em pacientes com a forma crônica da Doença de Chagas. Além disso, tem sido mostrado o papel de células TCD8<sup>+</sup>, NK e macrófagos no desenvolvimento das lesões cutâneas em pacientes infectados por *L. braziliensis*. (Novais, 2017). As células T CD8<sup>+</sup> estimulam a secreção de IL-1 $\beta$  através do inflamassoma promovendo a progressão da doença (NOVAIS, 2017; SANTOS, 2018). Não encontramos diferença dessa citocina no soro dos pacientes coinfectados ou somente infectados.

Tem sido descrito que a citocina IL-6 regula a ativação do inflamassoma e, conseqüentemente, a produção de NO induzido por IL-1 $\beta$ . Em um modelo murino de infecção por *T. cruzi*, a ação anti-inflamatória da IL-6 parece ser central para controlar o estresse oxidativo local e sistêmico, além de promover resgate celular da apoptose. Este poderia ser um novo mecanismo que regula a liberação de NO no cenário da infecção por *T. cruzi* (SANMARCO et al., 2016). Neste estudo, nós mostramos que os níveis de IL-6 foram mais elevados nos pacientes coinfectados, quando comparado aos pacientes somente infectados por *Leishmania*, demonstrando que pode ocorrer uma menor resposta regulatória ao ambiente inflamatório.

Alguns estudos sugeriram que camundongos knockout para IL6 mostraram maior controle sobre a infecção com rápida eliminação do parasito e estimulação da resposta Th1 anti-*Leishmania*: níveis aumentados de interferon gama circulante, granulação acelerada, montagem acelerada do granuloma e maior capacidade de resposta à quimioterapia. Isso mostra que há uma imunidade eficiente contra a infecção por *Leishmania* na ausência de IL6. (SONI, 2018).

A interleucina-6 medeia a defesa do hospedeiro e a sobrevivência celular principalmente através da ativação do fator de transcrição STAT3 via glicoproteína gp130, um receptor de transdução de sinal compartilhado para várias citocinas do tipo IL-6. Além disso, regula a síntese de IgA e induz diferenciação de TCD8 citotóxica, e a produção de

autoanticorpos. A IL-6 impede nitração de células T CD8<sup>+</sup> e suscetibilidade à apoptose e pode ser um fator chave para melhorar a ativação e sobrevivência das células T CD8<sup>+</sup>. Um anticorpo neutralizante de IL-6 aumentou a porcentagem de nitração de células T CD8<sup>+</sup> induzida por *T. cruzi* e elevou a liberação de óxido nítrico (TRUYENS et al., 1994. SANMARCO et al., 2016)

O parasita pode modificar a resposta induzida por IL-6 através da modulação de sua atividade de cisteína protease, sugerindo que inibidores específicos podem ajudar a melhorar a ativação de células imunes e efeitos cardioprotetores (TRUYENS et al., 1994). Ponce e colaboradores em 2013 num estudo experimental em humanos, observaram que o *T. cruzi* possui uma enzima que é capaz de inibir a ação da IL-6, a enzima cruzipaina, cliva o transdutor de sinal IL-6 gp130 e, conseqüentemente, leva à inibição da cardioproteção induzida por IL-6.

A resposta de células TCD8<sup>+</sup> está aumentada na doença de Chagas e é um fator associado à patogênese da LC. É possível que células TCD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* migrem para a lesão de pacientes com LC e degranulem. Esse processo às vezes não é antígeno-específico, pode ser através do NKG2D presente nas TCD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi*. (CROSBY et al, 2014).

A sobreposição dessas doenças aumenta a probabilidades de complicações na doença de Chagas e falha terapêutica no caso da leishmaniose. Além disso, a doença de Chagas na forma indeterminada é assintomática, dificultando a identificação da existência de uma coinfeção, isso é um fator complicador para o tratamento nas duas infecções. Quando a persistência do patógeno se estabelece durante a infecção, a exposição crônica a um microambiente inflamatório também pode contribuir para o comprometimento das respostas das células T CD8<sup>+</sup>, resultando em uma resposta menos eficiente à eliminação do patógeno e promovendo sua persistência. As células T podem ser afetadas pela exposição crônica a antígenos. Esse comprometimento nas respostas de células T CD8<sup>+</sup> específicas de *T. cruzi* foi associado a um aumento da frequência de células de memória totalmente diferenciadas e a um aumento da taxa de apoptose na população total de células T CD8<sup>+</sup> periférica (SANMARCO et al., 2016). Achados na literatura sugerem que a resposta humoral ao *T. cruzi* acontece com o objetivo de opsonizar e neutralizar o patógeno, além de ativação de células citotóxicas dependentes de anticorpos.

