

CAIO COTTA NATALE

**O PAPEL DA IL-18 NA INFECÇÃO POR
*LEISHMANIA AMAZONENSIS***

**Belo Horizonte – MG
2015
CAIO COTTA NATALE**

**O PAPEL DA IL-18 NA INFECÇÃO POR
*LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia da
Universidade Federal de Minas Gerais
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Imunologia

Profa. Dra. Leda Quercia Vieira (Orientadora)

Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia – Depto de Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Daniel Manzoni de Almeida (Co-Orientador)

Departamento de Metodologia do Ensino e Educação Comparada
Faculdade de Educação
Universidade de São Paulo

**Belo Horizonte – MG
2015**

À Teca Natale

AGRADECIMENTOS

À Professora Leda Quercia Vieira pela orientação, pela oportunidade no seu laboratório e os bons anos de convivência. Sempre num ambiente amistoso com liberdade de ideias e discussões, que foram de extrema contribuição na minha formação acadêmica, desde os tempos da iniciação científica.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao longo dos dois anos do meu mestrado.

Aos membros que compõem essa banca, pela oportunidade de discussão deste trabalho e pela possibilidade de enriquecimento do mesmo.

Ao Professor Daniel Manzoni de Almeida, que mais que um co-orientador, foi meu amigo durante todo esse tempo. Me deu a oportunidade de ser seu aluno e conviver com o seu brilhantismo e bom humor. E mesmo de longe rumando na “Educação” foi parte integrante deste trabalho, sempre colocando questões pertinentes que enriqueceram o meu processo de pesquisa.

À minha aluna de iniciação científica Layara, pela paciência em conviver comigo e me ajudar nesse período tão caótico que precede a escrita da dissertação. E que espero, fique ao meu lado, para ajudá-la na sua formação.

À Paula Seixas, minha amiga e companheira de laboratório, pelos anos de convivência, experimentos em dias esdrúxulos, pelas conversas amenas e familiares no biotério. E claro, pelas muitas noites no Maleta, manhãs na Leroy Merlin e nos momentos *gourmet* descascando alhos e bugalhos.

Aos demais membros e amigos do LAGI, Ana Clara, Peter, Diego, Débora, João, Grazielle, Dionnê obrigado pela ajuda, disponibilidade e pelos bons momentos de convivência. Aos meus grandes amigos Matheus, Liliane pelos ótimos momentos de trabalho e também fora dele. Agradeço por contribuírem imensamente pela construção de um ambiente de trabalho tão agradável. E em especial pelas manhãs deliciosas de citometrias.

Aos meus amigos das artes, que souberam lidar comigo mesmo pertencendo, aparentemente, a esse mundo bizarro das ciências biológicas. E aos meus amigos do curso de Bases, sempre presentes, até mesmo nos seminários de eletrofisiologia.

Por fim, agradecer principalmente a minha mãe, Teca Natale, que sabe mais do que qualquer um, os esforços que fez para permitir que eu pudesse investir na minha formação. Ao meu irmão Carlos, pelo tempo de convivência, amizade e ajuda nesses anos aqui em Belo Horizonte. À minha irmã Patrícia, por ter me dado o melhor presente de todos, minha tão amada sobrinha Maria Tereza.

*“Tem horas em que, de repente,
o mundo vira pequenininho,
mas noutro de-repente ele já torna a ser
demais de grande, outra vez.
A gente deve de esperar o terceiro pensamento.”*

