

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

JOÃO PAULO FERREIRA RODRIGUES

Desenvolvimento das alterações cardíacas, hepáticas e pulmonares em camundongos coinfetados com *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*

Alfenas/MG

2016

JOÃO PAULO FERREIRA RODRIGUES

Desenvolvimento das alterações cardíacas, hepáticas e pulmonares em camundongos coinfectados com *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes

Coorientador (a): Profa. Dr. Raquel Lopes Martins Souza

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Rodrigues, João Paulo Ferreira

Desenvolvimento das alterações cardíacas, hepáticas e pulmonares em camundongos coinfectedados com *Schistosoma mansoni* e *trypanosoma cruzi* / João Paulo Ferreira Rodrigues. -- Alfenas/MG, 2016.

76 f

Orientador: Rômulo Dias Novaes.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Patogênese Hemeopática. 4. Citocinas. 5. Coinfecção. 6. Sistema Imunológico.
I. Novaes, Rômulo Dias. II. Título.

CDD-616.96

JOÃO PAULO FERREIRA RODRIGUES

Desenvolvimento das alterações cardíacas, hepáticas e pulmonares em camundongos coinfectados com *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo programa de Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas - MG. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Aprovada em: 19/02/2016

Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Rafael Neodini Remédio

Instituição: Universidade Federal de Lavras - UFLA-MG

Assinatura:



RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença endêmica de países em desenvolvimento, com mais de 200 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. No Brasil, 25 milhões de pessoas vivem em área de risco, onde 10 – 20% dos indivíduos estão infectados. A doença de Chagas é uma doença infecciosa causada por protozoário intracelular obrigatório denominado *Trypanosoma cruzi*, com prevalência de cerca de 7 a 8 milhões pessoas infectadas em todo o mundo. A doença atinge predominantemente países da América do Sul e Central e atualmente representa uma doença tropical negligenciada. Considerando que existem áreas endêmicas comuns para ambas às doenças, o presente estudo investigou a instalação e progressão das lesões no fígado, coração e pulmão de animais coinfectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni* e *T. cruzi*. Como o perfil imunológico que se desenvolve ao longo de cada doença é antagônico, o presente estudo admite a hipótese de que interações imunológicas negativas podem modificar a evolução natural das infecções e alterar os padrões de lesão no fígado, coração e pulmão, importantes órgãos alvos da esquistossomose e doença de Chagas. Nossos resultados demonstraram que a infecção prévia pelo *S. mansoni* modificou o curso natural da doença de Chagas, aumentando o número de parasitas sanguíneos, que ao contrario dos animais infectados somente com *T. cruzi*, mantiveram a parasitemia patente durante todo o experimento. Entretanto, a coinfeção mostrou-se benéfica ao reduzir a severidade da cardiomiopatia chagásica e a lesão pulmonar em áreas remotas ao granuloma esquistossomótico. No fígado, houve aumento da susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, evidenciado por maior parasitismo, lesões hepáticas acentuadas e aumento de granulomas esquistossomóticos não organizados.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. *Trypanosoma cruzi*. Patogênese. Citocinas. Coinfeção. Perfil imunológico.

ABSTRACT

Schistosomiasis *mansoni* is endemic in developing countries, with over 200 million people infected worldwide. In Brazil, 25 million people live in risk areas, where 10 - 20% of individuals are infected. Chagas' disease is an infectious disease caused by obligate intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* called, with a prevalence of about 7 million to 8 million people infected worldwide. The disease predominantly affects countries of South and Central America and currently is a neglected tropical disease. Whereas there are common areas endemic for both diseases, the present study investigated the onset and progression of liver damage, heart and lung coinfecting animals experimentally with *Schistosoma mansoni* and *T. cruzi*. As the immune profile that extends along each disease is antagonistic, this study supports the hypothesis that adverse immunological interactions may alter the natural course of infections and change lesion patterns in the liver, heart and lung, major target organs of schistosomiasis and Chagas disease. Our results showed that prior infection with *S. mansoni* modified the natural history of Chagas disease, increasing the number of blood parasites, which unlike the animals infected only with *T. cruzi*, maintained the patent parasitaemia throughout the experiment. However, coinfection was beneficial to reduce the severity of Chagas cardiomyopathy and lung damage in remote areas to schistosomiasis granuloma. In the liver, an increase in susceptibility to infection with *T. cruzi*, evidenced by higher parasitism, pronounced liver damage and increased granulomas schistosomiasis unorganized.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. *Trypanosoma cruzi*. Pathogenesis. Cytokines. Coinfection. immunological profile.

SUMÁRIO

1	ESQUISTOSSOMOSE	8
1.1	CICLO BIOLÓGICO DO <i>S. MANSONI</i>	9
1.1.1	Resposta imune na esquistossomose.....	11
2	DOENÇA DE CHAGAS	13
2.1	CICLO BIOLÓGICO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	15
2.1.1	Resposta imune na doença de Chagas	16
3	ESTUDOS SOBRE COINFEÇÃO	18
4	JUSTIFICATIVA	20
5	OBJETIVOS	22
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6	MATERIAIS E MÉTODOS	23
6.1	CEPA DO <i>T. CRUZI</i>	23
6.2	CEPA DE <i>S. MANSONI</i>	23
6.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	23
6.4	PARASITEMIA	24
6.5	NECROPSIA E COLETA DE MATERIAL	24
6.6	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CITOCINAS POR ELISA.....	24
6.7	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	25
6.8	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	26
6.9	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS	26
6.10	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA.....	27
6.11	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	27
6.12	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	28
6.13	ANÁLISE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO TECIDUAL	29
6.14	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DOS GRANULOMAS.....	29
6.15	ANÁLISE DO PARASITISMO TECIDUAL.....	30
7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
8	RESULTADOS	33
8.1	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CITOCINAS POR ELISA.....	34
8.2	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
8.3	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	36
8.4	ANÁLISE DE ANTICORPOS.....	37

8.5	PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS	38
8.6	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO MIOCÁRDIO	39
8.6.1	Parâmetros estereológicos do miocárdio	41
8.7	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO	44
8.7.1	Parâmetros estereológicos do tecido hepático	47
8.7.2	Análise dos granulomas esquistossomóticos	49
8.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR	50
8.8.1	Parâmetros estereológicos do tecido pulmonar	52
8.9	ANÁLISE DO PARASITISMO TECIDUAL POR PCR	54
9	DISCUSSÃO	56
	REFERÊNCIAS.....	65

1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose mansônica é uma doença endêmica típica de países em desenvolvimento. Estimativas globais indicaram que mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de 200 mil apresentam risco de óbito pela doença a cada ano (ALLAM, 2012; COLLEY et al., 2014; RICHTER et al., 2015). No Brasil, 25 milhões de pessoas vivem em área de risco, onde 2,5 a 6 milhões de indivíduos estão infectados (DE MELO et al., 2014). Essa endemia está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento socioeconômico, que gera a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer (KATZ; PEIXOTO, 2000). A esquistossomose associada à desnutrição é um grave problema para a saúde pública, vitimando jovens e adultos, principalmente na faixa etária produtiva (COUTINHO et al., 2010). No Brasil, a esquistossomose é causada pelo agente etiológico *Schistosoma mansoni*, um helminto trematódeo cujos hospedeiros intermediários são espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* (GUIMARÃES et al., 2012).

A infecção pelo *S. mansoni* pode se desenvolver como uma forma aguda ou como uma doença crônica, se não for interrompida por quimioterapia específica. Na fase aguda, o indivíduo infectado apresenta sintomas inespecíficos como febre, tosse, diarreia, anorexia e artralgias (CALDAS et al., 2008; COLLEY et al., 2014). Sua intensidade varia desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, persistindo até cinco dias após a penetração das formas infectantes no hospedeiro vertebrado (PORDEUS et al., 2008). Quanto à patologia, a forma aguda pode ser caracterizada pela presença de numerosos granulomas periovulares necrótico-exsudativos, especialmente no fígado (ANDRADE, 2008; LAMBERTUCCI, 2010). Além do dano hepático, as lesões hepatoesplênicas são causadas principalmente pela hipersensibilidade do hospedeiro aos antígenos solúveis secretados pelos ovos. Essa hipersensibilidade diminui progressivamente na fase crônica da doença, resultando na redução do tamanho dos granulomas em decorrência da modulação da resposta imune que resulta na eventual redução da sintomatologia (DE MELO; COELHO, 2005).

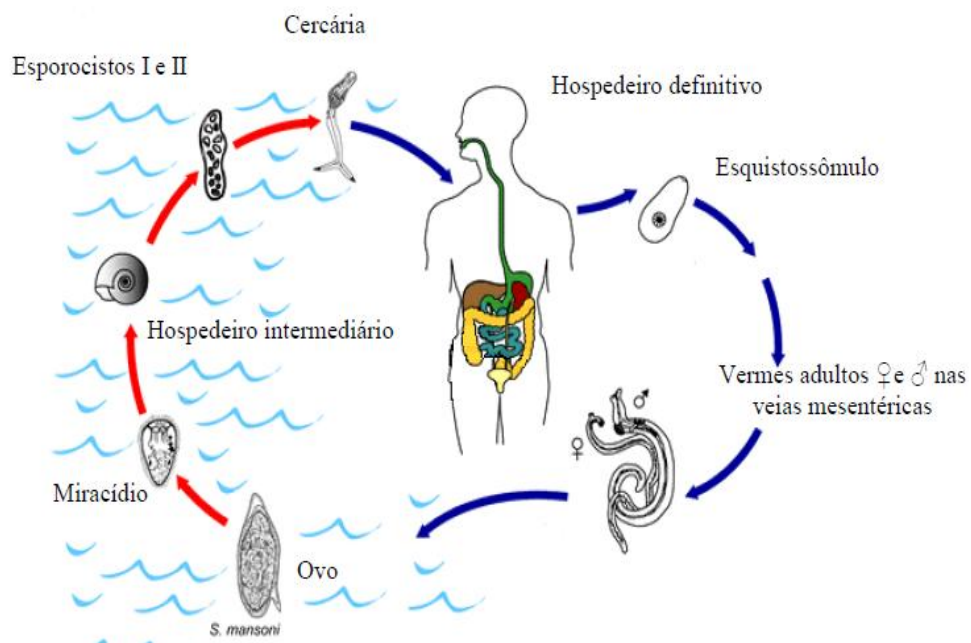
Aproximadamente 90% dos indivíduos na fase crônica desenvolvem formas leves da doença, sendo os pacientes muitas vezes assintomáticos. Formas graves ou avançadas desenvolvem-se em cerca de 4% a 10% dos casos, aspecto geralmente relacionado à área geográfica endêmica, que aparentemente apresenta influência direta, mas que ainda é pouco compreendida, sobre os níveis de incidência e prevalência de formas mais ou menos graves da doença (ANDRADE, 2008).

1.1 CICLO BIOLÓGICO DO *S. MANSONI*

O *S. mansoni* apresenta um complexo ciclo biológico do tipo heteroxeno, tendo como hospedeiro intermediário caramujos do gênero *Biomphalaria* (nos quais se reproduzem de forma assexuada) e como hospedeiro definitivo o homem (no qual se reproduz de forma sexuada). Há, ainda, duas passagens de larvas de vida livre no meio aquático, que se alternam com as fases parasitárias (CLERINX; VAN GOMPEL, 2011). As formas evolutivas do *S. mansoni* consistem nos vermes adultos (machos e fêmeas), ovos, miracídios, esporocistos, cercárias e esquistossômulos (KATZ; ALMEIDA, 2003). Cada fêmea põe cerca de quatrocentos ovos por dia na parede de capilares e vênulas do hospedeiro vertebrado, e cerca de 50% desses ovos ganham o meio externo do corpo através das fezes (DE MELO; COELHO, 2005). O mecanismo exato pelo qual os ovos atravessam o endotélio vascular permanece pouco conhecido, mas é evidente que depende da resposta imune do hospedeiro, visto que em animais imunossuprimidos ocorre acúmulo de ovos na parede intestinal (DE MELO; COELHO, 2005; PEARCE, 2005). Os ovos, em água doce, eclodem liberando o miracídio, forma infectante para o hospedeiro intermediário. Os miracídios nadam em círculos durante algumas horas até encontrar certos moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, nos quais penetram através do tegumento e se alojam em diversos tecidos do molusco. Os miracídios transformam-se em esporocistos que, por poliembrionia, geram esporocistos filhos e depois cercárias, a forma infectante para o homem (REY, 2008; COLLEY et al., 2014). As cercárias se disseminam na água e são capazes de penetrar através da pele humana, atingindo os vasos sanguíneos cutâneos superficiais. No processo de

invasão, com duração de até 15 minutos, a cercária perde a cauda e migra através da pele do hospedeiro definitivo (KATZ; ALMEIDA, 2003). No homem, as cercárias se transformam em esquistossômulos que adaptam-se às condições fisiológicas do meio interno, migram pelo tecido subcutâneo e, ao penetrarem num vaso, são levados pelo sistema vascular sanguíneo, passam pelo lado direito do coração, e assim chegam aos pulmões (DE MELO; COELHO, 2005). Dos pulmões, os esquistossômulos dirigem-se para o sistema porta hepático via circulação sanguínea ou transtissular. No sistema porta-hepático, os esquistossômulos se alimentam e se desenvolvem transformando-se em machos e fêmeas em 25 a 28 dias após a penetração. Após a maturação sexual, os vermes migram para a veia mesentérica inferior e distribuem-se nos seus ramos vasculares, onde farão a oviposição. Completa-se assim o ciclo biológico do *S. mansoni* (DE MELO; COELHO, 2005) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: (RAMOS, 2007).

Notas: As setas em vermelho representam as formas evolutivas do *S. mansoni* no hospedeiro intermediário bem como as formas de vida livre. As setas em azul representam as formas evolutivas no hospedeiro definitivo.

1.1.1 Resposta imune na esquistossomose

Os diferentes quadros clínicos observados na esquistossomose são influenciados pelas características da resposta imune. Estudos epidemiológicos combinados com experimentos em animais têm mostrado que a genética do hospedeiro, a intensidade da infecção, a sensibilização prévia por antígenos do *S. mansoni* e casos de coinfeção influenciam fortemente a natureza da resposta imune do hospedeiro e o curso da doença (ELOI-SANTOS et al., 1989; KING et al., 1998; PEARCE; MACDONALD, 2002).

No curso evolutivo da esquistossomose é possível dividir a resposta imune em duas fases polarizadas, sendo a primeira caracterizada por um perfil Th1 e a segunda caracterizada por um perfil Th2, e uma terceira fase de imunomodulação, relacionada com o aumento do número e atividade das células T regulatórias (Treg) na fase crônica da doença. Durante a fase de migração dos vermes nos tecidos do hospedeiro definitivo (3 a 5 semanas), observa-se uma intensa expressão de citocinas pró-inflamatórias de padrão Th1 como interleucinas 1 (IL-1) e 12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) (CHUAH et al., 2014). Com a maturação dos parasitos, acasalamento e início da postura dos ovos (entre 5 e 6 semanas), ocorre atenuação da resposta Th1 e o aumento de uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, bem como a produção de imunoglobulina E (IgE). Esta resposta é fortemente induzida pelos antígenos dos ovos (PEARCE; MACDONALD, 2002; WILSON et al., 2007; CHUAH et al., 2014). Em estudos realizados com camundongos C57BL/6 deficientes em IL4^{-/-}, a incapacidade de desenvolver uma resposta Th2 foi relacionada com uma doença aguda letal, indicando a importância da resposta Th2 na regulação da resposta inflamatória inicial e controle parasitário (PEARCE; MACDONALD, 2002).

O maior dano tecidual observado na esquistossomose está relacionado com a resposta inflamatória granulomatosa, que ocorre em torno dos ovos vivos liberados pela fêmea de *S. mansoni* (VAILLANT et al., 2001; WILSON et al., 2007). Os ovos são liberados no lúmen intestinal, porém, muitos ficam retidos em órgãos como fígado, baço, intestino, pulmões e pâncreas. Os ovos excretam um antígeno solúvel

(*Soluble Egg Antigens-SEA*) que induz tanto a resposta imune humoral quanto a celular (HESSE et al., 2004; DE MELO; COELHO, 2005; FAIRFAX et al., 2012), sendo responsável pelo desencadeamento de um complexo fisiopatológico reacional que promoverá a formação do granuloma, fibrose hepática e hipertensão portal, podendo evoluir para o óbito (WILSON et al., 2007; LINS et al., 2008). O granuloma esquistossomótico é uma coleção compacta e organizada de células inflamatórias, que junto com células residentes do órgão afetado, secretam e dispõem-se em meio a componentes de uma matriz extracelular heterogênea, formando uma estrutura esférica, que circunda cada ovo individualmente (LENZI et al., 2008). Inicialmente acumulam-se em torno dos ovos numerosos macrófagos, seguidos de eosinófilos, linfócitos e alguns plasmócitos, onde se observa intenso processo inflamatório e regiões de necrose tecidual (REY, 2008; BURKE et al., 2009). Os granulomas que se desenvolvem nos espaços porta do fígado, levam ao desenvolvimento de um manguito fibroso em torno das ramificações intra-hepáticas da veia porta, quadro conhecido como fibrose periportal (REY, 2008). Segundo Vaillant et al., (2001) a fibrose periportal provoca obstrução dos ramos intra-hepáticos, tendo como consequência hipertensão portal, a manifestação mais grave da esquistossomose, podendo causar alterações como esplenomegalia, varizes esofagianas e ascite (barriga d'água). Apesar da resposta Th2 modular a resposta Th1 e reduzir o tamanho dos granulomas, a resposta Th2 polarizada está relacionada ao desenvolvimento de fibrose hepática na fase crônica da doença, sendo as citocinas IL-13, IL-15 e IL-17 as principais responsáveis pela indução da fibrogênese tecidual (PEARCE; MACDONALD, 2002; WILSON et al., 2007; FAIRFAX et al., 2012; CHUAH et al., 2014).

Vários estudos indicaram que ambas as respostas Th1 e Th2 devem ser moduladas para evitar danos ao hospedeiro, sendo a citocina IL-10 a principal responsável pelo efeito modulador das respostas inflamatórias (TODT et al., 2000; WILSON et al., 2007; BURKE et al., 2009; FAIRFAX et al., 2012). Em estudos com camundongos duplamente deficientes em IL-10 e IL-4 observou-se uma exacerbada resposta Th1 em resposta à infecção pelo *S. mansoni*. Em camundongos duplamente deficientes em IL-10 e IL-12 e aqueles duplamente deficientes em IL-10 e IFN- γ , observou-se um quadro de doença severo com excessiva resposta Th2 e alta taxa de mortalidade associada ao aumento do granuloma e fibrose

(HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; VAILLANT et al., 2001). Esses ensaios indicaram que a IL-10 desempenha um importante papel no controle dos sintomas relacionados à excessiva resposta Th1 ou Th2 na defesa contra o patógeno. Paradoxalmente, embora a fibrose tecidual esteja associada aos efeitos prejudiciais que se estabelecem em função da formação dos granulomas (hipertensão portal), esse processo também representa uma resposta de defesa benéfica ao hospedeiro, que reduz a mortalidade do hospedeiro logo após a oviposição pelo *S. mansoni* (DE MELO; COELHO, 2005; WILSON et al., 2007).

2 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença infecciosa causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Trypanosoma cruzi*, um parasito digenético pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (JANSEN et al., 2000).

A principal forma de infecção se dá por transmissão vetorial, seguida por transfusão sanguínea, ingestão de alimentos contaminados com as formas infectantes do parasito e transmissão congênita (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A doença de Chagas atinge principalmente os países pertencentes à América do Sul e Central, sendo a terceira doença parasitária com maior prevalência no mundo, superada apenas pela malária e esquistossomose. Segundo a organização mundial de saúde, cerca de 7 a 8 milhões pessoas estão infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica (WHO, 2014).