Em leishmaniose, a associação entre o quadro clínico do paciente com o perfil de imunoglobulinas, bem como, com sua avidéz, é muito complexa. (SOUZA et al, 2005). Nesse estudo nós mostramos que pacientes coinfectados, apresentaram títulos de anticorpos anti-*Leishmania* mais elevados em comparação com pacientes apenas com Leishmaniose, indicando que a coinfeção também pode interferir na resposta de anticorpo.

O tropismo tecidual específico de diferentes isolados de *Trypanosoma cruzi*, pode influenciar a evolução clínica da doença. A frequência elevada de células T ativadas CD4+CD28 no sangue periférico de portadores da doença de Chagas está associada com a expressão de IL-10 na forma indeterminada. (CROSBY et al, 2014). A existência simultânea de reatividade celular anti e pró-inflamatória frente à presença constante de estímulo antigênico, tanto do parasita quanto do hospedeiro, leva à diferentes formas da doença de Chagas. Além disso, fatores que determinam a produção dessas citocinas, como os estímulos antigênicos associados à infecção e a ocorrência de polimorfismos gênicos, desempenham papel essencial na imunopatologia chagásica. A compreensão da interação na coinfeção entre leishmaniose e doença de Chagas é fundamental para um tratamento mais eficaz e menos danoso ao paciente. Existe um grande desafio na comunidade biomédica para uma alternativa de tratamento desses pacientes coinfectados, utilizando diferentes tipos de tratamento. A combinação de drogas para tratar duas infecções ao mesmo tempo, pode levar ao aumento da intolerância e efeitos adversos. (MARTÍNEZ et al., 2018). Medicamentos antimoniais por exemplo, são cardiotoxicos e podem agravar uma cardiomiopatia chagásica. Um tratamento não convencional para a leishmaniose pode abrir novas perspectivas para o tratamento da doença na coinfeção com *T.cruzi*.

Na leishmaniose, a falha terapêutica pode ocorrer como um fator particular do indivíduo, condição genética, fase da doença, forma clínica ou espécie envolvida. Ela ocorre entre 38-70% dos casos e os pacientes que apresentam falha no tratamento precisam de outra série de antimonial pentavalente (Sb<sup>v</sup>) ou medicamentos alternativos para alcançar a cura. (MACHADO et al, 2007). Nós mostramos neste estudo que a maioria dos pacientes coinfectados (70%) precisaram de outra série de antimônio para curar a lesão.

As coinfeções podem influenciar na resposta imunológica interferindo no curso clínico e terapêutico da LTA, devendo ser um aspecto a ser considerado durante o manejo do paciente (CATALDO, 2016). Estudos em camundongos mostraram que na presença de infecção por helmintos, o desenvolvimento de lesões cutâneas aumentaram, enquanto outros diminuíram ou permaneceram inalterados. (MARTINEZ, 2018). Um estudo experimental

sugeriu que as respostas Th2 induzidas pela infecção helmíntica tiveram efeitos sistêmicos, que diminuíram a resposta Th1 local inicial à *Leishmania*. O tempo de cicatrização também foi avaliado, sendo maior para os pacientes com LT e infecção por helmintos do que para pacientes apenas com LT (MARTINEZ, 2018). Há relatos sobre coinfeção de hanseníase lepromatosa e leishmaniose mucosa, onde observou-se forte reação cutânea e alta produção de IFN $\gamma$  contra antígenos de *Leishmania*, enquanto as respostas contra antígenos de *M. leprae* foram quase ausentes (MARTINEZ, 2018).