João Guimarães Rosa

Resumo

Na infecção por *Leishmania amazonensis* o modelo clássico de polarização Th1 e Th2, encontrado no modelo de infecção com *Leishmania major*, não se aplica. O que é descrito é um misto das respostas, alterando os perfis de suscetibilidade e resistência nos modelos animais. A IL-18 é uma citocina pro-inflamatória que possui um papel dúbio, polariza linfócitos T ao fenótipo Th1, pois tem a habilidade de induzir a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T, porém, dependendo do ambiente em que ela se encontra, pode induzir um fenótipo Th2. Nosso trabalho visa identificar o papel da citocina IL-18 no curso de infecção e desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos infectados por *L. amazonensis*. Nossos dados mostraram que camundongo selvagem apresenta lesões maiores do que as dos IL-18 KO desde o início da infecção. Além disso, nos tempos analisados, as duas linhagens apresentam mesma carga parasitária. Já quanto ao perfil de citocinas, encontramos níveis consideráveis de IL-4, IFN- γ , TNF e IL-10, demonstrando que não há polarização das células T *helper* para um tipo de resposta específica. Ao analisarmos o perfil celular, notamos que o camundongo selvagem tende a ter uma maior população de células inflamatórias, tais como células NK, monócitos, macrófagos e neutrófilos nas lesões cutâneas, sendo a diferença no número de neutrófilos significativa na última semana de infecção, coincidindo com presença aumentada de tecido necrótico cutâneo nesse animal no mesmo tempo. Vimos, também, que macrófagos derivados de medula não expressam níveis significativos do receptor de IL-18 frente a diversos estímulos, e são igualmente suscetíveis à infecção. Porém, durante o curso de infecção identificamos a uma maciça porcentagem de células T CD4+ e CD8+ expressando o receptor para IL-18 após a quarta semana de infecção, o que coincide com o surgimento da lesão exacerbada no camundongo selvagem, assim como pode ser associada, também,

com o pico de produção de IL-18 visto por ELISA. Em conclusão, nossos dados sugerem um que a IL-18 está parcialmente envolvida na suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*. Isso ocorre provavelmente devido à interação da IL-18 com linfócitos T, e talvez esteja envolvida também na migração celular e manutenção da via de ativação do inflamassoma, impedindo a via da piroptose.

Palavras-chaves: leishmaniose; IL-18; *Leishmania amazonensis*

Abstract

In infection by *Leishmania amazonensis* the classic model of Th1 and Th2 polarization, found in the model of infection with *Leishmania major*, does not apply. A mixture of responses not fitting the profiles of susceptibility and resistance is observed. IL-18 is a pro-inflammatory cytokine that has a dubious role. It polarizes T lymphocytes to the Th1 phenotype because it has the ability to induce the production of IFN- γ by NK cells and T lymphocytes. However, depending on the environment, it can induce a Th2 phenotype. Our work aims at identifying the role of IL-18 in the course of infection and development of skin lesions in mice infected by *L. amazonensis*. Our data showed that the wild-type animals (C57BL/6) have larger lesions than those of IL-18 KO since the beginning of the infection. In addition, at the times analyzed, the two strains have the same parasite burden. We found considerable levels of IL-4, IFN- γ , TNF and IL-10 in lesions, demonstrating that there is no polarization of T helper cells to a specific response type. Analyzing the cellular profile, we noted that the wild-type lesions tend to have a larger population of inflammatory cells, such as NK cells, monocytes, macrophages and neutrophils. There were more neutrophils at the eight week of infection in wild-type mice, which coincided with increased presence of necrotic tissue in the skin. We have also seen that bone marrow-derived macrophages do not express significant levels of IL-18 receptor in face of various stimulations. Macrophages from IL-18 and wild type mice were equally susceptible to infection with *L. amazonensis*. However, during the course of infection we identified a massive percentage of T cells CD4⁺ and CD8⁺ expressing the receptor for IL-18 after the fourth week of infection. This coincides with the appearance of the exacerbated lesion in wild-type mice and can be associated with the peak production of IL-18 seen by ELISA. Our data suggests that IL-18 is partially involved in susceptibility to infection by *L. amazonensis*. This is