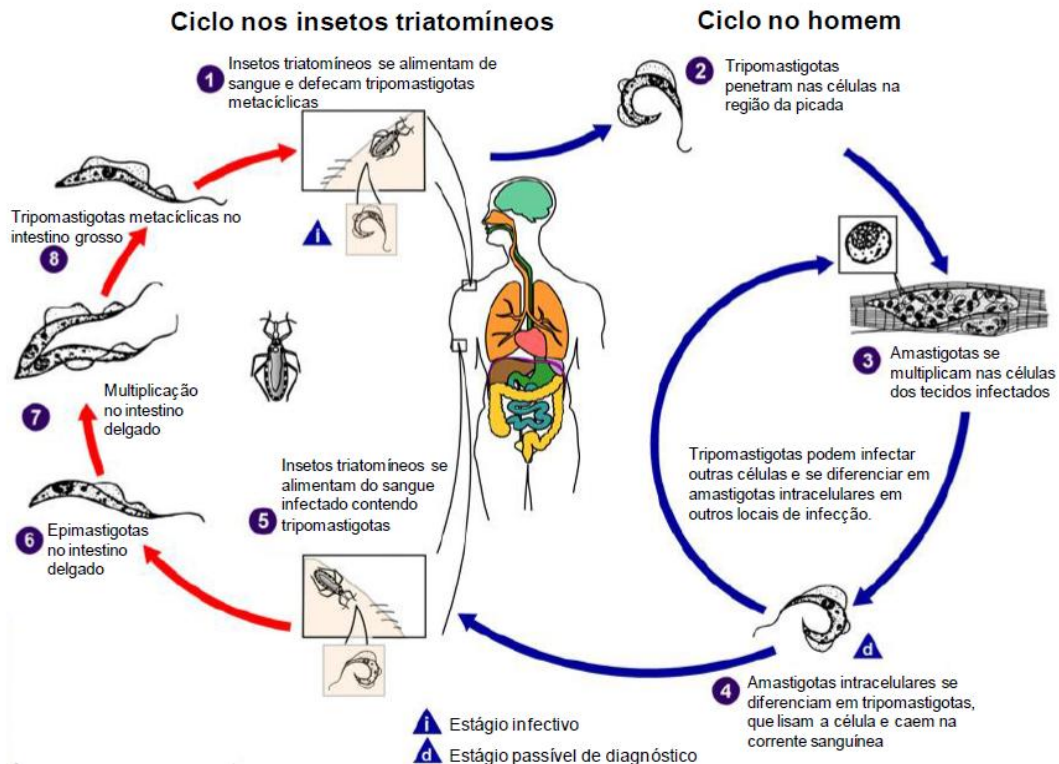
Devido às iniciativas adotadas no combate aos insetos vetores (triatomíneos), o número de casos novos por transmissão vetorial foi drasticamente reduzido em alguns países do cone sul nos últimos 20 anos, especialmente no Brasil (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006). Atualmente a transmissão oral é a principal forma de contaminação no Brasil (BRASIL, 2015). No estado do Pará em 2006, por exemplo, foram registrados 178 casos da doença relacionada ao consumo de Açaí (NÓBREGA et al., 2009; XAVIER et al., 2014). Vale ressaltar que este sucesso no controle vetorial é limitado, uma vez que em países vizinhos como Colômbia, Peru e Argentina, por exemplo, a incidência de transmissão natural pelo

vetor ainda é alta, sendo os animais domésticos importantes reservatórios do agente etiológico da doença de Chagas (LEVY et al., 2006; GÜRTLER et al., 2007; MEJÍA-JARAMILLO et al., 2014). Além disso, nos últimos anos tem sido observado um número crescente de casos de infecção fora das áreas endêmicas, evento relacionado ao fluxo migratório de pessoas infectadas para outras regiões e países. Estima-se que cerca de 300 mil pessoas estão infectadas nos Estados Unidos, 5.500 no Canadá, 1.500 na Austrália, 3.000 no Japão e 80.000 na Europa (SCHMUNIS; YADON, 2010). Apesar da maioria dos casos serem importados, infecções autóctones transmitidas por vetores também foram relatadas nos Estados Unidos. Este fato somado com limitações na triagem dos doadores de sangue e de órgãos em países não endêmicos aponta para uma possível modificação do perfil epidemiológico da doença de Chagas (LESCURE et al., 2010; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). Também foi registrada uma epidemia em cães no sul dos Estados Unidos, fato que alerta para o perigo que a doença representa mesmo em áreas não endêmicas (KJOS et al., 2008).

A doença de Chagas é caracterizada por apresentar um curso clínico variável, que inclui uma fase inicial aguda, que pode ser assintomática ou sintomática, com febre prolongada, náusea, vômitos, anorexia, diarreia, adenomegalia, conjuntivite unilateral (sinal de Romana), miocardite e meningoencefalite (COURA, 2003). Durante esta fase, elevado número de parasitos se encontram na corrente sanguínea e tecidos, assim como são detectados elevados níveis plasmáticos de citocinas e intensa ativação de linfócitos T e B. A fase inicial pode ser fatal em até 10% dos casos mais graves, com alta mortalidade em crianças abaixo de três anos de idade em consequência da meningoencefalite (COURA, 2003; DUTRA; GOLLOB, 2008; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). Após alguns meses, a parasitemia torna-se sub-patente e há o estabelecimento da fase denominada crônica que pode perdurar por toda vida do indivíduo infectado, fase conhecida como crônica indeterminada. Destes indivíduos, cerca de 30% desenvolvem alterações cardíacas e até 10% desenvolvem alterações digestivas, neurológicas ou formas mistas que exigem tratamento específico, quadros que representam a fase crônica sintomática (WHO, 2015).

2.1 CICLO BIOLÓGICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

O protozoário *T. cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida que depende de uma bem sucedida transmissão e colonização de ambientes extremamente diferentes (TYLER; ENGMAN, 2001). Possuem como hospedeiros vertebrados diversos mamíferos, e como hospedeiros invertebrados e vetor os triatomíneos hematófagos, pertencentes à família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*. Ao picar o indivíduo, o triatomíneo defeca próximo ao sítio da picada. Nas fezes e urina do inseto infectado encontram-se as formas tripomastigotas metacíclicas que penetram pelas lesões na pele causadas no momento em que o indivíduo começa a coçar a região. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células das camadas subjacentes à epiderme e, no citoplasma dessas células, diferenciam-se em amastigotas que se multiplicam por divisão binária (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, os quais, com a lise da célula hospedeira, são liberados na corrente sanguínea podendo infectar outras células do hospedeiro e assim propagar a infecção. Se o hospedeiro vertebrado for novamente picado por um inseto triatomíneo, este ingere as formas tripomastigotas sanguíneas, reiniciando, desta forma, o ciclo (KAYAMA; TAKEDA, 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo biológico do *T. cruzi*.

Fonte: (Center for Disease Control and Prevention, 2015).

Notas: As setas em vermelho representam as formas evolutivas do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado (insetos triatomíneos). As setas em azul representam as formas evolutivas no hospedeiro vertebrado (mamífero).

2.1.1 Resposta imune na doença de Chagas

O sistema imunológico está envolvido no controle da replicação e propagação do *T. cruzi*. O sistema imune inato desempenha um papel fundamental no reconhecimento da infecção por *T. cruzi* (KAYAMA; TAKEDA, 2010). A proteção inicial contra esse parasito se dá por meio de células efetoras como macrófagos, células NK e células dendríticas que liberam citocinas como IL-12, TNF- α e IFN- γ , estimulando a produção de óxido nítrico (NO) e o desenvolvimento da resposta imune adquirida Th1, mecanismos importantes no controle da parasitemia (SARDINHA et al., 2006; KAYAMA; TAKEDA, 2010; JUNQUEIRA et al., 2010). A produção de citocinas é desencadeada pela ativação de receptores de

reconhecimento de padrão (PRR), como os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* – TLR) e do tipo NOD (*nod-like receptors* – NOD). Receptores do tipo Nod reconhecem patógenos que lisam a membrana do vacúolo parasitóforo e entram no citoplasma das células hospedeiras (RAY et al., 2009; SILVA et al., 2010). Os receptores do tipo Toll, desempenham um importante papel no reconhecimento do *T. cruzi* tanto na fase extracelular, por meio dos receptores TLR-2/6 e TLR-4 que reconhece antígenos do parasito, como na fase intracelular mediante receptores TLR-7 e TLR-9 que reconhecem o RNA e o DNA do *T. cruzi*, respectivamente (CAMPOS et al., 2001; SHODA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; BAFICA et al., 2006; BARTHOLOMEU et al., 2008; JUNQUEIRA et al., 2010; CAETANO et al., 2011).

Apesar de *T. cruzi* também infectar células não fagocitárias, principalmente células musculares, onde permanece inacessível aos fatores líticos do soro, a imunidade humoral tem um papel fundamental no controle da infecção, sendo os anticorpos da classe IgG responsáveis por esta proteção (TAKEHARA et al., 1981; RODRIGUEZ et al., 1981). Além da neutralização do agente infeccioso, os anticorpos também podem ativar o sistema do complemento e participar da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (LÓPEZ; MORENO; SANDERSON, 1978; KIPNIS et al., 1981; KRETTLI, 2009). Em seguida, a imunidade mediada por linfócitos T-CD4⁺ helper (Th1) desempenha um importante papel na produção de IFN- γ , estimulação de macrófagos, linfócitos T-CD8⁺ e produção de anticorpos, tornando-se crucial no controle da parasitemia, parasitismo tecidual e sobrevivência do hospedeiro (TARLETON et al., 1996; KUMAR; TARLETON, 1998; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012).

Após invadir a célula hospedeira, em poucas horas o *T. cruzi* escapa do vacúolo parasitóforo indo para o citoplasma, onde se diferencia na forma amastigota e inicia sua replicação (ANDRADE; ANDREWS, 2004). No citoplasma, os antígenos do parasito são processados e apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Assim, a replicação do parasito no citoplasma da célula hospedeira representa um passo importante para a indução de uma forte resposta das células T-CD8⁺, que é uma característica marcante da infecção pelo *T. cruzi* (JUNQUEIRA et al., 2010).

Muitos estudos apontaram que os linfócitos T-CD4⁺ helper (Th2) responsáveis pela produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, essenciais para o amadurecimento da resposta imune humoral, estão relacionados com a suscetibilidade do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* (KUMAR; TARLETON, 2001; ACOSTA-RODRÍGUEZ et al., 2004; VOGT et al., 2008). De fato, na doença de Chagas o que se observa é que esses padrões clássicos de resposta imunológica se sobrepõem, e vários tipos de células e moléculas solúveis participam do controle da infecção e da patogênese da doença (DUTRA; GOLLOB, 2008; TEIXEIRA et al., 2011). Guedes et al. (2009), usando cão como modelo experimental, mostrou que animais que produziram IL-10 durante a fase aguda e crônica da doença apresentaram pouca alteração cardíaca quando comparados com animais que produziram grande quantidade de INF- γ e TNF- α . Outros pesquisadores também mostraram que linfócitos do sangue periférico e células mononucleares provenientes do tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC), produziram mais IFN- γ , TNF- α e IL-6 e menos IL-4 e IL-10, quando comparados com indivíduos assintomáticos (REIS et al., 1993; ABEL et al., 2001). Porém, outro estudo sugeriu haver correlação inversa entre a severidade da cardiomiopatia chagásica e os níveis de IFN- γ (LAUCELLA et al., 2004). Apesar da acentuada resposta imunológica observada no curso da infecção, o *T. cruzi* não é completamente eliminado. Além disso, a reação inflamatória induzida pelo *T. cruzi* é responsável pelo controle local do parasito e replicação, mas também provoca severos danos aos tecidos parasitados que frequentemente determinam intensa miocardite na fase aguda da doença, bem como a hipertrofia e fibrose cardíaca, manifestações tipicamente associadas ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica (JUNQUEIRA et al., 2010).

3 ESTUDOS SOBRE COINFECÇÃO

Mais de 1400 espécies de parasitos, incluindo vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos infectam o homem (GRIFFITHS et al., 2014). A coinfeção por múltiplas espécies de parasitos é comum na natureza. Por exemplo, só a coinfeção entre espécies de helmintos afeta cerca de 800 milhões de pessoas

(HOTEZ et al., 2007). Assim, quando consideramos espécies diferentes, este número pode aumentar consideravelmente (COX, 2001; SUPALI et al., 2010). Casos de coinfeção envolvem doenças de importância global como HIV e tuberculose (BORASCHI et al., 2008), podem reduzir a eficácia de vacinas e quimioterápicos (BIRARO et al., 2014; CHIODINI, 2001) e aumentar os custos com a saúde (RIZZARDINI et al., 2011). Hoje, estima-se que aproximadamente um terço dos quase três milhões de pessoas que vivem com menos de dois dólares por dia em regiões de baixo desenvolvimento socioeconômico da África subsaariana, Ásia e Américas estão infectados com um ou mais helmintos (SALAZAR-CASTAÑÓN; LEGORRETA-HERRERA; RODRIGUEZ-SOSA, 2014).

A esquistossomose é uma doença que afeta milhões de pessoas, principalmente em continentes onde outras doenças infecciosas são endêmicas. Portanto, o impacto da associação desta helmintíase com outras doenças é um assunto de grande relevância (CARVALHO; SANTOS; JESUS, 2008). Devido a sua cronicidade e robusta atividade imunomodulatória, os efeitos da esquistossomose em outras doenças como alergia, doenças autoimunes e doenças infecciosas, têm sido amplamente estudados em contextos epidemiológicos e experimentais (OSADA; KANAZAWA, 2011).

Pesquisas mostraram que a resposta proliferativa de linfócitos, disparada por antígenos de parasitos, é mais baixa em indivíduos infectados por helmintos (OTTESEN; WELLER; HECK, 1977; OTTESEN et al., 1978). Estes estudos levaram os pesquisadores a inferir que estes fenômenos fazem parte de mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, e de uma complexa rede imunoregulatória (MAIZELS et al., 1993, 2009). Estudos sugeriram que a forte resposta Th2 induzida pelo *S. mansoni*, bem como outras helmintíases, pode alterar a resposta Th1 e aumentar a suscetibilidade à infecção por vírus, bactérias e protozoários (BRADY et al., 1999; HSIEH; FU; HSIEH, 2014; VALLEJO et al., 2014; OSBORNE et al., 2014). Em casos de coinfeção com *S. mansoni* e vírus da hepatite B e C (HBV e HCV, respectivamente), os pacientes apresentaram alta taxa de hepatite crônica com aumento significativo da carga viral (EDWARDS et al., 2005; GASIM, 2015). Um estudo sobre coinfeção com *S. mansoni* e *Leishmania major*, mostrou que a resposta Th2 induzida pelo *S. mansoni* modulou a resposta Th1 específica para *L. major*, atrasando a cura das lesões cutâneas causadas por esse

parasito (LA FLAMME; SCOTT; PEARCE, 2002). Genaro et al. (1986), estudando o impacto da infecção pelo *T. cruzi* na formação do granuloma esquistossomótico, observaram que os granulomas foram significativamente menores nos animais coinfectados. Estes exemplos ilustram bem a complexidade das coinfeções e, ao mesmo tempo, a importância de elucidar as implicações do poliparasitismo na relação parasito-hospedeiro.

4 JUSTIFICATIVA

Considerando que indivíduos infectados com *S. mansoni* apresentam elevadas chances para cronificação da doença, ao longo desse processo as possibilidades de coinfeção com outras espécies de parasitos são reais e relativamente frequentes. Como a esquistossomose mansônica e a doença de Chagas são afecções diretamente relacionadas à pobreza, não é incomum que grupos populacionais estejam localizados em áreas endêmicas para ambas as doenças, e conseqüentemente sob o risco de coinfeção pelo *S. mansoni* e *T. cruzi*.

Vários estudos indicam que durante a esquistossomose as respostas Th1 e Th2 devem ser moduladas para evitar danos ao hospedeiro, sendo a citocina IL-10 a principal responsável pelo efeito modulador das respostas inflamatórias. Admitindo-se que as respostas imunológicas se desenvolvem a partir da produção de uma variedade típica de moléculas efetoras que modulam de forma distinta os diversos mecanismos inatos e adquiridos de resistência do hospedeiro contra infecções parasitárias, é possível que a sobreposição desses tipos de padrão imunológico possa modificar a relação de resistência e susceptibilidade do hospedeiro contra parasitos envolvidos em condições de coinfeção. Essa proposição parece ser potencialmente realística principalmente considerando coinfeções nas quais os agentes etiológicos envolvidos induzem marcantes perfis polarizados de resposta imunológica, como ocorre na fase crônica da Esquistossomose Mansônica (Th2) e fase aguda da doença de Chagas (Th1).

Considerando o exposto e tendo em vista o grande número de pessoas infectadas por *S. mansoni* e *T. cruzi*, bem como o grande fluxo migratório de

indivíduos infectados a partir de regiões onde as doenças são endêmicas, somado à escassez de trabalhos sobre este tema, é extremamente importante investigar as implicações das coinfeções em diferentes sistemas biológicos. Conhecer os mecanismos imunológicos, moleculares e patológicos por meio dos quais as coinfeções se estabelecem e evoluem é essencial para o desenvolvimento racional de estratégias terapêuticas aplicadas a essas condições. Assim, a investigação da evolução natural das coinfeções pelos parasitas *S. mansoni* e *T. cruzi* pode elucidar se existe interação biológica entre essas infecções e o quanto essa interação pode modificar os desfechos patológicos tipicamente observados nas infecções isoladas por ambos os parasitos.

5 OBJETIVOS

Investigar o desenvolvimento das alterações cardíacas, hepáticas e pulmonares em camundongos coinfectados com *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a parasitemia e o parasitismo cardíaco, hepático e pulmonar em camundongos coinfectados com *S. mansoni* na fase crônica e *T. cruzi* na fase aguda;
- b) Investigar a morfologia e o remodelamento patológico cardíaco, hepático e pulmonar em camundongos coinfectados com *S. mansoni* e *T. cruzi*;
- c) Avaliar o padrão de citocinas produzidas por camundongos coinfectados com *S. mansoni* e *T. cruzi*;
- d) Avaliar os níveis de anticorpos da classe IgG produzidos por camundongos coinfectados com *S. mansoni* e *T. cruzi*.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do trabalho foram utilizados 32 camundongos suíços fêmeas com 8 semanas de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Brasil. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com controle de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), luminosidade (ciclos de 12h/12h, claro/escuro) e alimentados com ração comercial e água autoclavada “*ad libitum*”. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG (protocolo 626/2015).

6.1 CEPA DO *T. CRUZI*

Para a indução da infecção pelo *T. cruzi*, os animais foram inoculados intraperitonealmente com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78, mantidas em passagens sucessivas em camundongos suíços e obtidas por sangria do plexo venoso orbital (VIEIRA et al., 2012).

6.2 CEPA DE *S. MANSONI*

Para infecção dos animais foi utilizada a cepa LE (Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil) de *S. mansoni*, fornecida pelo Moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), onde é mantida por passagem em caramujo *Biomphalaria glabrata* e camundongos suíços. As cercárias foram obtidas mediante exposição de caramujos infectados à luz por aproximadamente 2 horas, a fim de permitir a liberação das mesmas. Para infecção dos camundongos foram usadas 25 cercárias, as quais foram injetadas via subcutânea.

6.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em quatro grupos com 8 animais por grupo: Grupo TC, infectado com 5000 tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* durante trinta dias (fase aguda). Grupo SM, infectado com 25 cercárias da cepa LE de *S. mansoni* durante 150 dias (fase crônica). Grupo SM+TC, infectado com *S. mansoni* durante

120 dias e coinfetados com *T. cruzi* durante 30 dias. Grupo CN, controle não infectado.

6.4 PARASITEMIA

A contagem das formas tripomastigotas de *T. cruzi* no sangue periférico foi realizada diariamente a partir do 3º dia de infecção durante 30 dias conforme o método descrito por Brener (1962). Resumidamente, mediante incisão na extremidade da cauda dos animais, 5 µl de sangue foram coletados e colocados entre lâmina histológica e lamínula de vidro com dimensões padronizadas (22 mm x 22 mm) para obtenção de uma camada delgada de sangue. Para determinação da parasitemia foi registrado o número de tripomastigotas sanguíneos em cinquenta campos histológicos por lâmina, os quais foram analisados em microscópio de luz (Axioscope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) em aumento de 400x.

6.5 NECROPSIA E COLETA DE MATERIAL

Ao final do período experimental os animais foram eutanasiados por meio de punção cardíaca realizada após anestesia com a inalação de isoflurano concentrado até a completa abolição dos movimentos respiratórios e dos reflexos profundos (caudal e podal). Por meio de toracotomia e laparotomia mediana, o coração, fígado e pulmão foram coletados. Os órgãos foram pesados e o peso relativo foi calculado por meio da divisão do peso do órgão pelo peso corporal. Fragmentos de cada órgão foram fixados em solução de paraformaldeído tamponado à 10% (pH=7,4 a 0,1 mol) por 48 horas. O sangue foi centrifugado na presença de anticoagulante à 3,500xg, 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação o plasma sanguíneo foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento da análise de citocinas.

6.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CITOCINAS POR ELISA

Os níveis de citocinas no plasma foram avaliados por meio de ensaio imunoenzimático tipo sanduíche (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA),

utilizando kit comercial (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Brevemente, placas de 96 poços com alta afinidade para proteínas foram sensibilizadas com anticorpos de captura para IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ por 16 horas a 4°C. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente com tampão fosfato de sódio (PBS, 200 μ L/poço) acrescido de 1% (p/v) de albumina bovina sérica (BSA). Os poços foram lavados (200 μ L/poço) com PBS acrescido de 0,05% (v/v) de Tween20 (PBS-T) e em seguida 50 μ L do plasma ou citocinas recombinantes padrão foram adicionadas aos poços e incubadas por 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com 50 μ L/poço dos respectivos anticorpos de detecção biotinilados diluídos em PBS-T e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS-T e 50 μ L de avidina conjugada à peroxidase diluída em PBS-T (1/500) foram adicionados a cada poço e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, após lavagens com PBS-T, a reação foi revelada com a adição de 50 μ L de tampão de revelação (0,5 mg/mL de Ortofenilenodiamino (OPD), diluído em tampão citrato, (pH 5,0 contendo 0,05% de H₂O₂). Após 15 minutos a reação foi interrompida adicionando-se aos poços 50 μ L de ácido sulfúrico 4N. A leitura das absorbâncias foi medida a 492 nm em leitor de ELISA (ELx50, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA). A quantificação das citocinas foi determinada pela obtenção da curva padrão, utilizando citocinas recombinantes com concentrações conhecidas (CALDAS et al., 2008).

6.7 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os níveis de citocinas no tecido foram avaliados utilizando-se a técnica Cytometric Bead Array (CBA). Fragmentos de tecido cardíaco foram homogeneizados na presença de inibidor de protease (Protease inhibitor cocktails; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) utilizando-se homogenizador de tecido (YO-04727-09; LabGEN). O homogenato foi centrifugado a 3000xg durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para quantificação dos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-5 IFN- γ e TNF- α . O experimento foi conduzido com kit comercial (Cytometric bead array mouse Th1/Th2 cytokine; BD Biosciences, San Diego, CA, USA) e os dados foram coletados utilizando-se FACSVerse e analisados com auxílio do software

FCAP 3.0 (BD, Pharmingen, EUA). Curvas padrões variando de 20 a 5,000 pg/ml foram determinadas para a quantificação de cada citocina (SANTOS et al., 2015).