O antimonial pentavalente é conhecido por prolongar o tempo de QT (tempo para o coração recarregar seus batimentos), causando arritmia. Eles são, portanto, contraindicados em pacientes com doença cardíaca conhecida. Por um lado, cardiomiopatia é uma manifestação clínica bem conhecida da doença de Chagas, portanto, prudência é recomendado em pacientes com coinfeção por *Leishmania* e *Trypanosoma* (MARTINEZ et al, 2018).

Esse trabalho demonstra a necessidade de uma conduta direcionada nos casos de pacientes que falham a terapia no sentido de uma investigação voltada para a identificação da existência da coinfeção por *T. cruzi* para que seja possível a escolha adequada do tratamento, onde se possa diminuir os riscos dos efeitos do antimônio em um paciente chagásico, e em busca de sucesso no tratamento dos pacientes refratários ao tratamento leishmaniose cutânea.

Além disso, enquanto os melhores tratamentos com medicamentos eliminariam os parasitas, os medicamentos desenvolvidos até o momento não conseguem induzir a cura estéril e, muitas vezes são lamentavelmente ineficientes no controle da doença.



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pacientes com leishmaniose e coinfectados por *T. cruzi* apresentaram níveis de Imunoglobulinas mais elevados em relação aos somente infectados por *Leishmania*. Dessa forma a dosagem de imunoglobulinas frente a antígeno de *Leishmania* nos pacientes coinfectados e o diagnóstico para Doença de Chagas, podem contribuir para orientar a conduta clínica nesses pacientes.

Os níveis de IL-6 foram mais elevados nos pacientes coinfectados quando comparado aos pacientes somente infectados por *Leishmania* e no grupo de pacientes que falharam a terapia com antimonial pentavalente até noventa dias (90) de tratamento. Nós mostramos através desse trabalho a importância de uma investigação diagnóstica de coinfeccões para os pacientes que falham ao tratamento, contribuindo para uma conduta clínica que leve em consideração uma doença preexistente.

## 9 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. F., 2013. Avaliação da produção de citocinas Th17, Th1 e Th2 por linfócitos T em pacientes com leishmaniose tegumentar americana.
- ALMEIDA, H., MARTINS, E., FRANCISCON, U.J., TEIXEIRA, P.A.V., BARBOSA, J.F.A., & GOBBI M. A. R. H. (1986). Características das células parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi* na parede da veia central das supra-renais de chagásicos crônicos. In *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Vol. 19, Issue 4).
- ALMEIDA L., R. *Aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares da resposta dependente do receptor do tipo Toll 9 na infecção experimental por cepas de diferentes linhagens de Trypanosoma cruzi*. 2013.
- ATLAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: diagnósticos clínico e diferencial /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 136 p.: il. color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)
- ANTONELLI, Lis RV et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters*, v. 101, n. 2, p. 226-230, 2005.
- BACELLAR, Olívia et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity*, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.
- BASTRENTA, B., MITA, N., BUITRAGO, R., VARGAS, F., FLORES, M., MACHANE, M., YACSIK, N., TORREZ, M., LE PONT, F., & BRENIÈRE, F. (2003). Human Mixed Infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a Sub Andean Bolivian Area: Identification by Polymerase Chain Reaction/hybridization and Isoenzyme. In *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* (Vol. 98, Issue 2).
- BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 51-56, 1991.
- BRODSKY, Frances M. et al. Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunological reviews*, v. 168, n. 1, p. 199-215, 1999.
- BUSTOS, G.M. F., GONZÁLEZ-PRIETO, G., RAMOS, F., MORA, M. C., HASHIGUCHI, Y., PARODI, C., BASOMBRÍO, M. A., MORENO, S., MONROIG, S., BECKAR, J., Jaime, D., SAJAMA, J., YEO, M., MARCO, J. D., Locatelli, F. M., & Barrio, A. (2016). Clinical and epidemiological features of leishmaniasis in northwestern-Argentina through a retrospective analysis of recent cases. *Acta Tropica*, 154, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.008>

CAMPOS, Taís M. et al. Granzyme B produced by natural killer cells enhances inflammatory response and contributes to the immunopathology of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 221, n. 6, p. 973-982, 2020.

CASTÉS M, Tapia FJ. Inmunopatología de la leishmaniasis tegumentaria Americana [Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis]. *Acta Cient Venez.* 1998;49(1):42-56. Spanish. PMID: 10205916.