likely due to the interaction of IL-18 with T lymphocytes, and, perhaps, its involvement in cell migration and maintenance of the inflammasome pathway, preventing activation of the pyroptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise do curso da infecção de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i>	37
Figura 2. Análise da carga parasitária das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i>	39
Figura 3. Análises histopatológicas das lesões cutâneas de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	41
Figura 4. Análise das citocinas IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	44
Figura 5. Análise das concentrações das citocinas IL-4, IL-17 e IL-18 e da quimiocina MCP-1 nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	46
Figura 6. Análise das citocinas TNF, IL-12p70 e IL-10 nos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	49
Figura 7. Avaliação dos Macrófagos e Monócitos presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	51
Figura 8. Avaliações de Células Dendríticas e dos Neutrófilos presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	54
Figura 9. Avaliação das células <i>Natural Killer</i> (NK) presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> e cinética da expressão do receptor de IL-18..	57
Figura 10. Avaliação das células T CD4+ presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> e a cinética da expressão do receptor de IL-18..	60
Figura 11. Avaliação da presença de células T CD8+ no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> e cinética da expressão do receptor de IL-18..	63

Figura 12. Avaliação da presença de células T reguladoras (CD3+CD4+FoxP3+) no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>.....	66
Figura 13. Análise da entrada do parasito em macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO.....	68
Figura 14. Avaliação da expressão do receptor de IL-18 em macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO..	70
Figura 15. Avaliação da expressão da enzima Arginase I nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i>.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de Leishmania	02
Tabela 2. Sequência dos primers	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag: Antígeno

AIM#: Proteína Interferon-indutível

ApoE: Apolipoproteína E

ASC: Proteína Adaptadora de caspase

BIR: Domínio inibidor de baculovírus

BOD: Demanda bioquímica de oxigênio

CARD: Domínio de recrutamento de caspase

CCL#: Ligantes de receptores de quimiocinas CC

CCL#: Ligantes de receptores de quimiocinas CC

CCR#: Receptores de quimiocinas CC

CD#: Cluster of differentiation

cDNA: DNA complementar

CLR: Receptores tipo-C de Lectina

CXCL#: Ligantes de receptores de quimiocinas CXC

DAMP: Padrão Molecular Associado ao Perigo

DC: Célula dendrítica

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNase: Desoxiribonuclease

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra-acético

ELISA: Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

fPPG: Proteofosfoglicano filamentoso

HSp: Proteínas de choque térmico

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular do tipo 1

IFN: Interferon

Ig: Imunoglobulina

IL-#: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase indutível

IRF#: Fator regulador de interferon do tipo #

K: Potássio

LC: Leishmaniose Cutânea

LPG: Lipofosfoglicano

LPS: Lipopolissacarídeo

LV: Leishmaniose Visceral

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1: Proteína 1 quimiotática de monócito

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

MP: Membrana periotrófica

MPO: Mieloperoxidase

mRNA: RNA mensageiro

MyD88: Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88

NAIP#: Proteína contendo repetição do IAP de baculovírus

NETs: Neutrophil Extracellular Traps

NFκB: Fator de transcrição nuclear κ B

NI: Células não inflamatórias

NK: Células exterminadoras naturais

NLR#: Receptor do tipo NOD

NLRP#: Domínio de proteína contendo PYD

PYD: Domínio pirina

NO: Óxido nítrico

NOD: Domínio de oligomerização de nucleotídeos

OD: Densidade óptica

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMP: Padrão Molecular Associado a Patógeno

PBS: Salina tamponada com fosfato 0,1 M, pH 7,3 (Phosphate Buffered Saline)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)

PMN: Polimorfonuclear

PPR: Receptores de reconhecimento padrão

PSG: Gel secretado por promastigotas

PV: Vacúolo parasitoforo

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

RNase: Ribonuclease

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPMI: Meio do Instituto Roswell Park Memorial

RT-PCR: Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SBF: Soro bovino fetal

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SSA: Solução saturada de sulfato de amônia