6.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Fragmentos do tecido cardíaco e hepático foram removidos e pesados. Os níveis de óxido nítrico (NO) foram indiretamente quantificados pela reação de Griess (TSIKAS, 2007). Brevemente, 50 µL do sobrenadante do homogenato do tecido cardíaco e hepático foram incubados com volume equivalente de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% naftileno diamida dihidroclorido, e 2,5% de ácido fosfórico) em temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida a 550 nm em espectrofotômetro próprio para leitura de microplacas (PowerWave X; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Os níveis de proteína nos tecidos foram medidos utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

6.9 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS

Amostras de sangue (0,5 mL) foram centrifugadas em tubos heparinizados a 3000×g durante 10 min para obtenção do plasma. Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* foram detectados pela técnica descrita por Voller et al. (1976), utilizando ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA). Microplacas de poliestireno (96 poços) foram sensibilizadas durante 12 horas a 4 °C com 100 µL de antígenos de *T. cruzi* (4,0 ug / mL) preparado a partir extração alcalina de parasitos em crescimento exponencial em meio LIT (CALDAS et al., 2008). Após lavagem e bloqueio com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 1% de soro fetal bovino, 100µl do soro diluído de cada animal (1:20) foi adicionado aos poços e a placa foi incubada durante 45 min à 37 °C. Após lavagem com PBS-Tween 20 (0,05%), 100 µL anticorpos de coelho anti-IgG de camundongo (anti-IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b) conjugados com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) foram adicionados aos poços e a placa foi incubada durante 45 min à 37 °C. A placa

foi lavada e os poços incubados com o substrato contendo O-fenilenodiamino-OPD (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) como cromógeno. A densidade óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro à 490 nm (Anthos Zenyth 200, Biochrom, Cambridge, UK). A absorvância média para dez amostras de controle negativo (não infectado) mais dois desvios padrão foram utilizados como o ponto de corte para discriminar resultados positivos e negativos (CALDAS et al., 2008).

6.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA

Após a fixação histológica, os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool a partir de 70% até álcool absoluto (99,8%). Em seguida os órgãos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina a 60°C. Para cada órgão foram obtidos em micrótomo rotativo 3 cortes semi-seriados com 5 μ m obtidos em intervalos de 100 micrometros para evitar analisar a mesma área histológica. As secções do coração, fígado e pulmão foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica geral (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e Sirius-red para evidenciação de fibras colágenas (MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Os cortes histológicos montados sobre lâmina histológica foram visualizados com a utilização de câmera fotográfica digital (QColor 3, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz convencional (Axioscope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Imagens digitalizadas foram obtidas a partir de cada corte histológico utilizando-se o software de captura e análise de imagens Axion Vision LE (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

6.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Na análise histopatológica do coração, fígado e pulmão foram investigadas qualitativamente evidências de necrose tecidual, hipertrofia de cardiomiócitos e hepatócitos, padrão de organização e distribuição das células do parênquima e do

estroma conjuntivo, morfologia e distribuição dos vasos sanguíneos e das células intersticiais. Em adição, foi investigada a presença e distribuição de focos inflamatórios, granulomas esquistossomóticos e áreas de fibrose tecidual (NOVAES et al., 2013). A análise histopatológica foi realizada em 10 campos histológicos aleatórios para cada animal, os quais foram obtidos com a utilização de lente objetiva de 40x (ampliação de 400x), perfazendo uma área total do miocárdio de $21,10 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ para cada grupo (NOVAES et al., 2013).

6.12 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

O método estereológico foi utilizado para avaliar a amplitude do remodelamento morfológico do parênquima e estroma coração, fígado e pulmão (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). A densidade de volume, parâmetro utilizado para medir o percentual da área coupada pela estrutura de interesse (cardiomiócitos, hepatócitos, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, alvéolos pulmonares), densidade de superfície, área ocupada pela estrutura de interesse no tecido (cardiomiócitos, hepatócitos, vasos sanguíneos e alvéolos pulmonares), e densidade de número (hepatócitos, células intersticiais, alvéolos pulmonares e granulomas esquistossomóticos) foram estimados (NOVAES et al., 2013).

A densidade de volume (V_v , %) foi estimada por contagem de pontos de acordo com a seguinte fórmula : $V_v = \Sigma P / P_t$, em que ΣP representa o número de pontos do sistema de teste que incidem sobre a estrutura de interesse e P_t corresponde ao número total de pontos do sistema de teste. Para estas análises, foi usado um sistema de teste com 100 pontos contidos em uma área de teste (A_t) de $42,21 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ao nível do tecido. A densidade de superfície (S_v , $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) foi estimada por meio da relação $S_v = 2 \times (\Sigma I / \Sigma P) \times (P_t / l)$, em que ΣI indica o número total de interseções entre os arcos cicloides ($n=33$) e a superfície da estrutura de interesse, ΣP representa o número de pontos que incide sobre a estrutura de interesse, P_t consiste no número total de pontos do sistema de teste ($n=66$) e l representa o comprimento de um arco cicloide ($30,44 \mu\text{m}$). A análise estereológica foi realizada em 10 campos histológicos aleatórios para cada animal, obtidos com a utilização de lente objetiva de 40x (ampliação de 400x), perfazendo uma área total

do órgão de $21,10 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ para cada grupo. A análise estereológica foi realizada com o auxílio do software de análise de imagens Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) (NOVAES et al., 2013).

6.13 ANÁLISE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO TECIDUAL

A intensidade do processo inflamatório no coração e fígado foi investigada pelo método estereológico em cortes corados com hematoxilina e eosina por meio da contagem do número de células intersticiais observadas nos tecidos de animais infectados em relação à celularidade observada no grupo controle. Para isso utilizou-se a fórmula: $QA_{\text{inf}} = \Sigma_{\text{inf}} / At$, onde Σ_{inf} representa somatório do número de perfis de núcleos de células intersticiais (inflamatórias) e At corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($25 \times 10^3 \mu\text{m}^2$). A celularidade tecidual foi avaliada em 10 campos histológicos aleatórios por animal com a utilização de lente objetiva de 40x (ampliação de 400x), perfazendo uma área total de $12,9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ para cada grupo. Os núcleos dos cardiomiócitos e hepatócitos foram excluídos da contagem. A análise da inflamação foi realizada utilizando o software de análise de imagens Image-Pro® plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) (NOVAES et al., 2013).

6.14 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DOS GRANULOMAS

Nos animais infectados com *S. mansoni* e aqueles coinfectados com *T. cruzi* foi investigado o número e dimensão dos granulomas esquistosomóticos. Para a análise da densidade de número de granulomas por unidade de área histológica ($QA_g, n/\text{mm}^2$), foi utilizada a fórmula $QA_g = \Sigma_g / At$, onde Σ_g representa somatório do número de perfis de granulomas e At corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($34 \times 10^3 \mu\text{m}^2$). A QA_g foi estimada a partir de 10 campos histológicos aleatórios para cada animal obtidos com a utilização de lente objetiva de 5x (ampliação de 50x), perfazendo uma área tecidual total de $27,20 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ para cada grupo. Foram diferencialmente quantificados granulomas em fase exsudativa-produtiva e granulomas organizados (fibróticos).

A área dos granulomas foi determinada diretamente por meio da ferramenta de contorno do programa de análise de imagens Image-Pro plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA). Foram analisados 80 granulomas por grupo. As medidas de área foram realizadas apenas naqueles granulomas em que o ovo de *S. mansoni* foi claramente observado (REIS et al., 2001).

6.15 ANÁLISE DO PARASITISMO TECIDUAL

A carga parasitária média foi estimada por meio da quantificação dos níveis de DNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco e hepático utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction – PCR). Animais que apresentaram resultados positivos em qualquer ensaio de reativação da infecção ou aqueles em que o DNA do parasito foi detectado no tecido cardíaco foram considerados não curados (CALDAS et al., 2008). A extração de DNA genómico total de camundongos controle e infectados com *T. cruzi* foi realizada utilizando kit comercial (Assistente[®] Genomic DNA Purification Kit, Promega) de acordo com Caldas et al. (2012). O DNA foi quantificado por espectrofotometria (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e as concentrações foram ajustadas para 25 ng / mL. A reacção de PCR foi realizada num volume de 10 uL contendo 50 ng de DNA genómico, 5µL de SYBR Green[®] PCR Mastermix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e 0,35 µL de primers contendo 195 pares de bases (pb) específicos do DNA *T. cruzi* ou 0,50 µL de primers para o factor de necrose tumoral- α (TNF- α). Os primers para *T. cruzi* (TCZ-F 5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3', em que M = A ou C e TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') amplificam um fragmento de 182 pb. Os primers para TNF- α (TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3') amplificam um produto de 170 pb (CUMMINGS; TARLETON, 2003). O programa de ciclos consistiu de uma desnaturação inicial à 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos à 94 °C durante 15s e 64,3 °C durante 1 min, com aquisição de fluorescência a 64,3 °C. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de fusão com uma desnaturação inicial de 15 segundos a 95 °C, arrefecimento a 60 °C durante 1 min e,

em seguida, um aumento de temperatura de 0,3 °C/s a partir de 60 à 95 °C. Cada placa de 96 poços de reação continha uma curva padrão e dois controles negativos. Os controles negativos consistiram de uma mistura de reação com os iniciadores específicos para *T. cruzi* ou camundongo sem o DNA e também com DNA de tecido obtido a partir de camundongos não infectados. Os valores médios para a quantificação de DNA de *T. cruzi* foram normalizados pelos dados obtidos com os iniciadores específicos TNF- α como se segue: valor normalizado = (média de DNA de *T. cruzi* / média de DNA de TNF- α) \times 1000, onde " 1000" corresponde ao valor esperado para o TNF- α a partir de 30 mg de tecido cardíaco. As eficiências de amplificação foram determinadas automaticamente pelo Software StepOne TM v2.0 (eficiência [E] = $10^{[-1 / \text{inclinação}]}$) (STORDEUR et al., 2002).

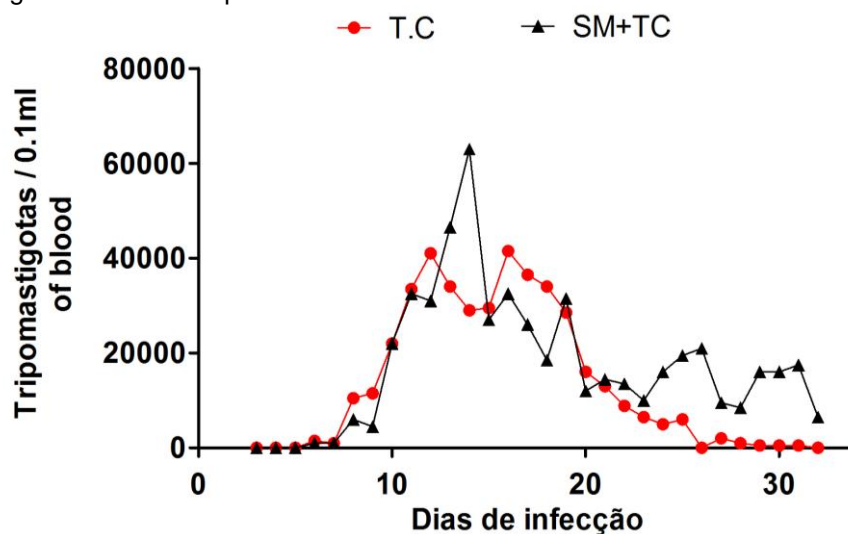
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP). A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste D'agostino Pearson. Os dados paramétricos foram comparados entre dois grupos (TC vs. SM+TC) por meio do teste t de *student*. A variância dos dados obtidos de ambos os grupos investigados (TC vs. SM vs. SM+TC vs. CN) foi avaliada por meio de análise de variância unifatorial (One-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados não paramétricos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados e os gráficos construídos com a utilização do software estatístico GraphPad-Prism 5 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA).

8 RESULTADOS

Todos os animais inoculados com *S. mansoni* desenvolveram a esquistossomose, como observado pela presença de ovos do parasito e granulomas esquistossomóticos no fígado dos animais infectados. De forma semelhante, todos os animais inoculados com a cepa Berenice-78 de *T. cruzi* desenvolveram a infecção, como evidenciado pela presença de formas tripomastigotas no sangue periférico. A Figura 3 representa a curva de parasitemia obtida ao longo do experimento para o grupo infectado pelo *T. cruzi* (TC) e aquele coinfectado com *S. mansoni* e *T. cruzi* (SM+TC). Em ambos os grupos, o período pré-patente foi de 4 dias. No grupo TC o completo clearance da parasitemia foi alcançado no dia 26, o que não ocorreu no grupo SM+TC que manteve a parasitemia patente ao longo de todo o período experimental.

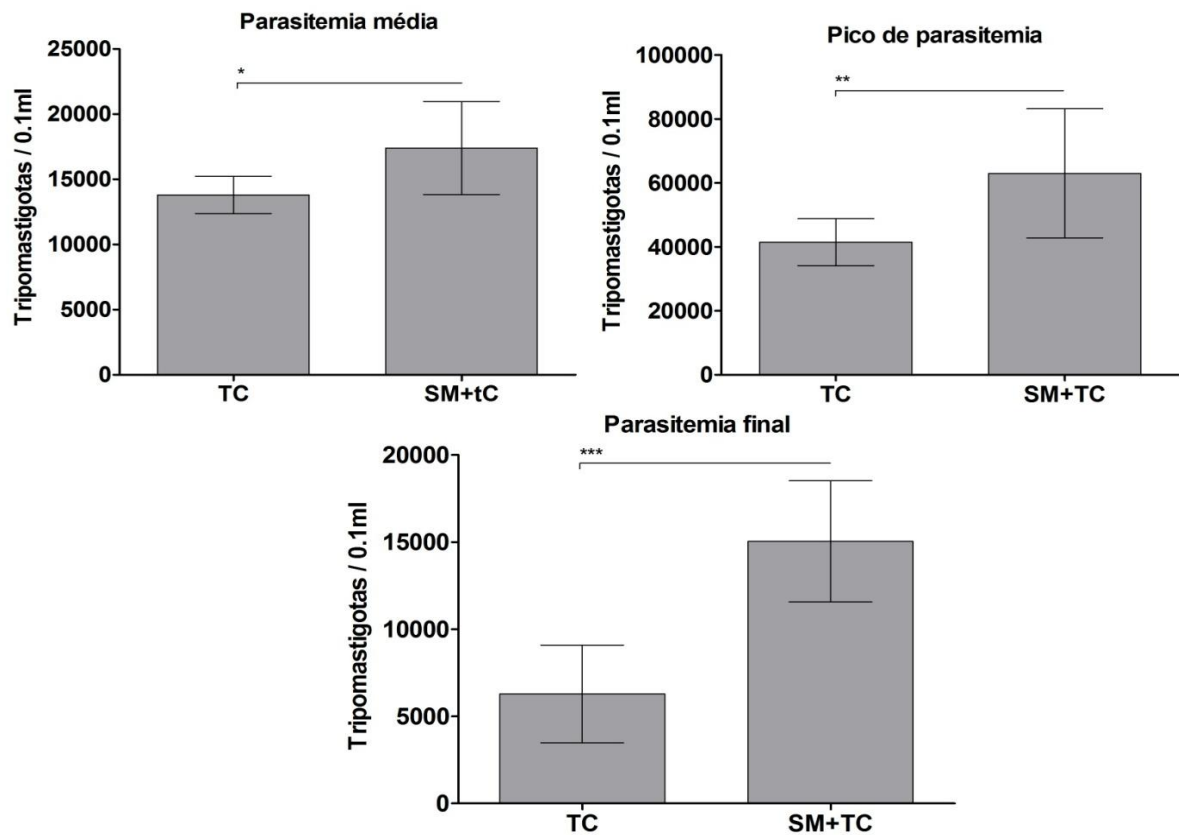
Figura 3 - Curva de parasitemia.



Notas: Curva de parasitemia de camundongos infectados pela cepa Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* (TC) e aqueles coinfectados com *Schistosoma mansoni* e *T.cruzi* (SM+TC). Os pontos indicam os valores médios de parasitemia para cada grupo obtidos por meio da contagem de formas tripomastigotas de *T. cruzi* no sangue periférico a fresco.

A parasitemia média, o pico de parasitemia e a parasitemia final foram significativamente maiores nos animais coinfectado comparados aos animais do grupo TC ($p < 0,05$). (Figura 4).

Figura 4 - Análise da parasitemia média, pico de parasitemia e parasitemia final.

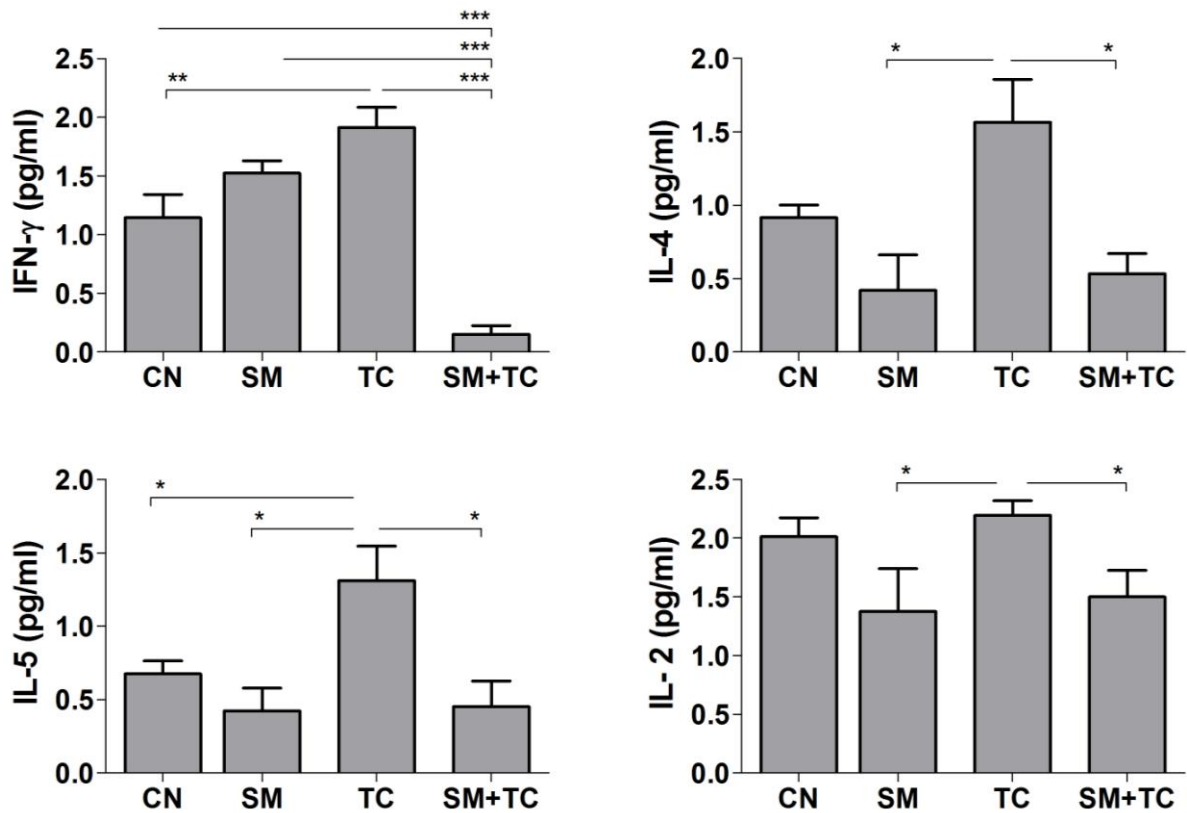


Notas: Resultado proveniente de camundongos infectados com a cepa Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* (TC) e aqueles coinfetados com *Schistosoma mansoni* e *T. cruzi* (SM+TC). Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$), teste t de *student*.

8.1 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CITOCINAS POR ELISA

Os níveis de citocinas no plasma dos animais controle e infectados estão apresentados na Figura 5. Os animais coinfetados (SM+TC) apresentaram baixos níveis de IFN- γ comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Os animais infectados apenas com *T. cruzi* apresentaram aumento significativo dessa citocina em relação aos animais controle não infectados ($p < 0,05$). Os animais do grupo TC apresentaram elevados níveis de IL-2 e IL-4 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), exceto quando comparado ao grupo controle. Os níveis de IL-5 se apresentaram mais elevados no grupo TC comparado aos demais grupos ($p < 0,05$).

Figura 5 - Níveis de citocinas plasmáticas em camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.