CASTRO, M. C. A. B. Estudo do papel de linfócitos T CD4+ e CD8+ e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana, 2013.

CATALDO, J. I., Avaliação da influência da espécie de *Leishmania* e da coinfeção por parasitos intestinais no curso clínico e resposta terapêutica da leishmaniose tegumentar americana em pacientes tratados com 5 mg sbv/kg/dia de antimoniato de meglumina. 2016.

CARDOSO, Fernanda Alvarenga et al. Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico. 2013. Tese de Doutorado.

CARVALHO AM, Guimarães LH, Costa R, Saldanha MG, Prates I, Carvalho LP, Arruda S, Carvalho EM. Impaired Th1 Response Is Associated With Therapeutic Failure in Patients With Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis.* 2021 Feb 13;223(3):527-535. doi: 10.1093/infdis/jiaa374. PMID: 32620011; PMCID: PMC7881333.

CARVALHO, F. S. et al. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. *Genet Mol Res*, v. 14, n. 4, p. 12062-12073, 2015.

CELESTINO, D.; NASCIMENTO, MAURICIO; MAGALHAES, A. ; GOMES, M. T. ; CAMPOS, P. ; OLIVEIRA, L. ; ZAMBONI, DARIO S. ; MACHADO, P. R. ; CARVALHO, E. M. ; OLIVEIRA, SERGIO C. ; CARVALHO, L. P. . Determination of IL-1b production pathways in patients with cutaneous leishmaniasis. 2017.

CHAVES, A. T. Avaliação do papel da apoptose nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. (2009).

CHENG, K. Y., CHANG, C. D., SALBILLA, V. A., KIRCHHOFF, L. V., LEIBY, D. A., SCHOCHETMAN, G., & Shah, D. O. (2007). Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(4), 355–361. <https://doi.org/10.1128/CVI.00401-06>

CHIARAMONTE, M. G., FRANK, F. M., FUREr, G. M., TARANTO, N. J., MARGNI, R. A., & Malchiodi, E. L. (1999). Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. In *Acta Tropica* (Vol. 72).

CHIARAMONTE, M. G., ZWIRNER, N. W., CAROPRESI, S. L., TARANTO, N. J., & MALCHIODI, E. L. (1996). *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Human mixed infection. In *Am. J. Trop. Med. Hyg* (Vol. 54, Issue 3).

CHILLER, T. M., SAMUDIO, M. A., & ZOULEK, G. (1990). Igg antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. In *Am. J. Trop. Med. Hyg* (Vol. 43, Issue 6).

COSTA, A. C. V. Avaliação da produção de interleucina 6, fator de necrose tumoral e interleucina 10 em hemoculturas de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada, 2017.

COSTA, Rúbia Suely Santana. Contribuição das diferentes subpopulações de monócitos para a resposta inflamatória na leishmaniose cutânea / Rúbia Suely Santana Costa. – Salvador, 2012. 104 f.

CROSBY EJ, Goldschmidt MH, Wherry EJ, Scott P. Engagement of NKG2D on bystander memory CD8 T cells promotes increased immunopathology following *Leishmania* major infection. *PLoS Pathog*. 2014 Feb 27;10(2):e1003970. doi: 10.1371/journal.ppat.1003970. PMID: 24586170; PMCID: PMC3937277.

DALTRO, R.T., LEONY, L.M., FREITAS, N.E.M., SILVA, A.A.O., SANTOS, E.F., DEL-REI, R.P., BRITO, M.E.F., BRANDÃO-FILHO, S.P., GOMES, Y.M., SILVA, M.S., DONATO, S.T., JERONIMO, S.M.B., MONTEIRO, G.R.G., CARVALHO, L.P., MAGALHÃES, A.S., ZANCHIN, N.I.T., CELEDON, P.A.F., & SANTOS, F.L.N. (2019). *Cross-Reactivity Using Chimeric Trypanosoma cruzi Antigens: Diagnostic Performance in Settings Where Chagas Disease and American Cutaneous or Visceral Leishmaniasis Are Coendemic*. <https://journals.asm.org/journal/jcm>

DANTAS, M. L., OLIVEIRA, J. M. G. C., CARVALHO, L., PASSOS, S. T., QUEIROZ, A., GUIMARÃES, L. H., MACHADO, P., CARVALHO, E., & ARRUDA, S. (2014). Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2), 202–209. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130312>

DETILIO, B.A.N.S. (2012). Caracterização das células T Natural Killer de células mononucleares de sangue periférico em indivíduos de diferentes continentes DOI 10.11606/D.5.2012.tde-25052012-175839.