STAT#: Proteína transdutora do sinal e ativadora da transcrição

TGF: Fator de crescimento transformante

Th#: Células T auxiliares do tipo #

TIR: Domínio do receptor Toll/IL-1

TLR: Receptores do tipo Toll

TMB: Tetrametilbenzina

TNF: Fator de necrose tumoral

TNFR1: Receptor do tipo 1 de TNF

Treg: Células T reguladoras

U: Unidades

VCAM: Proteína de adesão celular vascular

Wt: Tipo selvagem

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
1.1-Epidemiologia das leishmanioses	1
1.2-Ciclo de Vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	4
1.3-Resposta imunológica desenvolvida na infecção por <i>Leishmania</i>	7
1.3.1- Modelo de infecção por <i>Leishmania major</i>	7
1.3.2-Resposta à infecção por <i>Leishmania amazonensis</i>	11
1.4 – O inflamassoma.....	14
1.4.1- Estrutura e ativação	14
1.4.2-A IL-18	17
1.4.3-O Inflamassoma, a IL-18 e as Leishmanioses	19
2. OBJETIVOS	23
3- MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 – Animais	24
3.2 – Parasitos	25
3.3 – Infecção dos camundongos por <i>Leishmania amazonensis</i>	26
3.4 – Quantificação de parasitos.....	27
3.5 – Extração de tecido para dosagem de citocinas na lesão	27
3.6 – Detecção de citocinas por ELISA.....	28
3.7 – Detecção de mRNA por transcriptase reversa e PCR em tempo real (RT-PCR Real Time).....	30
3.7.1 – Extração de RNA	30
3.7.2 – Síntese de cDNA.....	31
3.7.3 – Amplificação específica por Real time PCR	32
3.8 – Citometria de fluxo	33
3.9 – Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea e infecção <i>in vitro</i> por formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> RFP+	34
3.10 – Detecção do receptor para IL-18 em de macrófagos derivados da medula óssea sob diversos estímulos.....	35
3.11 – Análise histopatológica	35
3.12 – Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1- Análise do curso da infecção de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i>	37

4.2- Análise da carga parasitária das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i>	39
4.3- Análises histopatológicas das lesões cutâneas de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	41
4.4- Análise das citocinas IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	44
4.5- Análise das concentrações das citocinas IL-4, IL-17 e IL-18 e da quimiocina MCP-1 nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	46
4.6- Análise das citocinas TNF, IL-12p70 e IL-10 nos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	49
4.7-Avaliação dos Macrófagos e Monócitos presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	51
4.8 Avaliações de Células Dendríticas e dos Neutrófilos presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	54
4.9-Avaliação das células <i>Natural Killer</i> (NK) presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> e cinética da expressão do receptor de IL-18.....	57
4.10-Avaliação das células T CD4+ presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> e a cinética da expressão do receptor de IL-18	60
4.11-Avaliação da presença de células T CD8+ no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> e cinética da expressão do receptor de IL-18	63
4.12-Avaliação da presença de células T reguladoras (CD3+CD4+FoxP3+) no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	66
4.13- Análise da entrada do parasito em macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO	68
4.14-Avaliação da expressão do receptor de IL-18 em macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO.....	70
4.15-Avaliação da expressão da enzima Arginase I nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i>	72
5-DISCUSSÃO	74
6-CONCLUSÃO	84
7. BIBLIOGRAFIA	86

1-INTRODUÇÃO

1.1-Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por diversas espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. São protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Tripanosomatidae (CRUZ *et al.*, 2002). A transmissão da *Leishmania* ocorre quando há inóculo do parasito pelo vetor no hospedeiro vertebrado. As diversas espécies de vetores pertencem aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo responsáveis pela transmissão no Velho Mundo e Novo Mundo, respectivamente (DESJEUX, 1996; ROGERS *et al.*, 2004). No mundo são cerca de 20 espécies de *Leishmania*. Essas espécies, normalmente são relacionadas e agrupadas de acordo com as formas clínicas a elas associadas (tabela 1) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Manifestação clínica	Espécie
Velho Mundo, subgênero Leishmania	
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania donovani</i> e <i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
Novo Mundo, subgênero Leishmania	
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanol</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania mexicana</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Novo Mundo, subgênero Viannia	
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania brasiliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> e <i>Leishmania peruviana</i>
Leishmaniose mucocutânea	<i>Leishmania brasiliensis</i> e <i>Leishmania panamensis</i>