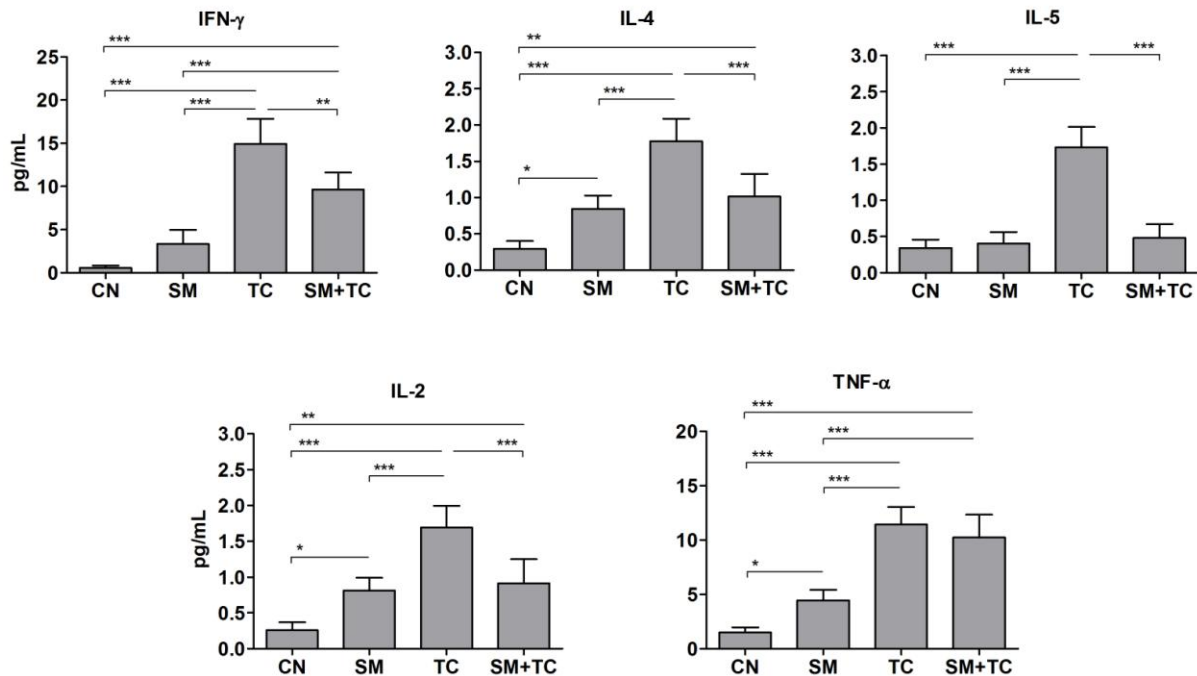


Notas: Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. *diferença estatística entre os grupos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$), ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

8.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os níveis de citocinas no tecido cardíaco dos animais controle e infectados estão apresentados na Figura 6. Todos os grupos infectados apresentaram aumento significativo de IL-2, IL-4 e TNF- α quando comparados com o grupo controle não infectado. O grupo infectado com *T. cruzi* apresentou aumento significativo de IFN- γ comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Os animais coinfected apresentaram aumento significativo dessa citocina em relação aos animais infectados apenas com *S. mansoni* e controle não infectado ($p < 0,05$). Os animais do grupo TC apresentaram elevados níveis de IL-4, IL-5 e IL-2 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Os níveis de TNF- α aumentaram significativamente nos animais infectados com *T. cruzi* e coinfected ($p < 0,05$), os quais não apresentaram diferença entre si.

Figura 6 - Níveis de citocinas no tecido cardíaco de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.



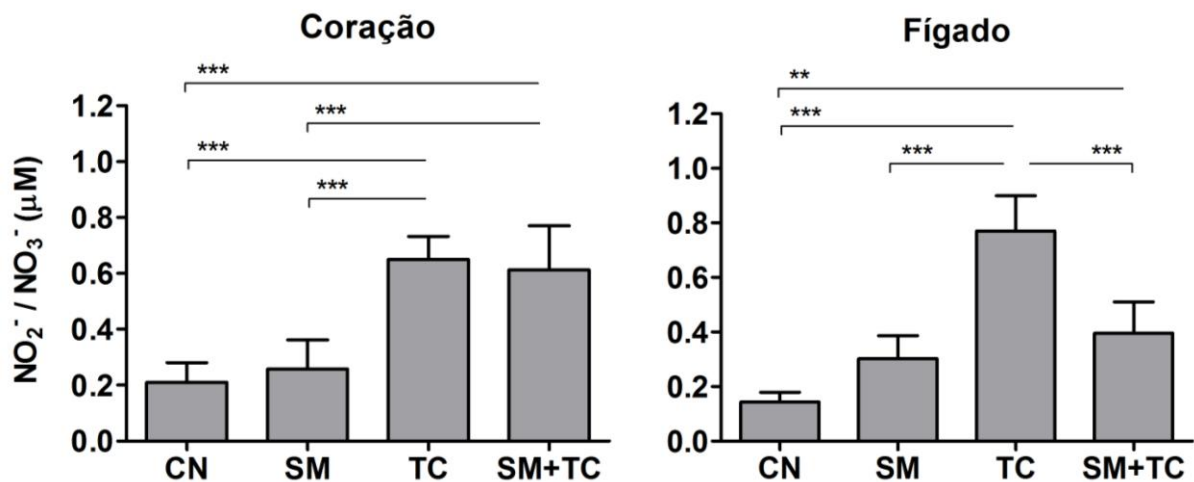
Notas: Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. *diferença estatística entre os grupos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$), ANOVA one-way e pós-teste de Tukey

8.3 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Os níveis de óxido nítrico (NO) nos animais controle e infectados estão apresentados na Figura 7. Os animais infectados com *T. cruzi* e coinfectedados com *S. mansoni* e *T. cruzi* apresentaram aumento significativo do nível de óxido nítrico no coração quando comparados com o grupo controle não infectado e infectado com *S. mansoni* ($p < 0,05$), os quais não apresentaram diferença entre si.

No tecido hepático os animais dos grupos infectados com *T. cruzi* e coinfectedados com *S. mansoni* e *T. cruzi* apresentaram níveis significativamente maiores de óxido nítrico quando comparados com o grupo controle não infectado ($p < 0,05$). Nos animais infectados apenas com *T. cruzi* os níveis de óxido nítrico foram significativamente maiores quando comparados com os demais grupos ($p < 0,05$).

Figura 7 - Níveis de óxido nítrico (NO) no tecido cardíaco e hepático de animais não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.

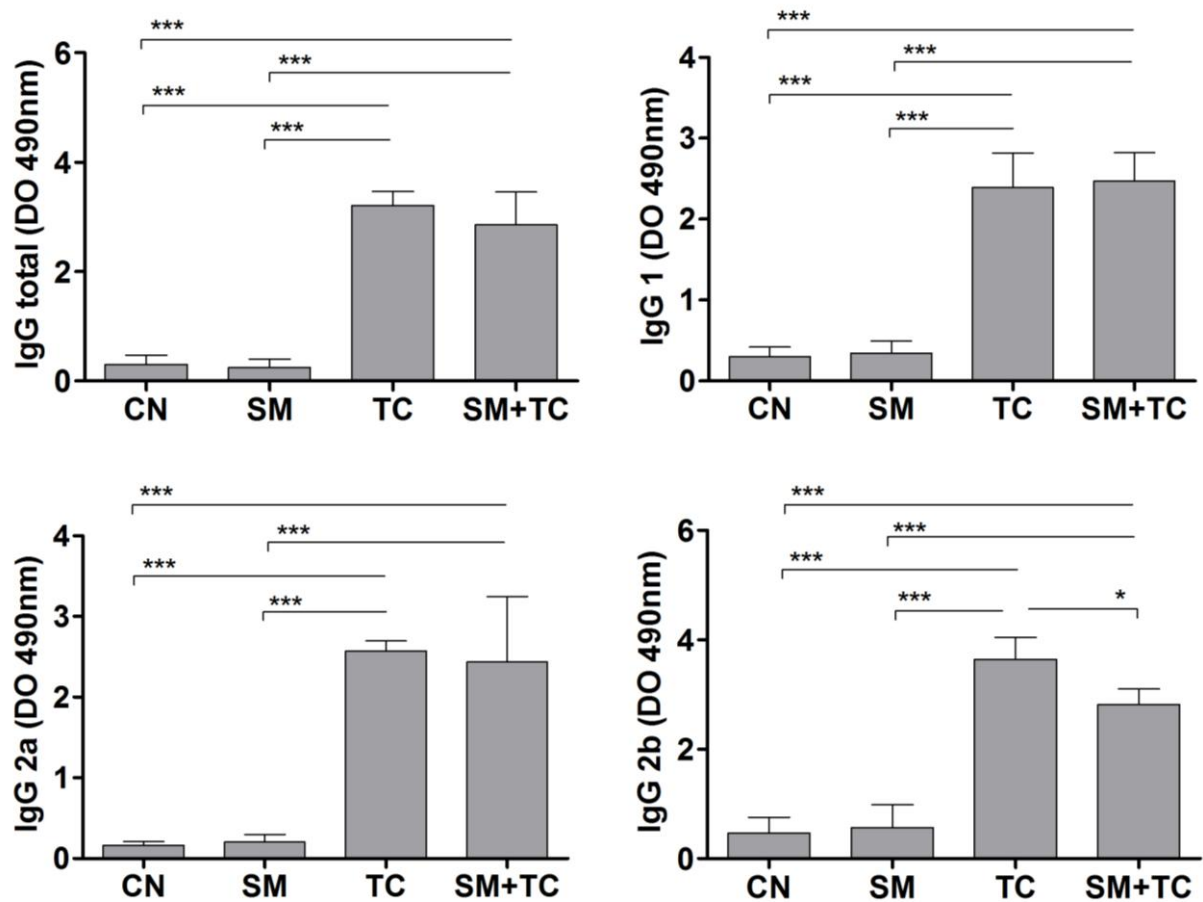


Notas: Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. *diferença estatística entre os grupos (** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$), ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

8.4 ANÁLISE DE ANTICORPOS

Os níveis de anticorpos no plasma dos animais controle e infectados estão apresentados na Figura 8. Os animais infectados com *T. cruzi* e aqueles infectados com *S. mansoni* e *T. cruzi* apresentaram aumento significativo nos níveis de anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b quando comparados com o grupo controle e infectado apenas com *S. mansoni* ($p < 0,05$). Os níveis de IgG2b aumentou significativamente nos animais do grupo TC comparado com os animais do grupo SM+TC ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos TC e SM+TC nos níveis de IgG, IgG1 e IgG2a.

Figura 8 - Níveis de anticorpos em camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.

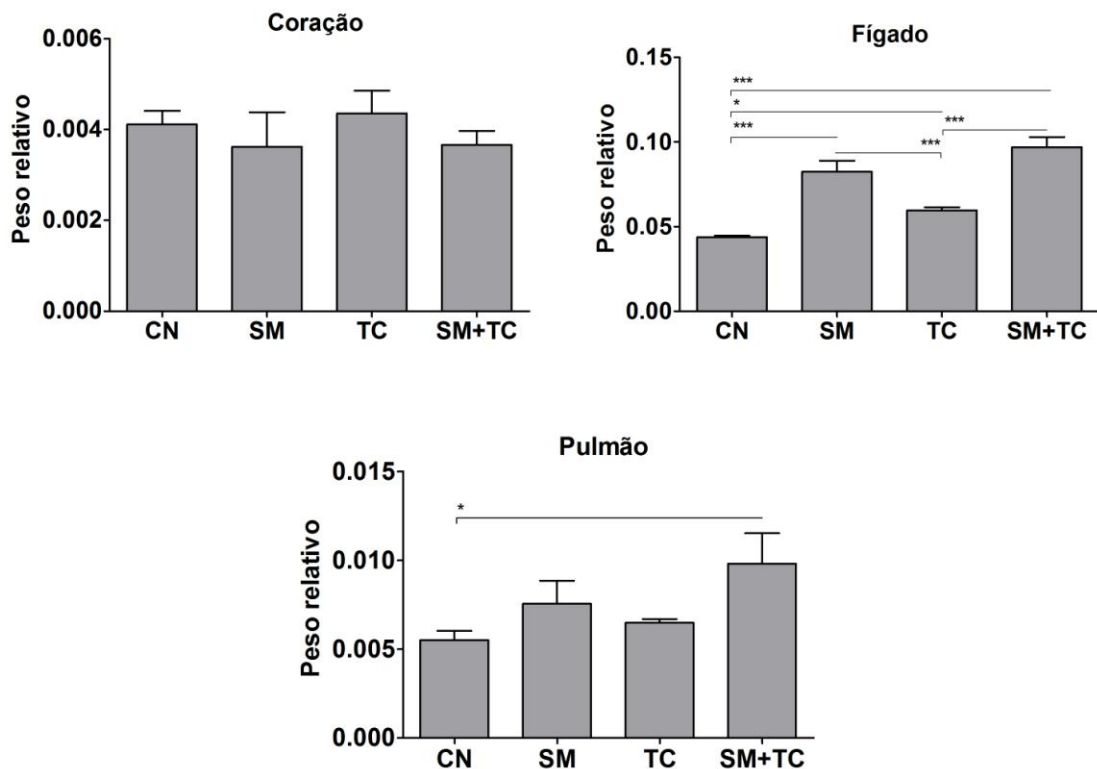


Notas: Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. *diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$, *** $p < 0,0001$), ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

8.5 PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS

Os resultados da massa relativa dos órgãos analisados encontram-se representados na Figura 9. Os animais infectados apenas por *T. cruzi* ou *S. mansoni* ou aqueles coinfetados apresentaram hipertrofia hepática em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). A hipertrofia foi significativamente menor no grupo infectado por *T. cruzi* em relação ao grupo infectado com *S. mansoni* ou coinfetado ($p < 0,05$). Os animais coinfetados apresentaram hipertrofia pulmonar em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na massa relativa do coração.

Figura 9 - Comparação entre o peso relativo dos órgãos de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.

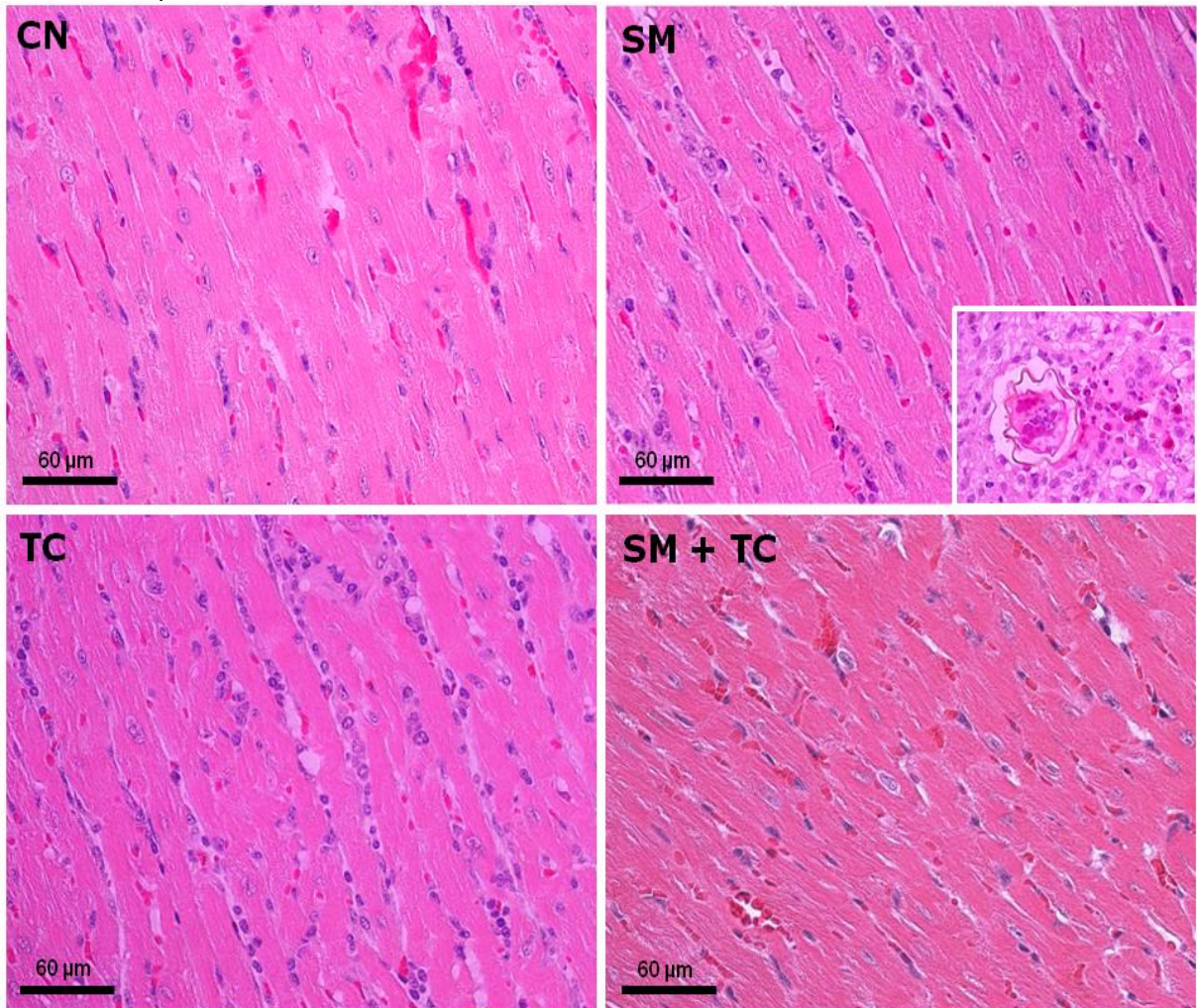


Notas: Os resultados para cada grupo estão representados como média ± desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$), ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

8.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO MIOCÁRDIO

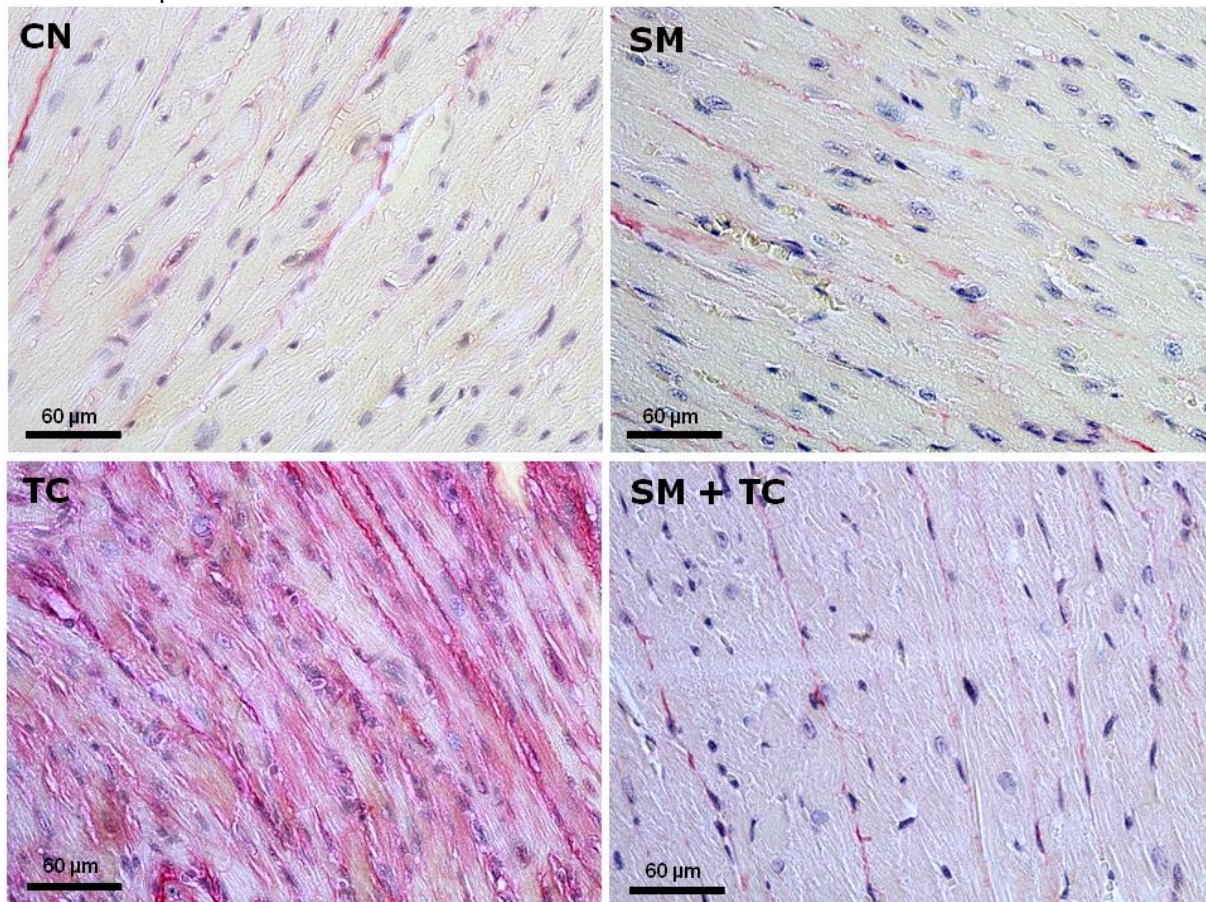
A análise histopatológica do tecido cardíaco demonstrou que os animais não infectados apresentaram morfologia normal do miocárdio, com cardiomiócitos organizados paralelamente, tecido conjuntivo intercelular escasso e celularidade tecidual reduzida. Os animais infectados por *T. cruzi* (TC) apresentaram infiltrado inflamatório pericelular difuso, constituído predominantemente por células mononucleares, expansão do estroma conjuntivo e fibrose tecidual. Os animais infectados com *S. mansoni* (SM) e aqueles coinfetados (SM+TC) apresentaram distribuição semelhante de tecido conjuntivo, células intersticiais e vasos sanguíneos no tecido cardíaco (Figura 10 e 11).

Figura 10 - Fotomicrografias representativas do tecido cardíaco de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*



Notas: (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina). CN) Animal não infectado, SM) Animal infectado com *S. mansoni* (Imagem destacada: ovo de *S. mansoni* e infiltrado inflamatório eosinofílico), TC) Animal infectado com *T. cruzi*, SM+TC) Animal infectado com *S. mansoni* e coinfestado com *T. cruzi*.