DE VRIES HJC, SCHALLIG HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol*. 2022 Nov;23(6):823-840. doi: 10.1007/s40257-022-00726-8. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36103050; PMCID: PMC9472198.

DIAS, J. C. P., COURA, JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p. ISBN 85-8567631-0. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

DIAS, C. P. J., NOVAES R., A., DIAS G., E., LUQUETTI, A., APARECIDA S-Y. M., RODRIGUES C. J., MORAIS T. R., MELO, R.C.J., ALMEIDA, A. E., OLIVEIRA JR, W., SILVEIRA, C. A., REZENDE, M. J., PINTO, S. F., FERREIRA, W. A., RASSI, A., FRAGATA FILHO, A. A., SOUSA, S. A., CORREIA FILHO, D., JANSEN, M. A., ALVES, V. R. (2016). II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25(21), 1–10. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>

DIOSQUE, P., PADILLA, A. M., CIMINO, O., CARDOZO, M., SANCHEZ NEGRETTE, O., MARCO, J. D., ZACCA, R., MEZA, C., JUAREZ, A., ROJO, H., REY, R., CORRALES, R. M., RUBÉN NASSER, J., & BASOMBRÍO, M. A. Chagas disease in rural areas of chaco province, Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. (2004).

DUTHIE, M. S., GUDERIAN, J. A., VALLUR, A. C., MISQUITH, A., LIANG, H., MOHAMATH, R., LUQUETTI, A. O., CARTER, D., TAVARES, S. N. B., & REED, S. G. (2016). Multi-epitope proteins for improved serological detection of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas Disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(3), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.006>

FARIA, Daniela R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and immunity*, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, 2005.

FRANCA M, GUIMARÃES LH, NASCIMENTO MT, ROCHA PN, CARVALHO LP. The *Leishmania* antigen-specific pro-inflammatory response in cutaneous leishmaniasis is linked to disease progression but not to the therapeutic failure of pentavalent antimonials. *Microbes Infect.* 2021 Nov-Dec;23(9-10):104866. doi: 10.1016/j.micinf.2021.104866. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34298178; PMCID: PMC8687710.

FRANK, F. M., FERNÁNDEZ, M. M., TARANTO, N. J., CAJAL, S. P., MARGNI, R. A., CASTRO, E., THOMAZ-SOCCOL, V., & MALCHIODI, E. L. (2003). Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: Immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involveds. *Parasitology*, 126(1), 31–39. <https://doi.org/10.1017/S0031182002002585>

GIL, José et al. Reactividad del antígeno GST-SAPA de *Trypanosoma cruzi* frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y leishmaniasis. *MEDICINA (Buenos Aires)*, v. 71, n. 2, p. 113-119, 2011.

HOYOS, C. L., CAJAL, S. P., JUAREZ, M., MARCO, J. D., Alberti D'Amato, A. M., Cayo, M., Torrejón, I., Cimino, R. O., Diosque, P., Krolewiecki, A. J., Nasser, J. R., & Gil, J. F. (2016). Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis and *Trypanosoma cruzi* Infection in the Northwestern Argentina. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6456031>

JIRMANUS, Lara et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* transmission over a 20-year period. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 86, n. 3, p. 426, 2012.

LEMESRE, J. L., AFCHAIN, D., LOYENS, M., BRENIERE, F. S., DESJEUX, P., CARLIER, Y., MARTIN, U., NOGUEIRA-QUEIROZ, J. A., RAYJI, D. le, & CAPRON, A. (1986). Specific and sensitive immunological diagnosis of chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. In *Am. J. Trop. Med. Hyg* (Vol. 35, Issue 1).