Figura 11 - Fotomicrografias representativas do tecido cardíaco de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.

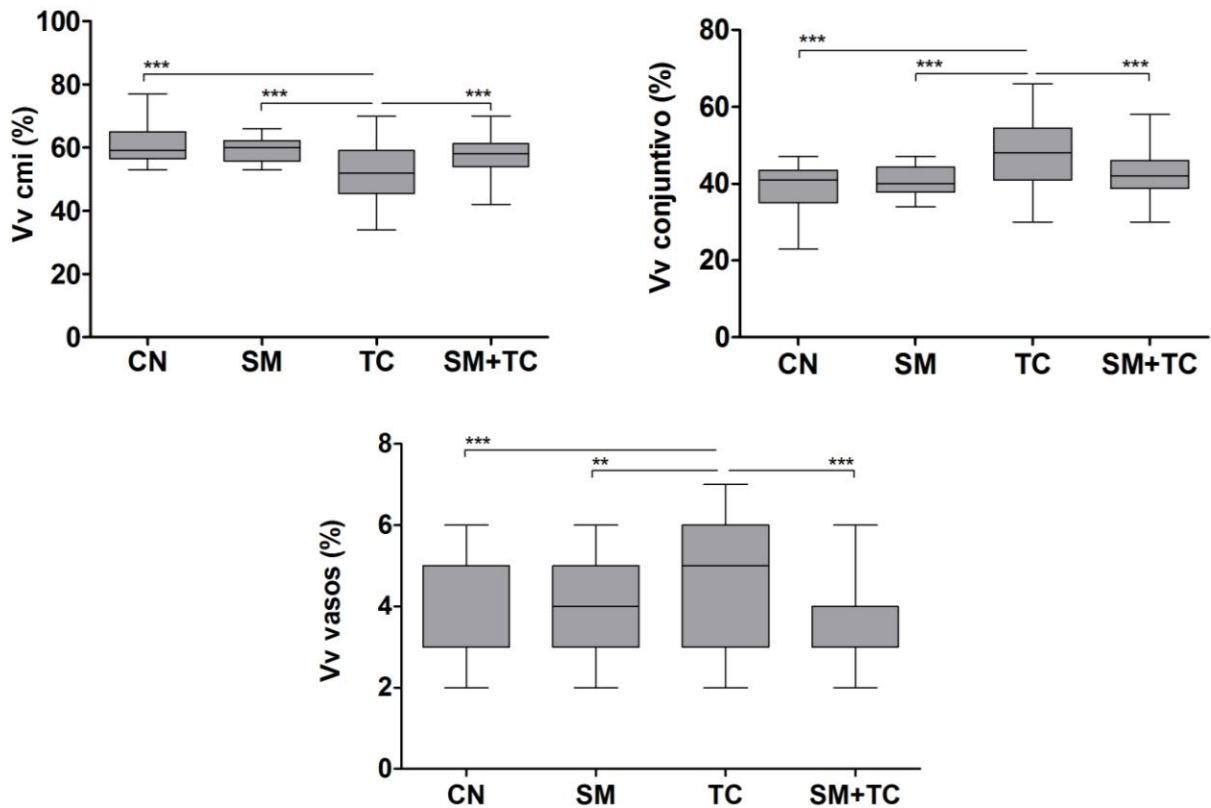


Notas: (Microscopia de campo claro, coloração: Sirius red). CN) Animal não infectado, SM) Animal infectado com *S. mansoni*, TC) Animal infectado com *T. cruzi*, SM+TC) Animal infectado com *S. mansoni* e coinfectado com *T. cruzi*.

8.6.1 Parâmetros estereológicos do miocárdio

Os resultados da análise estereológica do tecido cardíaco encontram-se apresentados na Figura 12. A densidade de volume de cardiomiócitos ($V_v \text{ cmi} [\%]$) apresentou redução significativa nos animais do grupo TC comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Resultado inverso foi observado para a densidade de volume do estroma conjuntivo ($V_v \text{ conjuntivo} [\%]$) e dos vasos sanguíneos ($V_v \text{ vasos} [\%]$) no músculo cardíaco, que apresentaram aumento significativo no grupo TC comparado aos outros grupos ($p < 0,05$).

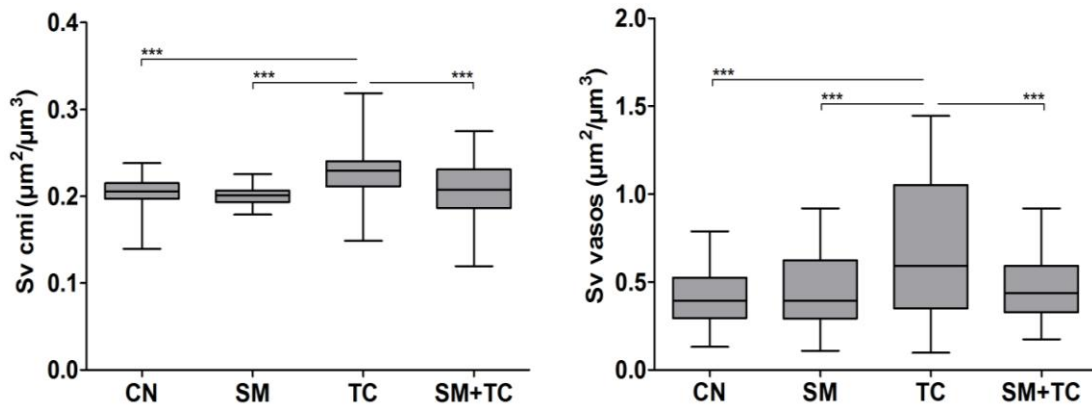
Figura 12 - Distribuição de cardiomiócitos (cmi), tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (vasos) no miocárdio de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.



Notas: A caixa representa o intervalo interquartil com a mediana indicada (linha horizontal) e os bigodes representam os quartis superiores e inferiores. Diferença estatística entre os grupos (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$), teste de Kruskal-Wallis.

A densidade de superfície de cardiomiócitos (Sv cmi [$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$]) e vasos sanguíneos (Sv vasos [$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$]) foram significativamente maiores nos animais do grupo TC comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). (Figura 13).

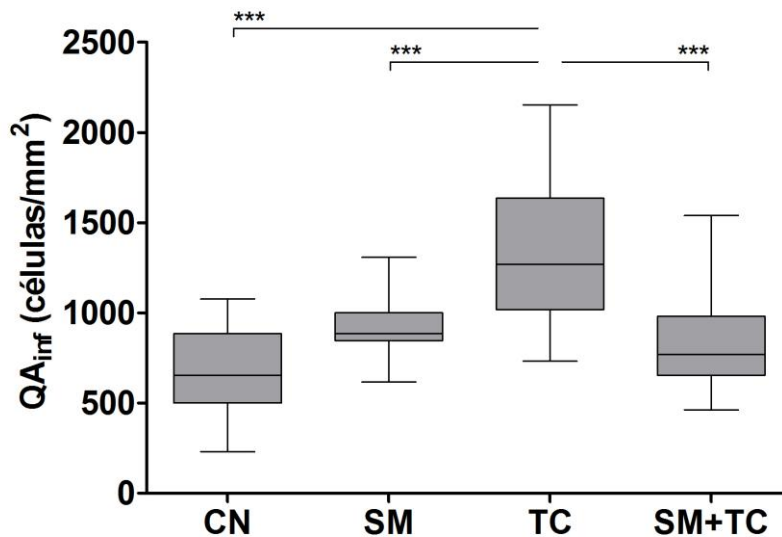
Figura 13 - Densidade de superfície (Sv) de cardiomiócitos (cmi) e vasos sanguíneos (vasos) no miocárdio de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.



Notas: A caixa representa o intervalo interquartil com a mediana indicada (linha horizontal) e os bigodes representam os quartis superiores e inferiores. Diferença estatística entre os grupos (** $p < 0,0001$), teste de Kruskal-Wallis.

A densidade de número de células inflamatórias (QA_{inf} [células/mm²]) no tecido cardíaco encontra-se apresentada na Figura 14. Animais do grupo TC apresentaram número significativamente maior de células inflamatórias no miocárdio quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$), os quais não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$).

Figura 14 - Densidade de número de células inflamatórias (QA_{inf}) no tecido cardíaco de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.

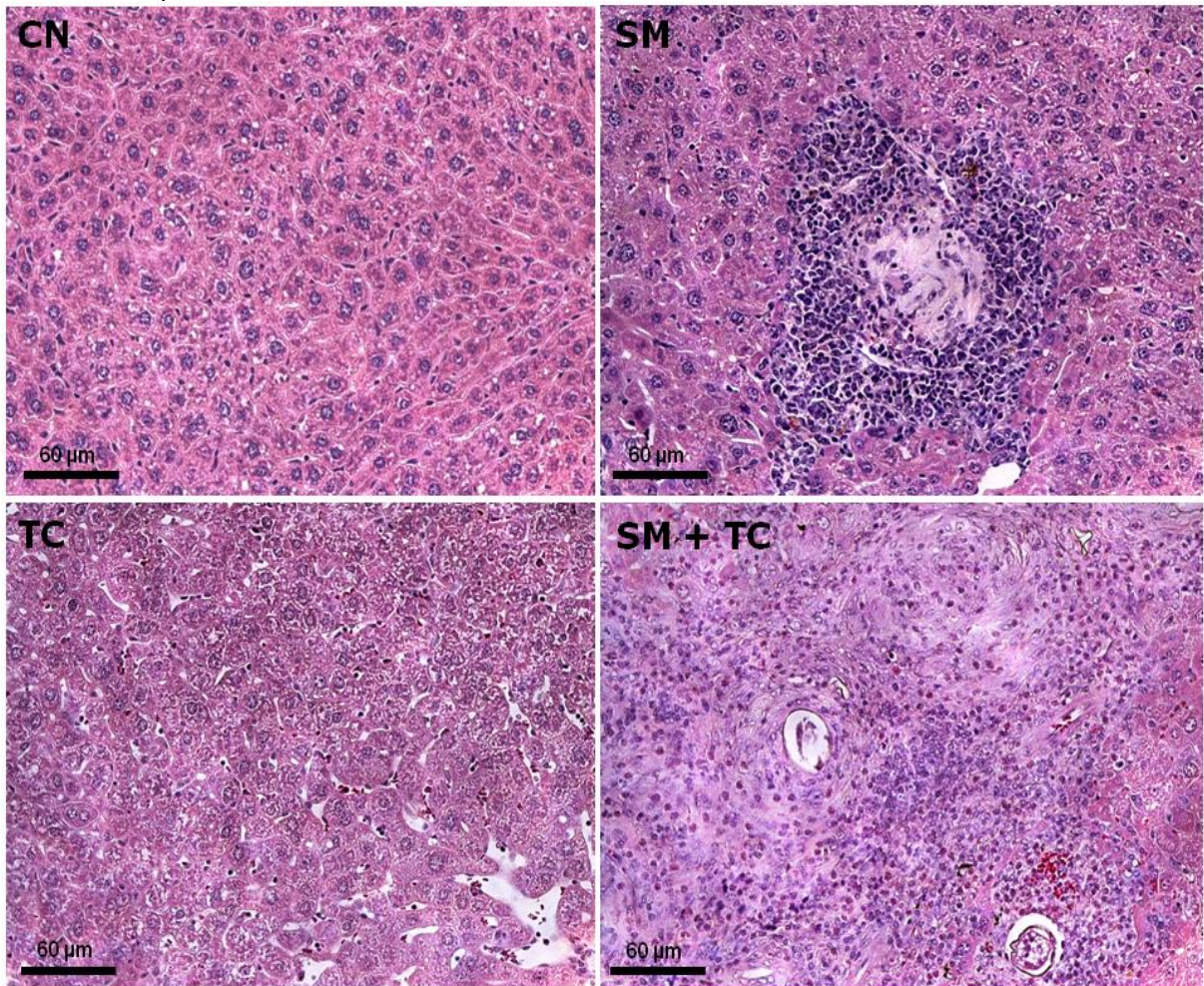


Notas: A caixa representa o intervalo interquartil com a mediana indicada (linha horizontal) e os bigodes representam os quartis superiores e inferiores. Diferença estatística entre os grupos (** $p < 0,0001$), teste de Kruskal-Wallis.

8.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO

A análise histopatológica do tecido hepático demonstrou que os animais não infectados apresentaram morfologia normal, com hepatócitos organizados em cordões celulares bem definidos, reduzida celularidade intersticial e capilares sinusóides com aspecto regular distribuídos entre os cordões de hepatócitos. Os animais infectados por *T. cruzi* apresentaram indícios de hipertrofia de hepatócitos com cordões celulares espessados e dilatação do espaço sinusoidal. Os animais infectados com *S. mansoni* apresentaram infiltrado inflamatório evidente formado predominantemente por células mononucleares concentradas principalmente ao redor dos granulomas esquistossomóticos, os quais foram distribuídos difusamente no tecido hepático. Os animais coinfectedos apresentaram intenso processo inflamatório difuso com evidente subversão da histoarquitetura do parênquima e estroma hepático, com numerosos granulomas esquistossomóticos difusos ou confluentes (Figura 15).

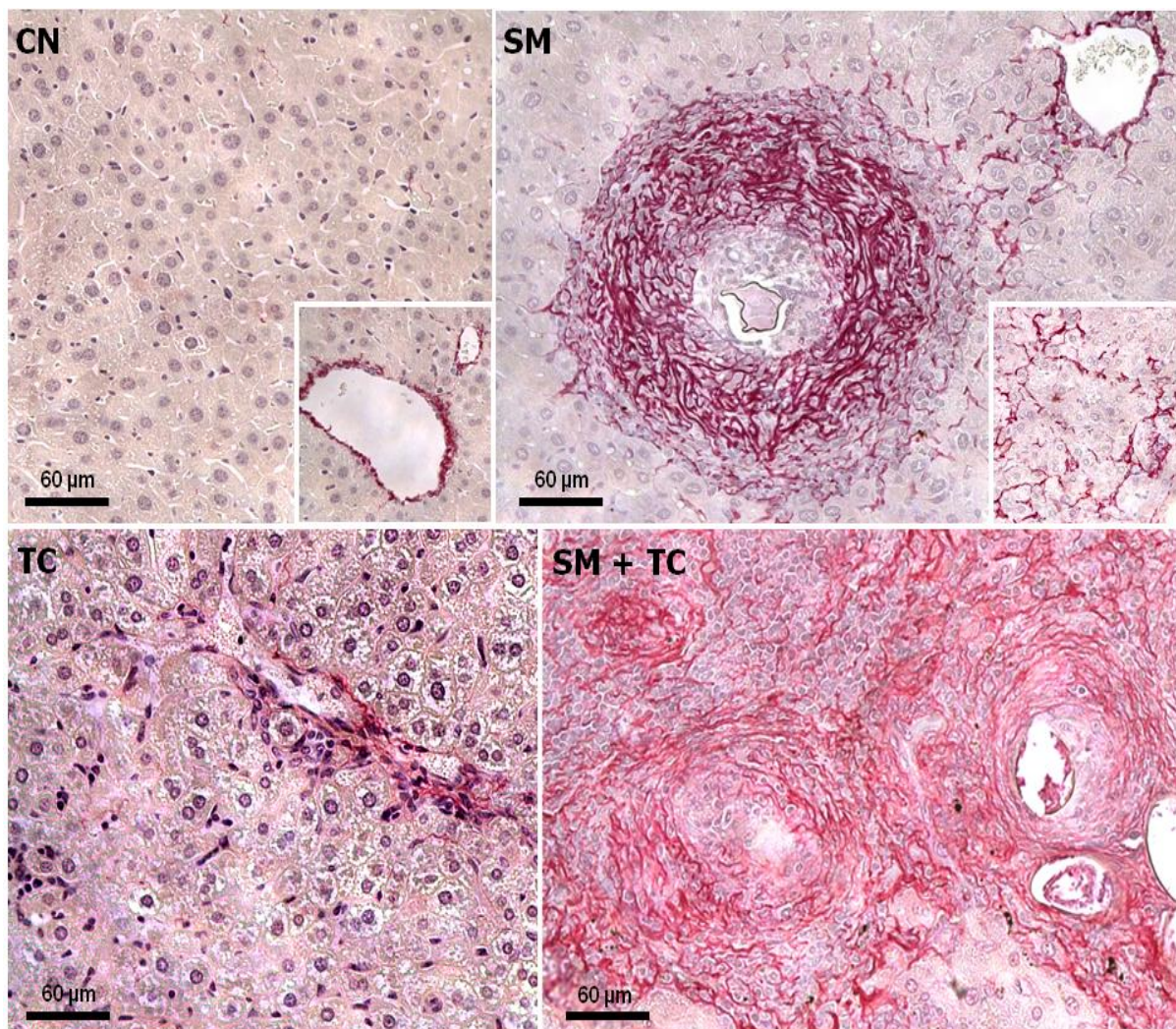
Figura 15 - Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.



Notas: (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina). CN) Animal não infectado, SM) Animal infectado com *S. mansoni*, TC) Animal infectado com *T. cruzi*, SM+TC) Animal infectado com *S. mansoni* e coinfestado com *T. cruzi*.

Nos animais não infectados e naqueles infectados apenas com *T. cruzi* foi observada baixa densidade de fibras colágenas finas no tecido hepático com distribuição predominantemente perivascular. Os animais infectados com *S. mansoni* apresentaram aumento do conteúdo de colágeno intersticial, distribuído entre os cordões de hepatócitos e principalmente organizadas ao redor do granuloma esquistossomótico. Os animais coinfetados apresentaram intensa fibrose tecidual com deposição difusa de espessas fibras colágenas, mais concentradas ao redor do granuloma esquistossomótico (Figura 16).

Figura 16 - Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.

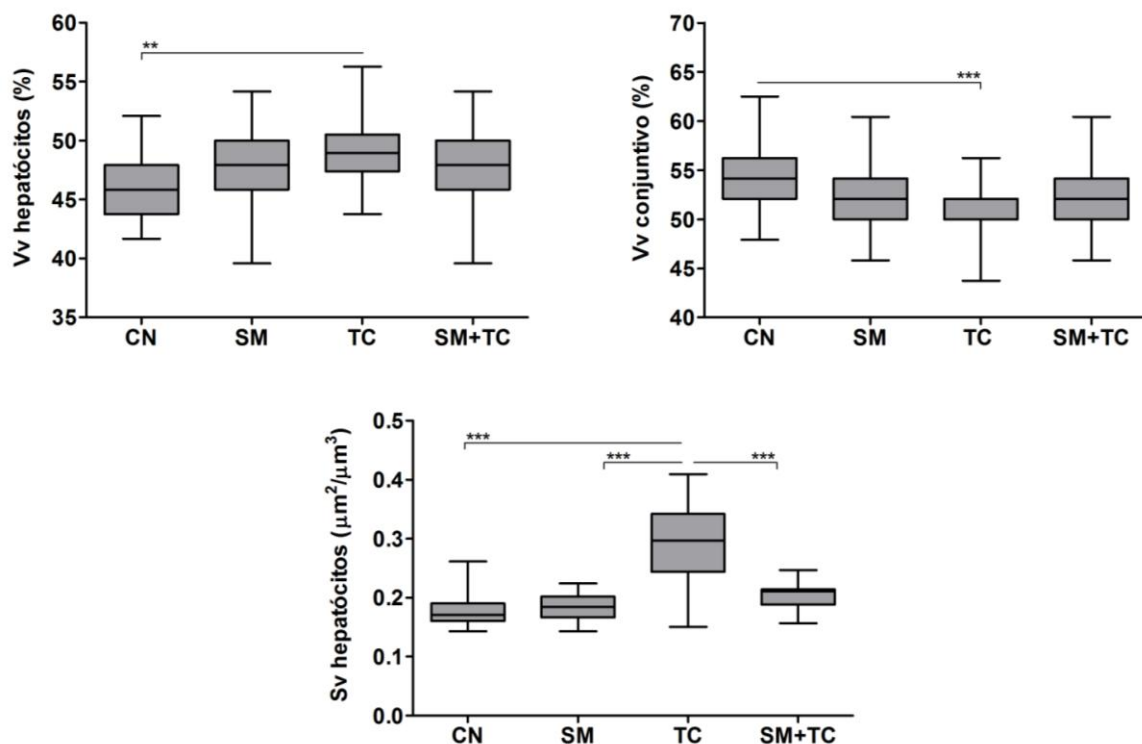


Notas: (Microscopia de campo claro, coloração: Sirius red). CN) Animal não infectado, SM) Animal infectado com *S. mansoni*, TC) Animal infectado com *T. cruzi*, SM+TC) Animal infectado com *S. mansoni* e coinfetado com *T. cruzi*.

8.7.1 Parâmetros estereológicos do tecido hepático

Os resultados da análise estereológica do tecido hepático encontram-se apresentados na Figura 17. A densidade de volume de hepatócitos (Vv hep. [%]) aumentou significativamente nos animais do grupo TC quando comparados com os animais do grupo CN ($p < 0,05$). Resultado inverso ocorreu com a densidade de volume de tecido conjuntivo (Vv conj. [%]), que diminuiu significativamente nos animais do grupo TC quando comparado com os animais do grupo CN ($p < 0,05$). A densidade de superfície dos hepatócitos (Sv hep) apresentou aumento significativo no grupo TC comparado aos outros grupos ($p < 0,05$).

Figura 17 - Densidade de volume (Vv) de hepatócitos e tecido conjuntivo e densidade de superfície (Sv) de hepatócitos em camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.



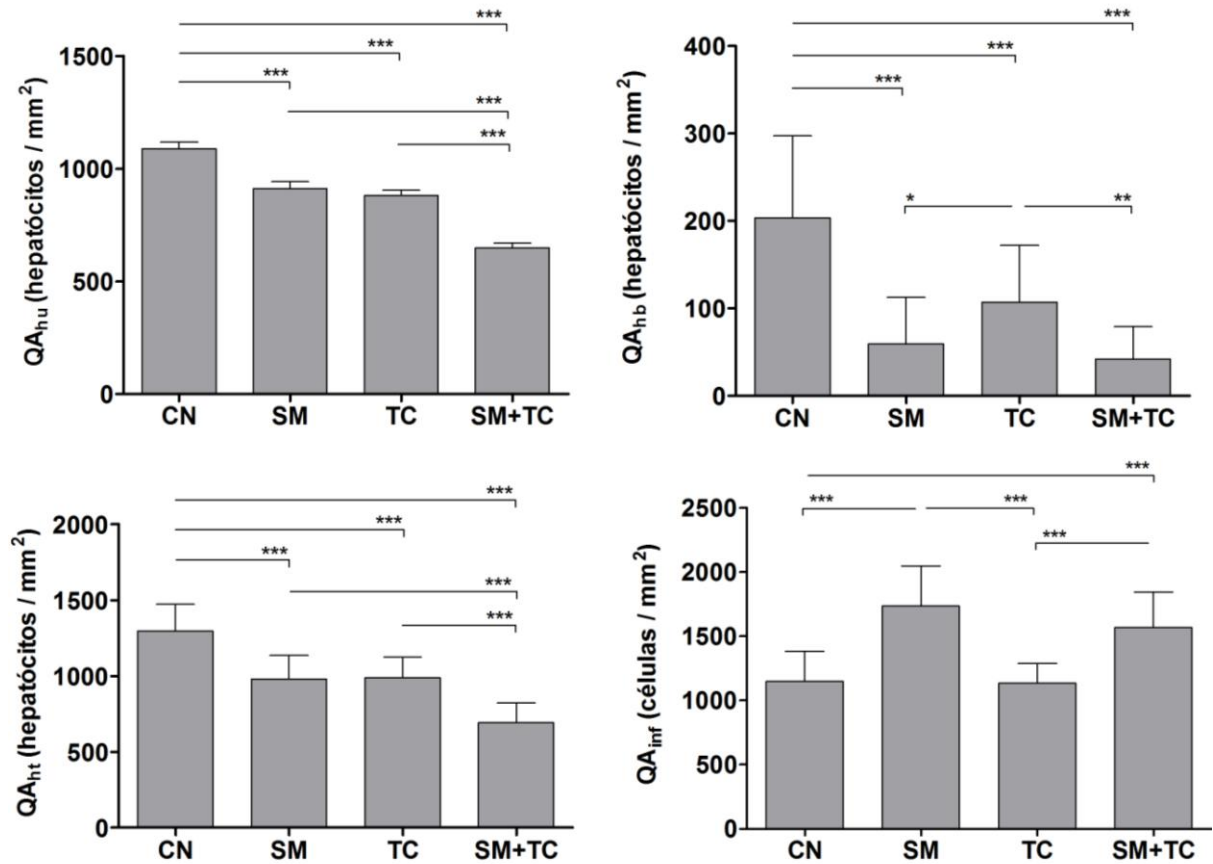
Notas: A caixa representa o intervalo interquartil com a mediana indicada (linha horizontal) e os bigodes representam os quartis superiores e inferiores. Diferença estatística entre os grupos ($*p < 0,05$; $**p < 0,001$; $***p < 0,0001$), teste de Kruskal-Wallis.

A densidade de número de hepatócitos uninucleados (QA_{hu} [hepatócitos/mm²]), binucleados (QA_{hb} [hepatócitos/mm²]) e totais

(QA_{ht} [hepatócitos/ mm^2]) encontra-se apresentada na Figura 18. Os animais infectados apenas com *T. cruzi* ou *S. mansoni* e aqueles coinfetados apresentaram diminuição do número de hepatócitos (QA_{hu} , QA_{hb} e QA_{ht}) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). A densidade de número de hepatócitos totais e uninucleados foi significativamente menor no grupo coinfetado comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Resultado similar foi encontrado no número de hepatócitos binucleados, exceto para o grupo infectado com *S. mansoni*, que não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo coinfetado ($p < 0,05$).

Os animais do grupo infectado apenas com *S. mansoni* e aqueles coinfetados apresentaram maior densidade de número de células intersticiais (QA_{inf} [células/ mm^2]) quando comparados aos animais não infectados e aqueles infectados apenas pelo *T. cruzi* ($p < 0,05$), os quais não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$). (Figura 18).

Figura 18 - Densidade de número de hepatócitos (QA_h) e células intersticiais (QA_{inf}) no fígado de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.

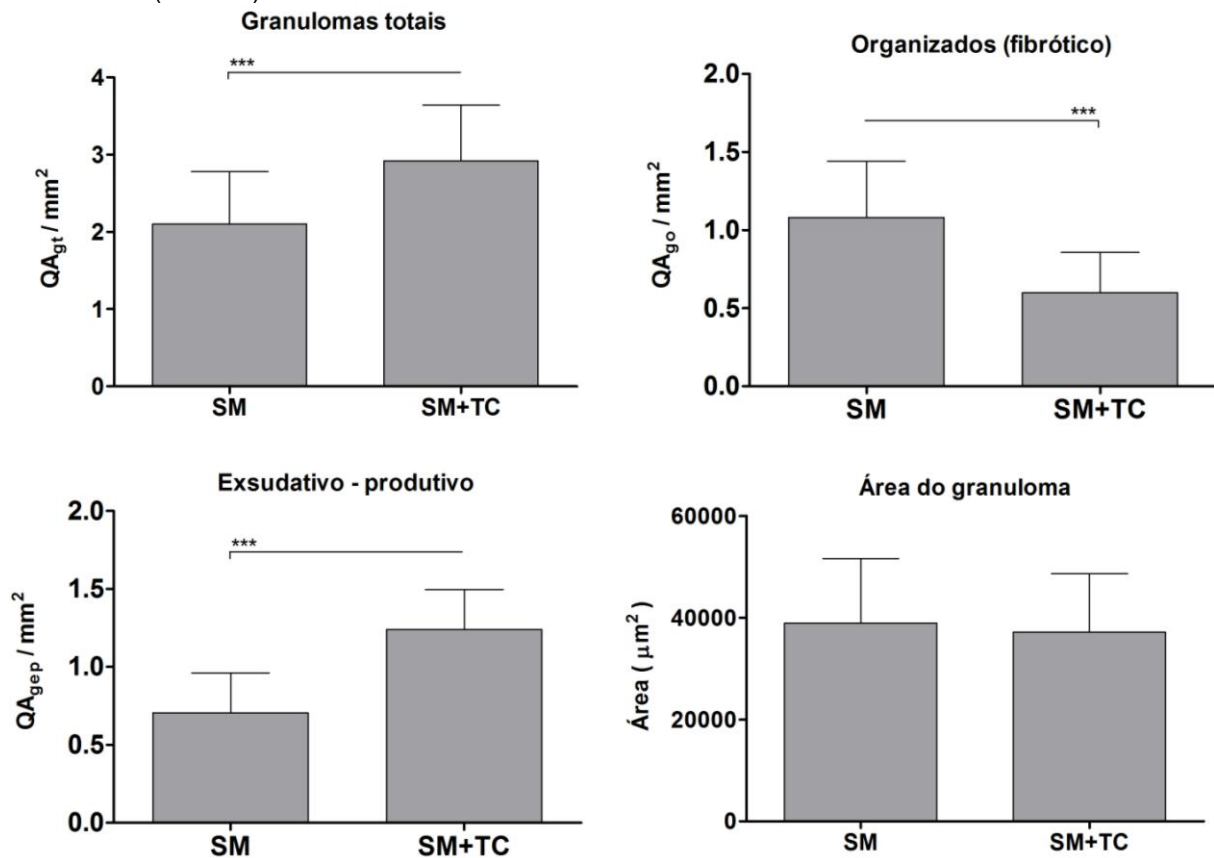


Notas: Hepatócitos uninucleados (QA_{hu}), binucleados (QA_{hb}) e totais (QA_{ht}). Diferença estatística entre os grupos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$), teste de Kruskal-Wallis.

8.7.2 Análise dos granulomas esquistossomóticos

Os resultados da análise dos granulomas dos animais infectados com *S. mansoni* e aqueles infectados com *S. mansoni* e *T. cruzi* encontram-se apresentados na Figura 19. Os animais coinfetados apresentaram maior número de granulomas comparado com os animais do grupo infectado com *S. mansoni*. Resultado similar foi observado para granulomas na fase exsudativo – produtivo ($p < 0,05$). Resultado inverso foi observado no número de granulomas organizados (fibróticos), os quais apresentaram maior número nos animais infectados apenas com *S. mansoni* ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos em relação à área dos granulomas.

Figura 19 - Densidade de número (QA) e área dos granulomas esquistosomóticos no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* (SM) e aqueles coinfectados com *T. cruzi* (SM+TC).

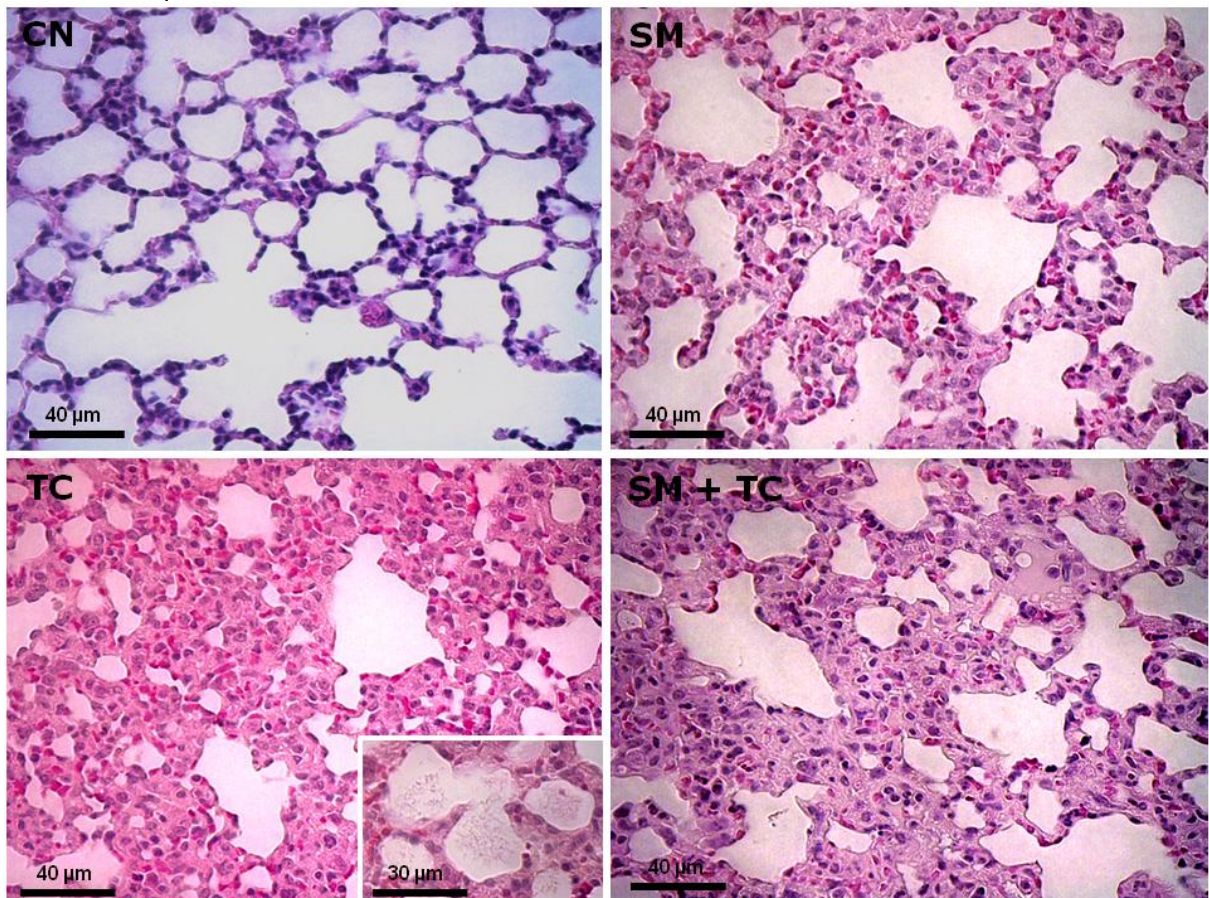


Notas: gt, granulomas totais; go, granulomas organizados (fibróticos); gep, granulomas exsudativo-produtivo. Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (***) $p < 0,0001$, teste t de *student*.

8.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR

Como observado na Figura 20, à análise histopatológica do tecido pulmonar em área remota aos granulomas demonstrou que os animais não infectados apresentaram morfologia normal, com septos alveolares delgados, alvéolos pulmonares e sacos alveolares bem definidos com luz evidente e ampla. Em todos os grupos infectados foi observado amplo remodelamento patológico pulmonar, com espessamento de septo alveolar, estreitamento da luz alveolar, alvéolos colapsados, congestão vascular e evidente infiltrado inflamatório difuso formado predominantemente por células mononucleares. As alterações histopatológicas foram mais pronunciadas nos animais infectados por *T. cruzi*, os quais também apresentaram acúmulo de exsudato alveolar fibrinoso.

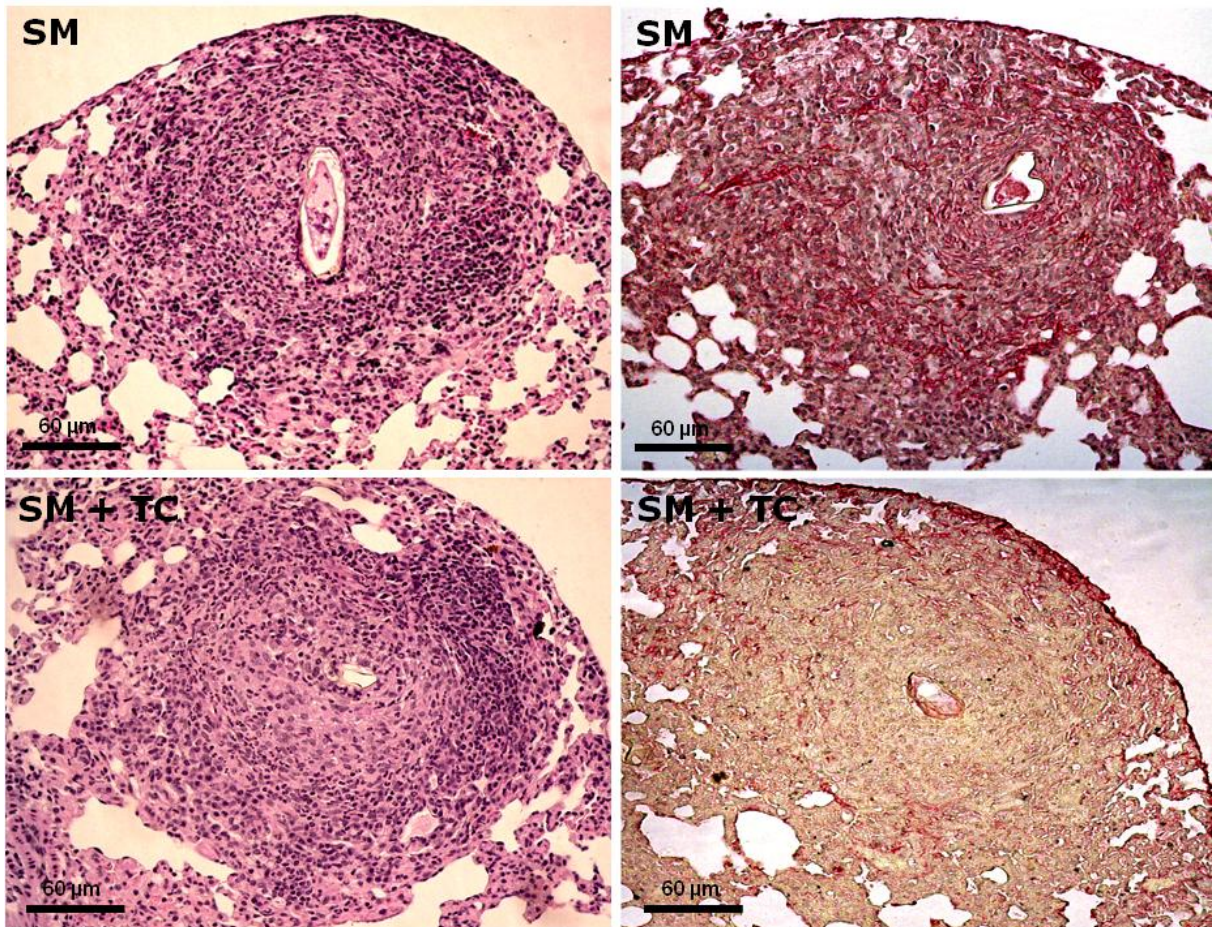
Figura 20 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.



Notas: Microscopia de campo claro (coloração: hematoxilina-eosina). CN) Animal não infectado, SM) Animal infectado com *S. mansoni*, TC) Animal infectado com *T. cruzi*, SM+TC) Animal infectado com *S. mansoni* e coinfestado com *T. cruzi*. Observe o espessamento do septo alveolar, redução do espaço alveolar e congestão vascular nos animais infectados, principalmente no grupo TC, o qual também apresentou alvéolos com exsudato fibrinoso (imagem em detalhe).

Os animais infectados apenas com *S. mansoni* e aqueles coinfetados por *T. cruzi* apresentaram granulomas esquistossomóticos evidentes distribuídos difusamente no tecido pulmonar. Foi observado intenso processo inflamatório formado por células mononucleares e polimorfonucleares concentradas principalmente ao redor dos granulomas esquistossomóticos. Fibrose pulmonar foi mais evidente em granulomas de animais infectados apenas pelo *S. mansoni* comparado aos granulomas de animais coinfetados por *T. cruzi* (Figura 21).

Figura 21 - Fotomicrografias representativas dos granulomas esquistossomóticos no tecido pulmonar de camundongos infectados com *S. mansoni* (SM) e aqueles coinfetados com *T. cruzi* (SM+TC).



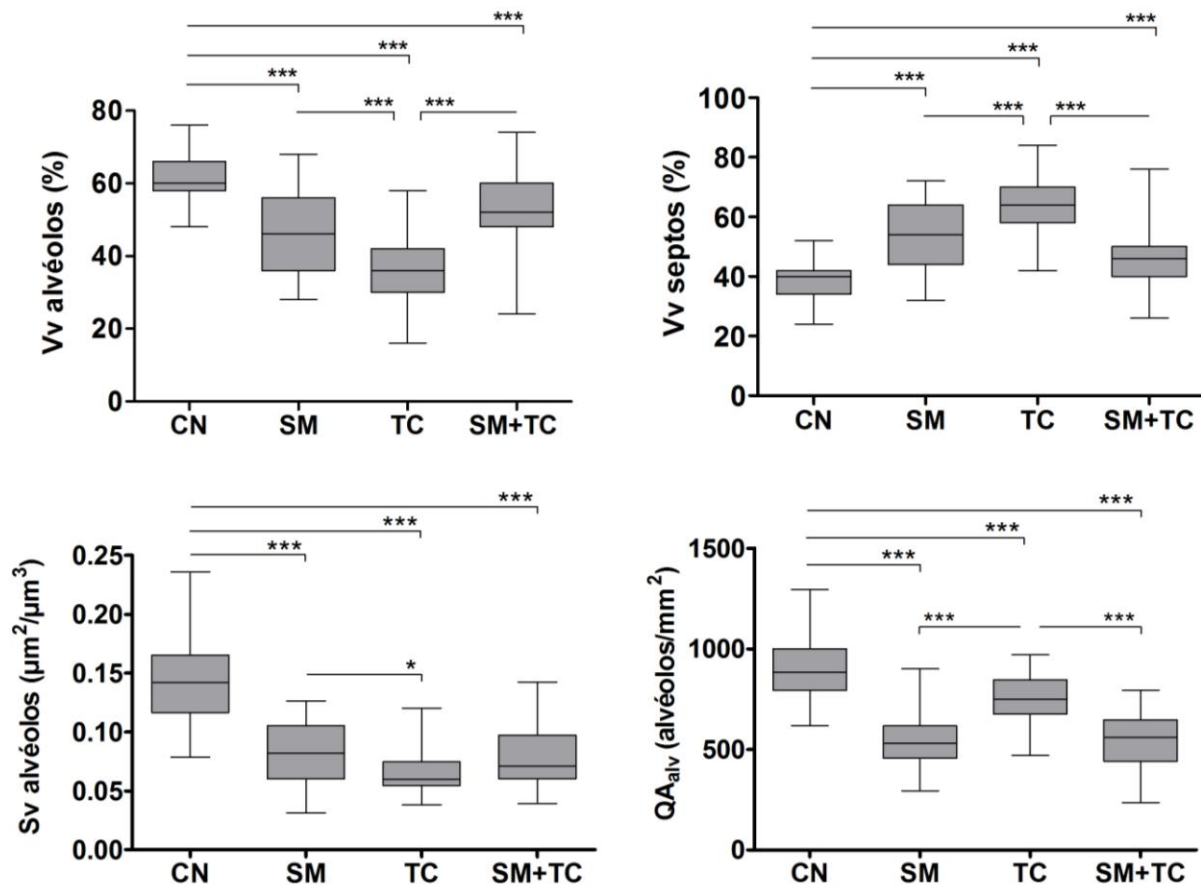
Notas: Microscopia de campo claro (coloração: imagens à esquerda hematoxilina-eosina; imagens à direita Sirius red). SM) Animal infectado com *S. mansoni*, SM+TC) Animal infectado com *S. mansoni* e coinfetado com *T. cruzi*. À esquerda, observa-se intensa celularidade do granuloma que se organiza ao redor do ovo de *S. mansoni*. À direita, observa-se que a deposição de fibras colágenas (marcadas em vermelho) foi menos pronunciada no granuloma do animal coinfetado.