LIMA, F. R., TAKENAMI, I., CAVALCANTI, M. A. L., RILEY, L. W., & ARRUDA, S. (2017). Elisa-based assay of immunoglobulin G antibodies against mammalian cell entry 1A (Mce1A) protein: A novel diagnostic approach for leprosy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(12), 844–849. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160549>

LÓPEZ, L., ARAI, K., GIMÉNEZ, E., JIMÉNEZ, M., PASCUZO, C., RODRÍGUEZ-BONFANTE, C., & BONFANTE-CABARCAS, R. (2006). C-Reactive Protein and Interleukin-6 Serum Levels Increase as Chagas Disease Progresses Towards Cardiac Failure. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 59(1), 50–56. [https://doi.org/10.1016/s1885-5857\(06\)60048-0](https://doi.org/10.1016/s1885-5857(06)60048-0)

MACHADO, P. R. L., LESSA, H., LESSA, M., GUIMARÃES L. H., BANG, H., HO, J. L., CARVALHO, E. M., Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 44, Issue 6, 15 March 2007, Pages 788–793, <https://doi.org/10.1086/511643>

MARTÍNEZ, D. Y., VERDONCK, K., KAYE, P. M., ADAUI, V., POLMAN, K., LLANOS-CUENTAS, A., DUJARDIN, J. C., & BOELAERT, M. (2018). Tegumentary leishmaniasis and coinfections other than HIV. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 12, Issue 3). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006125>

MENDES, D. G., LAURIA-PIRES, L., NITZ, N., LOZZI, S. P., NASCIMENTO, R. J., MONTEIRO, P. S., REBELO, M. M., ROSA, A. D. C., SANTANA, J. M., & TEIXEIRA, A. R. L. (2007). Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. *Tropical Medicine and International Health*, 12(5), 629–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01831.x>

MENDONÇA, L. S. O., SANTOS, J. M., KANETO, C. M., CARVALHO, L. D., LIMA-SANTOS, J., AUGUSTO, D. G., CARVALHO, S. M. S., SOARES-MARTINS, J. A. P., & SILVA-JARDIM, I. (2020). Characterization of serum cytokines and circulating microRNAs that are predicted to regulate inflammasome genes in cutaneous leishmaniasis patients. *Experimental Parasitology*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107846>

MORAIS, C. G. V., LIMA, A. K.C., TERRA, R., SANTOS, R. F., SILVA, S. A. G., & DUTRA, P. M. L. (2015). The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/324915>

NEVES, David Pereira. Parasitologia humana. In: Parasitologia humana. 2016. 13<sup>a</sup> ed.

NOVAIS, F. O., CARVALHO, A. M., CLARK, M. L., CARVALHO, L. P., BEITING, D. P., BRODSKY, I. E., CARVALHO, E. M., & SCOTT, P. (2017). CD8<sup>+</sup>T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production. *PLoS Pathogens*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006196>

NOVAIS, F. O and others, Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of *Leishmania braziliensis* by Reactive Oxygen Species, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 209, Issue 8, 15 April 2014, Pages 1288–1296, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu013>

NUNES, D. F., GUEDES, P. M. M. ANDRADE, C. M., CÂMARA, A. C. J., CHIARI, W., GALVÃO, L. M. C. Troponin T autoantibodies correlate with chronic cardiomyopathy in human Chagas disease. 2013. DOI: 10.1111/tmi.12169

OLIVEIRA, B. C. Avaliação de Isotipos de Imunoglobulinas por Citometria de Fluxo para Diagnóstico e Critério de Cura na Leishmaniose Tegumentar Americana. 2016. URI: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/17662>

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. (2016). American tegumentary leishmaniasis: T-cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms—co-infection with *Trypanosoma cruzi*. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(4), 353–369. <https://doi.org/10.1007/s00430-016-0455-0>

PAVANELLI, W. R., Gutierrez, F. R. S., Silva, J. J. N. da ., Costa, I. C., Menezes, M. C. N. D. de ., Oliveira, F. J. de A., Itano, E. N., & Watanabe, M. A. E.. (2010). The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(6), 606–612. <https://doi.org/10.1590/S1413-8670201000060001>

PEREIRA, L., OLIVEIRA, F., TOWNSEND, S., METANGMO, S., MENESES, C., MOORE, I. N., BRODSKYN, C. I., VALENZUELA, J. G., MAGEZ, S., & KAMHAWI, S. (2018). Coinfection With *Trypanosoma brucei* Confers Protection Against Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02855>