8.8.1 Parâmetros estereológicos do tecido pulmonar

Os resultados da análise estereológica do tecido pulmonar encontram-se apresentados na Figura 22. Todos os grupos apresentaram redução significativa da densidade de volume de alvéolos pulmonares (V_v alvéolos [%]) e aumento significativo densidade de volume de septos alveolares (V_v septo [%]) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Enquanto a densidade de alvéolos diminuiu, houve aumento da densidade de septos nos animais do grupo TC em relação aos animais dos grupos SM e SM+TC ($p < 0,05$), os quais não apresentaram diferença entre si.

A densidade de superfície (Sv alvéolos [$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$]) e número (QA [alvéolos/ mm^2]) de alvéolos diminuiu significativamente em todos os animais infectados quando comparados aos animais controle ($p < 0,05$). Os animais infectados por *T. Cruzi* apresentaram redução significativa da densidade de superfície de alvéolos e aumento da densidade de número de alvéolos comparado aos animais infectados pelo *S. mansoni* ($p < 0,05$). Esse aumento também foi identificado em relação ao grupo coinfectado ($p < 0,05$). (Figura 22).

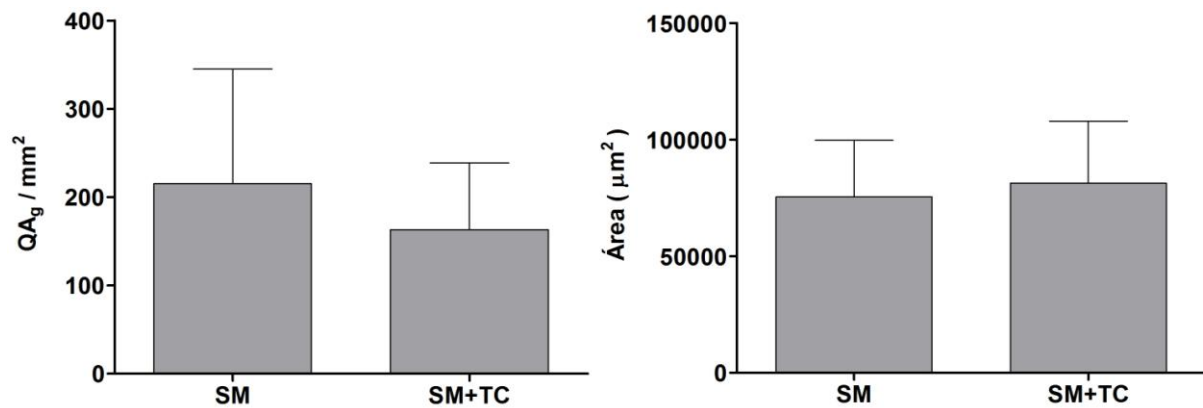
Figura 22 - Parâmetros estereológicos do parênquima e estroma pulmonar de camundongos não infectados e aqueles infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni*.



Notas: Vv, densidade de volume; Sv, densidade de superfície; QA_{alv}, densidade de número de alvéolos pulmonares. A caixa representa o intervalo interquartil com a mediana indicada (linha horizontal) e os bigodes representam os quartis superiores e inferiores. Diferença estatística entre os grupos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$), teste de Kruskal-Wallis.

A área do granuloma no tecido pulmonar foi semelhante em ambos os grupos infectados pelos *S. mansoni*. (Figura 23).

Figura 23 - Densidade de número (QA_g) e área dos granulomas no tecido pulmonar de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e aqueles coinfectedados por *T. cruzi*.

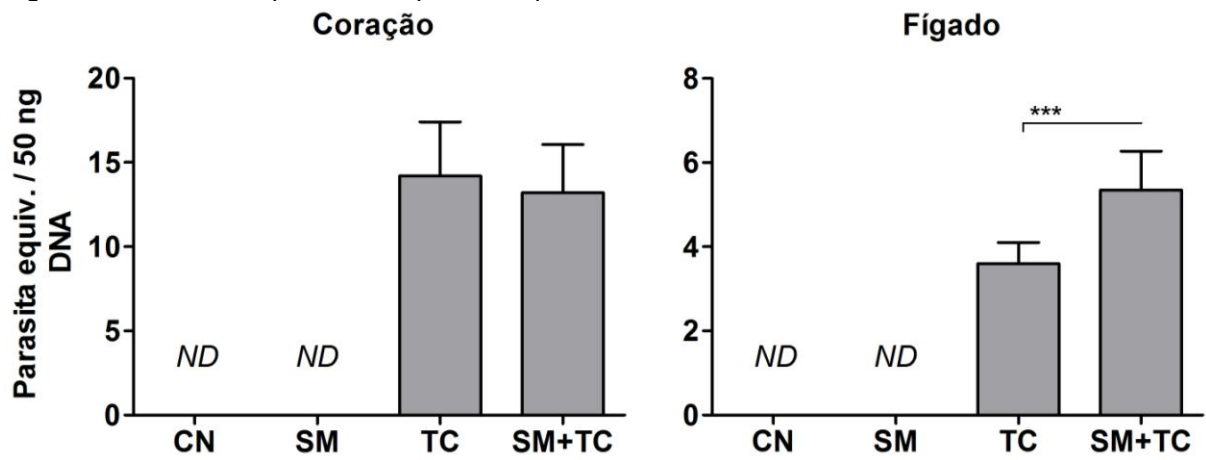


Notas: Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), teste t de *student*.

8.9 ANÁLISE DO PARASITISMO TECIDUAL POR PCR

Os resultados da quantificação do parasitismo tecidual encontram-se apresentados na Figura 24. No tecido cardíaco não houve diferença entre os grupos infectados com *T. cruzi* e coinfectedado com *S. mansoni* e *T. cruzi*. No tecido hepático o parasitismo tecidual foi significativamente maior nos animais do grupo coinfectedado com *S. mansoni* e *T. cruzi* quando comparados com os animais do grupo infectado apenas com *T. cruzi* ($p < 0,05$).

Figura 24 - Análise do parasitismo por PCR quantitativo.



Notas: Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. *diferença estatística entre os grupos (** $p < 0,0001$), ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

9 DISCUSSÃO

Considerando uma possível interação entre perfis de respostas imunológica divergentes, o presente estudo investigou o impacto da coinfeção por *S. mansoni* e *T. cruzi* sobre o desenvolvimento das alterações patológicas da esquistossomose e doença de Chagas em modelo murino. Os resultados encontrados demonstraram que ambos os modelos experimentais desenvolveram manifestações patológicas semelhantes às aquelas observadas na doença humana, como a cardiomiopatia inflamatória na doença de Chagas (GOLGHER; GAZZINELLI, 2004; GUEDES et al., 2009), formação de granulomas no pulmão, fígado e fibrose hepática na esquistossomose (PEARCE; MACDONALD, 2002; CHUAH et al., 2014).

Corroborando a hipótese do estudo, a coinfeção com *S. mansoni* e *T. cruzi* modificou os desfechos patológicos típicos de cada processo infeccioso de maneira órgão-específica. Surpreendentemente, a coinfeção induziu repercussões positivas para a microarquitetura cardíaca, apesar de influenciar negativamente no controle da parasitemia nos animais infectados pelo *T. cruzi*. Por outro lado, os animais coinfectados apresentaram acentuada subversão da estrutura hepática, evidenciada por processo inflamatório e fibrose mais evidente em relação aos animais infectados apenas pelo *S. mansoni* ou *T. cruzi*. Embora as alterações patológicas tenham indicado uma interação complexa entre as infecções, essas alterações foram potencialmente influenciadas pela modulação antagônica da resposta imune induzida pelo *S. mansoni* e *T. cruzi*.

Têm sido sistematicamente demonstrado que a resposta imunológica do hospedeiro contra o *S. mansoni* ou *T. cruzi* constitui um mecanismo central no controle da carga parasitária, parasitismo tecidual e lesões dos órgãos alvo (DE MELO; COELHO, 2005; WILSON et al., 2007 JUNQUEIRA et al., 2010; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). No presente estudo, os animais com esquistossomose estabelecida, quando coinfectados por *T. cruzi* apresentaram parasitemia elevada e patente durante todo o experimento, indicando possíveis alterações no mecanismo imunológico de controle da infecção. Os mecanismos por meio dos quais infecções estabelecidas modulam a evolução de novas infecções causadas por diferentes microrganismos são complexos e pouco investigados. Entretanto, está bem estabelecido que a polarização da resposta imune para

fenótipos específicos como Th1 ou Th2 constitui fator determinante no controle das doenças infecciosas. A resposta Th1 é muito eficiente na eliminação de patógenos intracelulares, como por exemplo: *T. cruzi* (KUMAR; TARLETON, 2001; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012) enquanto a resposta Th2 é particularmente efetiva no combate aos patógenos extracelulares, como por exemplo: *S. mansoni* (PEARCE; MACDONALD, 2002; MAIZELS et al., 2009). Assim, admite-se que as interações entre as respostas Th1 e Th2 podem influenciar de forma decisiva na resistência ou susceptibilidade às coinfeções (COX, 2001; PEDERSEN; FENTON, 2007; SUPALI et al., 2010).

Essa proposição tem sido comprovada especialmente em coinfeções por microrganismos que determinam padrões marcantes e nitidamente distintos de polarização da resposta imune como *Bordetella pertussis* (Th1) (BRADY et al., 1999) e *S. mansoni* (Th2) (LOFFREDO-VERDE et al., 2015). Essa característica também é observada na doença de Chagas (Th1) (RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012) e fase crônica da esquistossomose (Th2) (MAIZELS et al., 2009), constituindo um modelo racional para investigar a influência de coinfeções por patógenos que determinam perfis polarizados e antagônicos de resposta imune. Dessa forma, a deficiência no controle da parasitemia dos animais coinfectados com *T. cruzi* observada no presente estudo pode estar ligada a menor habilidade desses animais para estabelecer uma resposta Th1. Caracteristicamente, as citocinas do perfil Th1 ou Th2 direcionam para o desenvolvimento de sua respectiva via, inibindo a expressão do padrão oposto. Deste modo, uma vez que na fase crônica da esquistossomose existe polarização da resposta imune para o padrão Th2, o fenótipo Th1 será inibido. Isso ocorre devido à regulação do nível de expressão de receptores de membrana, da expressão diferencial de fatores de transcrição e de mudanças epigenéticas secundárias à ativação celular (WILSON et al., 2007; MAIZELS et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2011; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). Essa modulação foi claramente evidenciada no presente estudo, no qual o nível de IFN- γ foi reduzido nos animais coinfectados, citocina típica da resposta Th1 (GUEDES et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2011).

Interessantemente, nossos resultados demonstraram que a modulação das citocinas séricas se estendeu para além da influência da coinfeção sobre os níveis de IFN- γ . Assim, os animais coinfectados também apresentaram redução dos níveis

de IL-4 comparados aos animais infectados apenas com o *T. cruzi*, citocina tipicamente superexpressa na fase aguda da doença de Chagas (TEIXEIRA et al., 2011). Estes resultados corroboram com estudos que mostraram que na fase crônica da esquistossomose há uma diminuição de IL-4 e um aumento de IL-10, o que está relacionado com o controle homeostático da resposta imunológica inata e mediada por células (BURKE et al., 2009; FAIRFAX et al., 2012). Achado semelhante ocorreu para a citocina IL-5. Têm sido descrito que a IL-5 é expressa na fase aguda e crônica da doença de Chagas, enquanto na esquistossomose ocorre uma queda na produção desta citocina relacionada com o aumento do número e atividade das células T regulatórias (Treg) na fase crônica da doença (MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003; TEIXEIRA et al., 2011). Todos os grupos infectados apresentaram aumento dos níveis de IL-2 quando comparados aos animais do grupo controle, entretanto, nos animais infectados apenas com o *T. cruzi*, o nível de IL-2 foi significativamente maior quando comparado com os animais infectados pelo *S. mansoni* e aqueles coinfectedos. Estudos sugerem que a IL-2 regula a expressão de IL-5 (CHEEVER et al., 1992; CHEEVER et al., 1993; BURKE et al., 2009). Assim, os achados do presente estudo indicaram uma relação entre a redução de IL-2 e IL-5 nos animais infectados pelo *S. mansoni* e aqueles coinfectedos, e uma relação entre o aumento de IL-2 e IL-5 nos animais do grupo TC. Tipicamente, animais na fase crônica da esquistossomose apresentam redução de IL-2, evento resultante de mecanismos regulatórios que atenuam os danos causados pela infecção em busca de um equilíbrio homeostático que mantém a infecção por tempo prolongado, conduzindo à sua cronificação (STAVITSKY, 2004). Por outro lado, alteração no nível de IL-2 não constitui uma manifestação típica na fase aguda da doença de Chagas (ARAÚJO-JORGE et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2011). Corroborando a hipótese do presente estudo, nosso resultado demonstrou que os animais infectados previamente com *S. mansoni* impediu que a infecção pelo *T. cruzi* aumentasse os níveis de IL-2. Os níveis de TNF- α , citocina típica da esquistossomose e doença de Chagas (HENRI et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2011), apresentou aumento significativo em todos os grupos infectados quando comparados com o grupo controle. Nesse contexto, os resultados encontrados reforçam a evidência que os animais com a fase crônica da esquistossomose modula a resposta imune do tipo Th1, essencial na proteção contra microrganismos

intracelulares, o que tem sido sistematicamente descrito em estudos prévios (MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003; TAYLOR et al., 2005; BURKE et al., 2009).

No presente estudo, foi adicionalmente investigado o efeito da coinfeção sobre os níveis plasmáticos de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*. Como esperado, os animais infectados apenas com *T. cruzi* e aqueles coinfectados apresentaram elevada reatividade plasmática de IgG anti-*T. cruzi*. Entretanto, a coinfeção atenuou a reatividade do isotipo IgG2b em relação aos animais infectados apenas pelo *T. cruzi*. Esses achados indicaram que a coinfeção com *S. mansoni* apresentou pouca influência sobre a magnitude da resposta humoral de fase aguda na doença de Chagas experimental. Embora a produção de IgG2a e IgG2b na resposta humoral contra o *T. cruzi* seja dominante, foi previamente relatada atividade lítica semelhante entre esses isotipos e IgG1, caracterizados como moléculas efetoras importantes para o controle da parasitemia na doença de Chagas (PYRRHO et al., 1998; BRYAN et al., 2010). Têm sido sistematicamente descrito que embora ambos os isotipos de IgG estejam envolvidos no controle da infecção, IgG2b é o principal isotipo envolvido no combate ao *T. cruzi* (POWELL & WASSOM, 1993; PYRRHO et al., 1998). Entretanto, considerando o perfil similar de reatividade de IgG1 e IgG2 em ambos os grupos infectados pelo *T. cruzi*, é pouco provável que a redução da reatividade de IgG2b e a magnitude do prejuízo na resposta humoral contra o *T. cruzi* sejam responsáveis pelo pior controle parasitológico e os danos patológicos nos órgãos de animais coinfectados. Assim, como a imunidade celular é o principal mecanismo envolvido no combate ao *T. cruzi* (GOLGHER; GAZZINELLI, 2004; DUTRA; GOLLOB, 2008; KAYAMA; TAKEDA, 2010), esses achados podem estar associados à disfunção nos mecanismos celulares inatos e específicos que controlam a infecção, proposição que não foi investigada e necessita de estudos adicionais para ser comprovada ou refutada.

Têm sido descrito que a resposta inflamatória disparada pelo *T. cruzi*, apesar de controlar a parasitemia, é a principal causa de danos teciduais associados ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica (GOLGHER; GAZZINELLI, 2004; GUEDES et al., 2009; JUNQUEIRA et al., 2010). Como esperado, a infecção por *T. cruzi* induziu redução da densidade de volume de cardiomiócitos, aspecto potencialmente associado à morte celular decorrente da cardiomiocitólise que invariavelmente ocorre ao final do processo de replicação intracelular das células

parasitada (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2009; BONNEY; ENGMAN, 2010). Além disso, o aumento da densidade de volume do tecido conjuntivo e dos vasos intramiocárdicos sugere um processo reativo compensatório do estroma em resposta à lesão do parênquima cardíaco.

Embora a coinfeção tenha influenciado negativamente no controle da parasitemia, efeito oposto foi observado sobre a estrutura do coração, a qual apresentou atenuação do remodelamento patológico (ex: peso relativo, inflamação [Q_{Ainf}], hipertrofia de cardiomiócitos [V_v e S_v cm^2], expansão conjuntiva [V_v conjuntivo] e vascular [V_v vasos]) em relação aos animais infectados apenas com *T. cruzi*. Considerando a redução dos níveis de $IFN-\gamma$, esses resultados estão potencialmente relacionados à resposta imune do hospedeiro frente a infecções causadas por helmintos, que pode representar um fator protetor ao hospedeiro contra os danos cardíacos causados pela exacerbada resposta Th1 induzida pelo *T. cruzi* (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; RUTITZKY; HERNANDEZ; STADECKER, 2001). Esses achados são reforçados pela redução do processo inflamatório cardíaco observado nos animais coinfectados, os quais podem estar relacionados com a fase crônica da esquistossomose, na qual a formação dos granulomas ocorre simultaneamente ao desenvolvimento de um perfil imunológico antiinflamatório que se estabelece para restringir os danos teciduais típicos da infecção (PEARCE, 2005; RUTITZKY; HERNANDEZ; STADECKER, 2001). Embora esses achados pareçam divergentes, não existe consenso sobre uma relação direta entre parasitemia, parasitismo e lesão cardíaca no curso da doença de Chagas. Assim, apesar das evidências demonstrando correlação direta entre a carga parasitária e a severidade cardiomiopatia (JONES et al., 1993; GUTIERREZ et al., 2009; MARINHO et al., 1999), o oposto também se mostrou verdadeiro, de modo que lesões cardíacas graves também foram identificadas mesmo em processo infeccioso com baixa parasitemia (BILATE; CUNHA-NETO, 2008).

No presente estudo, a análise estereológica indicou extenso remodelamento patológico do fígado em ambos os grupos infectados. Esse achado foi consistente com os danos teciduais tipicamente causados pela esquistossomose (LENZI et al., 2008; ANDRADE, 2009). Além disso, a infecção por *T. cruzi* também foi capaz de induzir danos morfológicos hepáticos evidentes, os quais foram menos severos em áreas teciduais remotas ao granuloma em animais infectados apenas com *S.*

mansoni e naqueles coinfetados. Assim, esses achados indicaram um perfil de remodelamento microestrutural heterogêneo entre os grupos, em que a extensa reorganização patológica do parênquima e estroma hepático perigranulomatoso ocorre simultaneamente em áreas teciduais relativamente preservadas distantes dos granulomas. Considerados em conjunto, os achados histopatológicos e estereológicos indicaram que as principais adaptações da microestrutura hepática são consistentes com intenso infiltrado inflamatório e marcante hipertrofia de hepatócitos, aspecto evidenciado pelo aumento ou manutenção da densidade de volume dessas células simultaneamente à redução da densidade de número das mesmas. Embora a redução do dano cardíaco tenha ocorrido nos animais coinfetados, achados opostos foram observados no fígado desses animais, que além dos granulomas esquistossomóticos, apresentaram severa hipertrofia hepática, processo inflamatório e fibrose tecidual.

Diversos estudos têm descrito consequências negativas das coinfeções envolvendo *S. mansoni* e vírus sobre o tecido hepático (EDWARDS et al., 2005; GASIM; BELLA; ADAM, 2015; LOFFREDO-VERDE et al., 2015). Existem evidências de que em algumas coinfeções envolvendo helmintos, vírus e bactérias, há uma diminuição da resposta imunológica protetora, com repercussões diretas sobre a lesão hepática e a sobrevivência do hospedeiro (BRADY et al., 1999; EDWARDS et al., 2005; LAYLAND; SPECHT, 2014; SU et al., 2014; LOFFREDO-VERDE et al., 2015). Em estudo prévio com modelo murino, a coinfeção pelo *S. mansoni* e choriomeningitis vírus aumentou consideravelmente a susceptibilidade do fígado à replicação viral, tendo como consequência a amplificação do dano tecidual (EDWARDS et al., 2005). Em outro estudo, a infecção por *Heligmosomoides polygyrus* e *S. mansoni* estimulou a reativação de γ -herpesvirus (REESE et al., 2014). BRADY et al. (1999) mostraram que a resposta Th1, importante na defesa do hospedeiro contra a bactéria *Bordetella pertussis*, foi suprimida em animais coinfetados com *Fasciola hepática*. Além disso, estudos prévios sugeriram que o *S. mansoni* e *S. haematobium* exercem efeito protetor no desenvolvimento da malária e no dano hepático que se desenvolve ao longo da evolução da doença (LEMAITRE et al., 2013; NACHER, 2011). Em todos os casos citados acima, existem evidências de que os efeitos observados na coinfeção são decorrentes da diminuição dos níveis

de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ (BRADY et al., 1999; MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003; EDWARDS et al., 2005; REESE et al., 2014).