PESSOA, C. C., FERREIRA, E. R., BAYER-SANTOS, E., RABINOVITCH, M., MORTARA, R. A., & REAL, F. (2016). *Trypanosoma cruzi* differentiates and multiplies within chimeric parasitophorous vacuoles in macrophages coinfecting with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, 84(5), 1603–1614. <https://doi.org/10.1128/IAI.01470-15>

PISSETTI CW, CORREIA D, BRAGA T, FARIA GE, OLIVEIRA RF, RIBEIRO BM, RODRIGUES DB, RODRIGUES V. Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica [Association between the plasma levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Jul-Aug;42(4):425-30. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822009000400013. PMID: 19802480.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation*, v. 91, n. 4, p. 1390-1395, 1993.

PONCE, N. E., CARRERA-SILVA, E. A., PELLEGRINI, A. V., CAZORLA, S. I., MALCHIODI, E. L., LIMA, A. P., GEA, S., & AOKI, M. P. (2013). Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(3), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.003>

PORTELLA, T.P., KRAENKEL, R.A. Spatial–temporal pattern of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Dis Poverty* 10, 86 (2021).  
<https://doi.org/10.1186/s40249-021-00872-x>

PUNG, O. J., HULSEBOS, L. H., & KUHN, R. E. (1988). Experimental american leishmaniasis and Chagas' disease in the brazilian squirrel monkey: cross immunity and electrocardiographic studies of monkeys infected with *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi* (Vol. 18, Issue 8).

RASSI A Jr, RASSI A, MARIN-NETO J.A. Chagas disease. *Lancet*. 2010 Apr 17;375(9723):1388-402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X. PMID: 20399979.

REIS, L.C., BRITO, M.E.F., SOUZA, M.A., PEREIRA, V.R.A. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista De Patologia Tropical* Vol. 35 (2): 103-115. maio-ago. 2006.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, p. 143-148, 1998.

RODRÍGUEZ-MORALES, O., CABRERA-MATA, J. J., CARRILLO-SÁNCHEZ, S. D. C., GUTIÉRREZ-OCEJO, R. A., BAYLÓN-PACHECO, L., PÉREZ-REYES, O. L., ROSALES-ENCINA, J. L., ARANDA-FRAUSTRO, A., HERNÁNDEZ-GARCÍA, S., & ARCE-FONSECA, M. (2020). Electrolyzed oxidizing water modulates the immune response in balb/c mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Pathogens*, 9(11), 1–20.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens9110974>

ROMERO, C., MARINHO, F., & PAULO, S. (1998). *Correlação entre a carga parasitária na fase aguda e a intensidade da patologia, parasitismo e ativação do sistema imune na fase crônica da doença de chagas experimental*.

SANMARCO, L. M., VISCONTI, L. M., EBERHARDT, N., RAMELLO, M. C., PONCE, N. E., SPITALE, N. B., VOZZA, M. L., BERNARDI, G. A., GEA, S., MINGUEZ, A. R., & AOKI, M. P. (2016). IL-6 improves the nitric oxide-induced cytotoxic CD8+ T cell dysfunction in human chagas disease. *Frontiers in Immunology*, 7(DEC).<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00626>



SANTOS, F. L. N., CAMPOS, A. C. P., AMORIM, L. D. A. F., SILVA, E. D., ZANCHIN, N. I. T., CELEDON, P. A. F., DEL-REI, R. P., KRIEGER, M. A., & GOMES, Y. M. (2018). Highly accurate chimeric proteins for the serological diagnosis of chronic chagas disease: A latent class analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(5), 1174–1179. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0727>

SANTOS, F. L. N., CELEDON, P. A. F., ZANCHIN, N. I. T., SOUZA, W. V. , SILVA, E. D., FOTI, L., KRIEGER, M. A., & GOMES, Y. de M. (2017). Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease – a Phase II study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005433>

SCHRIEFER, Albert et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 15, n. 6, p. 871, 2009.

SEVERINO, Patrícia et al. Cutaneous/Mucocutaneous Leishmaniasis Treatment for Wound Healing: Classical versus New Treatment Approaches. *Microbiology Research*, v. 13, n. 4, p. 836-852, 2022.

SHEN, Shi-Shi et al. Infection against infection: parasite antagonism against parasites, viruses and bacteria. *Infectious diseases of poverty*, v. 8, p. 1-12, 2019.

SILVA, M.A.C.L. (2020). Caracterização de linfócitos TH17 em pacientes com leishmaniose tegumentar americana <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/43876>

SONI, B , SAHA, B., SINGH\*, S. (2018) Systems cues governing IL6 signaling in leishmaniasis. National Centre for Cell Science, NCCS Complex, Ganeshkhind, SPPU Pune University Campus, Pune 411007, India <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.001>

SOUZA, M. A., SILVA, A. G., CARDOSO, S. R. A., FAVORETO JUNIOR, S. FERREIRA, M. S. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(2):137-141, mar-abr, 2005.

SUPALI, Taniawati et al. Polyparasitism and its impact on the immune system. *International journal for parasitology*, v. 40, n. 10, p. 1171-1176, 2010.

TEIXEIRA-CARVALHO, A., CAMPOS, F. M. F., GEIGER, S. M., ROCHA, R. D. R., ARAÚJO, F. F., VITELLI-AVELAR, D. M., ANDRADE, M. C., ARAÚJO, M. S. S., LEMOS, E. M., PROIETTI, A. B. D. F. C., SABINO, E. C., CALDAS, R. G., FREITAS, C. R. C., CAMPI-AZEVEDO, A. C., ELÓI-SANTOS, S. M., & MARTINS-FILHO, O. A. (2015). FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: A multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122938>

TRUYENS, C., ANGELO-BARRIOS, A., TORRICO, T JO VAN DAMME, F., HEREMANS, H., & CARLIERL, Y. (1994). Interleukin-6 (IL-6) Production in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of Its Paradoxical Increase by Anti-IL-6 Monoclonal

Antibody Treatment on Infection and Acute-Phase and Humoral Immune Responses. In *INFECrION AND IMMUNITY* (Vol. 62, Issue 2). <https://journals.asm.org/journal/iai>

TURETZ, Meredith L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases*, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, 2002.

TY, M. C., Loke, P., ALBEROLA, J., RODRIGUEZ-CORTES, A., & RODRIGUEZ-CORTES, A. (2019). Immuno-metabolic profile of human macrophages after *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS ONE*, 14(12)<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225588>

VASCONCELOS, J. M., GOMES, C. G., SOUSA, A., TEIXEIRA, A. B., & LIMA, J. M. (2018). American in tegumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 50(3). <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201800722>

VEGA BENEDETTI, A. F., CIMINO, R. O., CAJAL, P. S., JUAREZ, M. D. V., VILLALPANDO, C. A., GIL, J. F., MARCIPAR, I. S., KROLEWIECKI, A. J., & NASSER, J. R. (2013). Performance of different *Trypanosoma cruzi* antigens in the diagnosis of Chagas disease in patients with American cutaneous leishmaniasis from a co-endemic region in Argentina. *Tropical Medicine and International Health*, 18(9), 1103–1109. <https://doi.org/10.1111/tmi.12144>

VERÇOSA, A.F.A.. (2006). *Caracterização do Perfil Isotípico das Imunoglobulinas G de Indivíduos Chagásicos Frente aos Antígenos Recombinantes CRA e FRA de Trypanosoma cruzi.*

VITELLI-AVELAR, D. M., SATHLER-AVELAR, R., MASSARA, R. L., BORGES, J. D., LAGE, P. S., LANA, M., TEIXEIRA-CARVALHO, A., DIAS, J. C. P., ELÓI-SANTOS, S. M., & MARTINS-FILHO, O. A. (2006). Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clinical and Experimental Immunology*, 145(1), 81–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03123.x>

YEYATI, P. L., BONNEFOY, S., MIRKIN, G., DEBRABANT, A., LAFONI, S., PANEBRA, A., GONZALEZ-CAPPA, E., DEDET, J. P., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M., & LEVINI, M. J. (1991). The 70-kDa heat-shock human *Trypanosoma* protein is a major cruzi/*Leishmania* mixed infection antigenic determinant in *braziliensis braziliensis*. In *Immunology Letters* (Vol. 31).