Considerando que o controle do dano tecidual na fase crônica da esquistossomose está diretamente relacionado à instalação de uma imune regulatória, parece realista inferir que os danos hepáticos pronunciados nos animais coinfetados estão potencialmente associados à resposta pró-inflamatória antagônica do tipo Th1 estimulada pelo *T. cruzi*. Nesse contexto, mesmo em baixos níveis, uma resposta pró-inflamatória poderia ser suficiente para recrutar células inflamatórias para o tecido hepático, aumentando a captação de parasitos circulantes por macrófagos residentes e a retenção de antígenos capazes de ativar a resposta imune local, diretamente envolvida no remodelamento patológico hepático (UMEKITA et al., 1999; SARDINHA et al., 2010). Assim, é possível que o agravamento da lesão hepática esteja associado a maior retenção de antígenos do *T. cruzi* no fígado dos animais coinfetados, aspecto que deve ser confirmado em estudos futuros. Acredita-se que devido à especificidade associada à ativação das células da resposta imune inata, a infecção pelo *S. mansoni* pode ativar de forma cruzada, especialmente em macrófagos, os mecanismos associados ao reconhecimento de antígenos, culminando em maior retenção antigênica hepática e ativação regional da resposta imunológica (EDWARDS et al., 2005). Embora esse mecanismo não possa ser confirmado no presente estudo, existem evidências *in vivo* de que macrófagos de animais reinfetados pelo *T. cruzi* apresentam maior habilidade de captar e processar antígenos, fenômeno associado à ativação prévia dessas células durante a evolução da infecção de base (SARDINHA et al., 2010). Entretanto, maior retenção antigênica mediada pela ativação prévia de macrófagos não garante a eficácia dessas células contra o *T. cruzi*, uma vez que na fase crônica da esquistossomose predominam macrófagos alternativamente ativados no fígado (HERBERT et al., 2004; MAIZELS et al., 2009). Na via alternativa de ativação de macrófagos ocorre o desvio da L-arginina para a via metabólica da enzima arginase-1, que leva a produção de L-ornitina e ureia no lugar de óxido nítrico (NO), sintetizado a partir da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) superexpressa na via clássica de ativação dos macrófagos (HERBERT et al., 2004; STEMPIN et al., 2010). Assim, a modificação fenotípica desses macrófagos alternativamente ativados compromete a produção do NO, molécula essencial para a atividade

antimicrobiana dessas células, especialmente contra o *T. cruzi* (MAIZELS et al., 2009; STEMPIN et al., 2010). Dessa forma, a deficiência antimicrobiana desses macrófagos pode contribuir para maior parasitismo hepático, com consequente amplificação do dano hepático induzido pelo *T. cruzi*, especialmente fibrose tecidual. Assim, no presente estudo foi investigado os níveis de óxido nítrico no coração e fígado dos animais. Corroborando nossa hipótese, nossos resultados demonstraram que no fígado, órgão afetado pela reação inflamatória granulomatosa ao redor dos ovos de *S. mansoni*, houve diminuição dos níveis de óxido nítrico e consequentemente maior parasitismo hepático nos animais do grupo coinfectado. No coração, órgão não afetado pela esquistossomose, não houve diferença nos níveis de óxido nítrico e parasitismo entre os grupos.

Acredita-se que devido a secreção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β , o perfil antiinflamatório desses macrófagos caracteriza uma função primária de estimular o reparo tecidual, no lugar de promover a morte de microrganismos (MAIZELS et al., 2009; STEMPIN et al., 2010).

Além do coração e fígado, todos os animais infectados apresentaram alterações patológicas da microestrutura pulmonar, evidenciadas pela drástica redução da densidade de volume, densidade de número e de área de superfície dos alvéolos pulmonares, bem como aumento da densidade de volume de septos alveolares, características indicativas de espessamento septal secundário à instalação de processo inflamatório e edema pulmonar. As lesões pulmonares decorrentes da esquistossomose têm sido sistematicamente investigadas (ANDRADE, 2008). Entretanto, são escassos os estudos sobre a influência da infecção pelo *T. cruzi* na estrutura e função do pulmão (MELNIKOV et al., 2005), constituindo uma área de investigação negligenciada.

Existem limitadas evidências que o *T. cruzi* é capaz de parasitar o tecido pulmonar, desencadeando processos inflamatórios persistentes capazes de comprometer a estrutura microscópica pulmonar. Ao investigar o tecido pulmonar de camundongos infectados pela cepa Mexicana de *T. cruzi*, Melnikov et al (2005), identificaram ninhos de amastigotas no parênquima e estroma pulmonar, condição associada à intenso processo inflamatório local, edema pulmonar e estreitamento do espaço alveolar. No presente estudo, os animais coinfectados apresentaram atenuação da lesão pulmonar nas áreas remotas do granuloma comparado aos

animais infectados apenas por *T. cruzi*. Entretanto, a coinfeção não foi capaz de modificar a densidade de número e a área dos granulomas nos grupos infectados pelo *S. mansoni*. Assim como no coração, é possível que o microambiente molecular sistêmico e regional que se instala durante a evolução da esquistossomose seja desfavorável ao parasitismo tecidual por *T. cruzi*, de modo a garantir uma maior preservação do tecido pulmonar remoto aos granulomas sem, no entanto, interferir na formação dos granulomas esquistossomótico pulmonares.

Considerados em conjunto, os resultados do presente estudo indicaram uma interação complexa entre a infecção pelo *S. mansoni* e *T. cruzi*. Essa interação modificou o desfecho patológico típico da esquistossomose e doença de Chagas, determinando modificações profundas nos níveis de citocinas plasmáticas, com repercussões variáveis no processo inflamatório e remodelamento morfológico cardíaco, hepático e pulmonar. A coinfeção mostrou-se benéfica ao reduzir a severidade da cardiomiopatia chagásica e a lesão pulmonar em áreas remotas ao granuloma esquistossomótico, achado potencialmente relacionado à atenuação da resposta imunológica Th1 e do dano secundário causado pela instalação de uma resposta inflamatória tecidual exacerbada. Por outro lado, as lesões hepáticas foram acentuadas, indicando que os mecanismos associados à resistência e susceptibilidade às coinfeções são órgão-dependentes, variabilidade que deve ser considerada para consolidar o conhecimento sobre a patogênese dessas coinfeções e no delineamento racional de estratégias antiparasitárias.

REFERÊNCIAS

- ABEL, L. C. J. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of autoimmunity**, v. 17, n. 1, p. 99–108, ago. 2001.
- ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 493–502, 1 jan. 2004.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 9, p. 1135–43, 1 nov. 2004.
- ANDRADE, Z. A. A Patologia da Esquistossomose Humana. In: **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20. ed. Rio de Janeiro: editora fiocruz, 2008. p. 547–568.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 656–663, 2009.
- ARAÚJO-JORGE, T. et al. Implication of transforming growth factor – beta 1 in Chagas disease myocardiopathy. **J. infec. dis.**, v. 186, p. 1823–1828, 2002.
- BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3515–3519, 15 set. 2006.
- BARTHOLOMEU, D. C. et al. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 1333–44, 15 jul. 2008.
- BILATE, A. M. B.; CUNHA – NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of na old disease. **Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 67 – 74, 2008.
- BIRARO, I. A. et al. Impact of Co-Infections and BCG Immunisation on Immune Responses among Household Contacts of Tuberculosis Patients in a Ugandan Cohort. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111517, 2014.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? **National institutes of health**, v. 8, n. 6, p. 510–518, 2010.
- BORASCHI, D. et al. Immunity against HIV/AIDS, malaria, and tuberculosis during co-infections with neglected infectious diseases: recommendations for the European Union research priorities. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, p. e255, 2008.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye- binding. **Anal Biochemics**, v. 72, n. 7, p. 248–254, 1976.

BRADY, M. T. et al. Fasciola hepatica Suppresses a Protective Th1 Response against *Bordetella pertussis*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 10, p. 5372–5378, 1999.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico**. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, v. 46 ,n.21, p.1-9, 2015.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389–96, 1962.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163–176, 2009.

CAETANO, B. C. et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 4, p. 1903–11, 15 ago. 2011.

CALDAS, I. R. et al. Human *schistosomiasis mansoni*: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 109–17, 2008a.

CALDAS, I. S. et al. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitology Res**, v. 103, p. 413–421, 2008b.

CAMPOS, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 416–23, 1 jul. 2001.

CARVALHO, E. M.; SANTOS, S. B.; JESUS, A. M. A Resposta Imune no Contexto das Co-infecções Associadas à Esquistossomose. In: **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 717–730.

Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 17 set. 2015.

CHEEVER, A. et al. Treatment with anti – IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni* – infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. **The Journal of immunology**, v. 148, p. 3244–3248, 1992.

CHEEVER, A. et al. *Shistosoma Japonicum* – infected mice show reduced hepatic fibrosis and eosinophilia and selective inhibition of interleukin – 5 secretion by CD4+

cells after treatment with anti-interleukin-2 antibodies. **Infection and immunity**, v. 61, p. 1288–1292, 1993.

CHIODINI, P. Chemotherapy for patients with multiple parasitic infections. **Parasitology**, v. 122, p. S83–S89, 2001.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141–150, 2014.

CLERINX, J.; VAN GOMPEL, A. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 6–24, 2011.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–64, 28 jun. 2014.

COURA, J. R. Tripanossomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 30–33, 2003.

COUTINHO, E. M. et al. Manson's schistosomiasis in the undernourished mouse: some recent findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 359–366, jul. 2010.

COX, F. E. Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitology**, v. 122 Suppl, p. S23–S38, 2001.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 53–59, 2003.

DE MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 193 – 212.

DE MELO, E. V. et al. A comparative cross-sectional study on the prevalence and morbidity of schistosomiasis in a community in northeastern Brazil (1979-2010). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 340–344, jun. 2014.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International journal of cell biology**, v. 2010, jan. 2010.

DUNNE, D. W.; COOKE, A. A worm 's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. May, p. 420–426, 2005.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 3, p. 287–92, jun. 2008.

EDWARDS, M. J. et al. Reciprocal Immunomodulation in a Schistosome and Hepatotropic Virus Coinfection Model. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 10, p. 6275–6285, 4 nov. 2005.

ELOI-SANTOS, S. M. et al. Idiotypic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 84, n. 3, p. 1028–31, set. 1989.

FAIRFAX, K. C. et al. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002490, jan. 2012.

GASIM, G. I.; BELLA, A.; ADAM, I. Schistosomiasis , hepatitis B and hepatitis C. **Virology journal**, v. 12, p. 4–9, 2015.

GENARO, O.; BRENER, Z.; COELHO, P. M. *Schistosoma mansoni*: immunodepression of hepatic schistosome granuloma formation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 1, p. 35–37, 1986.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, p. 399–409, 2004.

GRIFFITHS, E. C. et al. Analysis of a summary network of co-infection in humans reveals that parasites interact most via shared resources. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 281, n. 1782, p. 20132286, 2014.

GUEDES, P. M. M. et al. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 130, n. 1-2, p. 43–52, 15 jul. 2009.

GUIMARÃES, R. J. P. S. et al. Use of indicator kriging to investigate schistosomiasis in minas gerais state, Brazil. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, p. 837428, jan. 2012.

GÜRTLER, R. E. et al. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 1, p. 69–82, jan. 2007.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite immunology**, v. 31, p. 673–685, 2009.

HENRI, S. et al. Cytokine Regulation of Periportal Fibrosis in Humans Infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ Is Associated with Protection Against Fibrosis and TNF- α with Aggravation of Disease. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 929–936, 15 jul. 2002.

HERBERT, D. R. et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, v. 20, n. 5, p. 623–635, 2004.

HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3157–66, 1 mar. 2004.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the Dangers of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6406–6416, 15 jun. 2000.

HOTEZ, P. et al. Control of NTDs. **New England Journal of Medicine**, n. 357, p. 1018–1027, 2007.

HSIEH, Y.; FU, C.; HSIEH, M. H. Helminth-Induced Interleukin-4 Abrogates Invariant Natural Killer T Cell Activation-Associated Clearance of Bacterial Infection. **Infection and immunity**, v. 82, n. 5, p. 2087–2097, 2014.

JANSEN, A. M. et al. A ecologia e a complexidade dos ciclos de Transmissão do *Trypanosoma cruzi* na natureza. In: **Doença de Chagas: Manual para experimentação animal**. 20. ed. Rio de Janeiro: editora fiocruz, 2000. p. 32–38.

JONES, E. M. et al. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 48, p. 348–357, 1993.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 12, n. September, p. e29, jan. 2010.

JUNQUEIRA, L. C. ; JUNQUEIRA, L. M. M. . **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistose, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38–41, fev. 2003.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 303–308, 2000.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and infection**, v. 12, n. 7, p. 511–517, 2010.

KING, C. L. et al. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 7, p. 3578–84, 1 abr. 1998.

KIPNIS, T. L. et al. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 1, p. 602–605, jan. 1981.

KJOS, S. A et al. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. **Veterinary parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 249–56, 15 abr. 2008.

KRETTLI, A. U. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 142–51, jul. 2009.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite immunology**, v. 20, n. 5, p. 207–16, maio 1998.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4596–4603, 1 abr. 2001.

LA FLAMME, A. C.; SCOTT, P.; PEARCE, E. J. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. **Parasite immunology**, v. 24, n. 7, p. 339–45, jul. 2002.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422–35, jul. 2010.

LAUCELLA, S. et al. Frequency of interferon-gamma-producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas. **Journal of infection disease**, v. 189, p. 909–918, 2004.

LAYLAND, L. E.; SPECHT, S. Helpful or a Hindrance: Co-infections with Helminths During Malaria. In: **How Helminths Alter Immunity to Infection, Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York: Springer Science & Business Media New York, 2014. v. 828p. 99–129.

LEMAITRE, M. et al. Coinfection with Plasmodium falciparum and *Schistosoma haematobium*: Additional Evidence of the Protective Effect of Schistosomiasis on Malaria in Senegalese Children. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 2, p. 329–334, 2013.

LENZI, H. L. et al. Patologia Experimental com Enfoque no Granuloma Esquistossomótico. In: **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20. Ed ed. Rio de Janeiro: editora fiocruz, 2008. p. 569–654.

LESCURE, F.-X. et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 8, p. 556–70, ago. 2010.

LEVY, M. Z. et al. Periurban *Trypanosoma cruzi*-infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 9, p. 1345–52, set. 2006.

LINS, R. A. B. et al. [Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 173–8, 2008.

LOFFREDO-VERDE, E. et al. Schistosome infection aggravates HCV-related liver disease and induces changes in the regulatory T-cell phenotype. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 2, p. 97–104, 2015.

LÓPEZ, A. F.; MORENO, M. M.; SANDERSON, C. J. The lysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by eosinophils and neutrophils. **International journal for parasitology**, v. 8, n. 6, p. 485–489, dez. 1978.

M. H. DA SILVA, A. I. M. H. A. T. A. P. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Experimental parasitology**, v. 52, n. 1, p. 137–46, ago. 1981.

MAIZELS, R. M. et al. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature**, v. 365, p. 797–805, 1993.

MAIZELS, R. M. et al. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 10, p. 2059–2066, 2009.

MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHSI, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 9, p. 733–744, 2003.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. 1. Ed. ed. Rio de Janeiro: EDUERJ, 1995.

MARINHO, C. R. et al. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 308–318, 1999.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M. et al. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* in a hyper-endemic area of Colombia reveals an overlap among domestic and sylvatic cycles of Chagas disease. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 108, jan. 2014.

MELNIKOV, V. G. et al. Pathologic Changes in lungs caused by mexican isolates of *Trypanosoma cruzi* in the acute phase of infection in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 301–306, 2005.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 3, p. 1–11, 1991.

NACHER, M. Interactions between worms and malaria: good worms or bad worms? **Malaria Journal**, v. 10, p. 259, 2011.

NÓBREGA, A. A et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–5, abr. 2009.

NOVAES, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

OLIVEIRA, A.-C. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 9, p. 5688–5696, 1 nov. 2004.

OSADA, Y.; KANAZAWA, T. Schistosome: its benefit and harm in patients suffering from concomitant diseases. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, n. Table 1, p. 264173, jan. 2011.

OSBORNE, L. C. et al. Virus-helminth coinfection reveals a microbiota-independent mechanism of immunomodulation. **Science**, v. 345, n. 6169, p. 578–582, 2014.

OTTESEN, E. A. et al. The acquisition and loss of antigen-specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man. **Clin Exp Immunol**, v. 33, p. 37–47, 1978.

OTTESEN, E. A.; WELLER, P. F.; HECK, L. Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis. **Immunology**, v. 33, p. 413–421, 1977.

PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite immunology**, v. 27, n. 7-8, p. 265–70, 2005.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, 2002.

PEDERSEN, A. B.; FENTON, A. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 3, p. 133–139, 2007.

PORDEUS, L. C. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 3, p. 163–175, set. 2008.

RAMOS, R. P. **Infecção esquistossomótica aguda: Produção de citocinas em camundongos desnutridos e deficientes em iNOS**. [s.l.] Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, 2007.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease : pathophysiologic mechanisms , prognostic factors and risk stratification. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 152–158, 2009.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RAY, K. et al. Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 333–40, maio 2009.

REESE, T. A. et al. Helminth infection reactivates latent γ -herpesvirus via cytokine competition at a viral promoter. **Science**, v. 345, n. 6196, p. 573–577, 2014.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 48, n. 5, p. 637–44, maio 1993.

REIS, L. F. et al. Quantitative and Qualitative Interferences of Pentoxifylline on Hepatic *Schistosoma mansoni* Granulomas : Effects on Extracellular Matrix and Eosinophil Population. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 107–112, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

RICHTER, J. et al. Severe liver fibrosis caused by *Schistosoma mansoni*: management and treatment with a transjugular intrahepatic portosystemic shunt. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 15, p. 731–737, 2015.

RIZZARDINI, G. et al. The cost of HIV disease in Northern Italy: the payer's perspective. **J. Acq. Imm. Def. Syndr**, v. 57, p. 211–217, 2011.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 507874, jan. 2012.

RODRIGUEZ, A M. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. **Infection and immunity**, v. 31, n. 2, p. 524–529, fev. 1981.

RUTITZKY, L. I.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 13243–13248, 6 nov. 2001.

SALAZAR-CASTAÑÓN, V. H.; LEGORRETA-HERRERA, M.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Helminth parasites alter protection against Plasmodium infection. **BioMed research international**, v. 2014, p. 913696, 2014.

SANTOS, E. C. et al. Concomitant Benznidazole and Suramin Chemotherapy in Mice Infected with a Virulent Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 1–8, 2015.

SARDINHA, L.; ELIAS, R. Contribution of NK, NK T, $\gamma\delta$ T, and $\alpha\beta$ T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 74, n. 4, p. 2031–42, abr. 2006.

SARDINHA, L. R. et al. The Liver Plays a Major Role in Clearance and Destruction of Blood Trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* Chronically Infected Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. e578, 2010.

SCHMUNIS, G. A; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14–21, 2010.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583–8, dez. 2006.

SHODA, L. K. et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. **Infection and immunity**, v. 69, n. 4, p. 2162–71, abr. 2001.

SILVA, G. K. et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 3, p. 1148–52, 1 fev. 2010.

STAVITSKY, A. B. MINIREVIEW Regulation of Granulomatous Inflammation in Experimental Models of Schistosomiasis. **Infection and immunity**, v. 72, n. 1, p. 1–12, 2004.

STEMPIN, C. C. et al. Arginase in Parasitic Infections : Macrophage Activation , Immunosuppression , and Intracellular Signals. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 10, 2010.

STORDEUR, P. et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. 2002.

SU, L. et al. Coinfection with an intestinal helminth impairs host innate immunity against *Salmonella enterica* serovar typhimurium and exacerbates intestinal inflammation in mice. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3855–3866, 2014.

SUPALI, T. et al. Polyparasitism and its impact on the immune system. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 10, p. 1171–1176, 2010.

TARLETON, R. L. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **International immunology**, v. 8, n. 1, p. 13–22, jan. 1996.

- TAYLOR, A. et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin- 10 and transforming growth factor- b : the role of T regulatory cells. **Immunology**, v. 117, p. 433–442, 2005.
- TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, jul. 2011.
- TODT, J. C. et al. Down-regulation of interleukin-12, interleukin-12R expression/activity mediates the switch from Th1 to Th2 granuloma response during murine Schistosomiasis mansoni. **Scandinavian journal of immunology**, v. 52, n. 4, p. 385–92, out. 2000.
- TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction : Appraisal of the Griess reaction in the L -arginine / nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, p. 51–70, 2007.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472–481, 1 maio 2001.
- UMEKITA, L. F. et al. One fate of bloodstream trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* after immune clearance: an ultrastructural study. **Journal of parasitology**, v. 85, p. 867–872, 1999.
- VAILLANT, B. et al. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 12, p. 7017–26, 15 dez. 2001.
- VIEIRA, P. M. D. A. et al. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental chagas disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.
- VOGT, J. et al. Impaired *Trypanosoma cruzi*-specific IFN-gamma secretion by T cells bearing the BV9 T-cell receptor is associated with local IL-10 production in non-lymphoid tissues of chronically infected mice. **Microbes and infection**, v. 10, n. 7, p. 781–90, jun. 2008.
- WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 148–54, 2007.
- XAVIER, S. C. D. C. et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2878, maio 2014.