Tabela 1: Espécies de Leishmania. Adaptada de (WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

As duas principais formas clínicas da leishmaniose são: a forma cutânea e a forma visceral. A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada pela aparição de lesões na pele restritas ao local da picada do vetor, porém essa forma clínica da leishmaniose pode se diferenciar nas formas difusa e mucocutânea. A forma difusa se caracteriza pela aparição de lesões disseminadas não restritas ao local da picada e acomete, principalmente, pacientes imunossuprimidos. Já a forma mucocutânea é caracterizada pela aparição de lesões na mucosa oro-nasal e faríngea, normalmente é uma forma de recidiva que acomete principalmente pacientes do gênero masculino (ROGERS *et al.*, 2004; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Na leishmaniose visceral (LV) os dois principais órgãos afetados são baço e fígado, clinicamente identificados pelo tamanho aumentado. Essa forma é considerada a manifestação mais grave das leishmanioses, pois é

a forma letal da doença. A forma cutânea, assim como as formas difusa e mucocutânea, não estão associadas aos casos de mortalidade, porém contribuem para a morbidade relacionada à doença (HERWALDT, 1999; THALHOFER *et al.*, 2011; WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Há casos de leishmanioses em todos os continentes do globo, entretanto é considerada endêmica em pelo menos cinco dos continentes. O Brasil aparece no quadro de países com grande número de casos, além de variabilidade de vetores, reservatórios e espécies de *Leishmania*. A LV é endêmica na Índia e leste africano. Há uma estimativa de 200 a 400 mil novos casos e cerca de 30 a 40 mil óbitos por ano causados pela forma visceral. Cerca de 90% desses novos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do sul e Sudão. A LC é a forma mais comum das leishmanioses. Cerca de 95% dos casos ocorrem nas Américas, Mediterrâneo, leste e centro da Ásia. O Brasil aparece, mais uma vez, entre os seis países em que dois terços dos novos casos anuais ocorrem. Há uma estimativa de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos ao ano da forma cutânea. Já a forma mucocutânea, cerca de 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. Apesar de as regiões em que as leishmanioses são endêmicas estarem concentradas nos trópicos, os casos não são restritos à área tropical do globo, sendo, então, uma patologia que abrange grande território. Apesar desse fato, as leishmanioses são negligenciadas pelos órgãos de saúde e Institutos de pesquisa (ALVAR *et al.*, 2012; WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A pobreza aumenta o risco para as leishmanioses devido as más condições de moradia, o que pode favorecer o surgimento de

criadouros do vetor. Além de que um aglomerado de pessoas em pequenos cômodos pode favorecer o repasto sanguíneo das fêmeas do vetor, o que também favorece a transmissão, assim como a construção em áreas silvestres, seja para urbanização ou para fins agropecuários, o que acarreta na domesticação do ciclo de transmissão do parasito. Outro fator importante é que a má nutrição, seja carência em proteínas, ferro, vitamina A e zinco aumentam o risco a infecção e ao desenvolvimento de formas mais graves da doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; MAROLI *et al.*, 2013).

1.2-Ciclo de Vida dos parasitos do gênero *Leishmania*

São observadas duas formas distintas da *Leishmania* durante o seu ciclo de vida. São elas a forma promastigota e a forma amastigota. A forma amastigota é caracterizada pela forma ovoide e sem flagelo aparente. É a forma intracelular encontrada no hospedeiro vertebrado, presente principalmente em células fagocitárias mononucleares. A forma promastigota é afilada, flagelar e móvel. Está presente no trato digestório do vetor invertebrado, sendo essa a forma infectante do parasito. Quando as fêmeas do vetor fazem o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, células contendo a forma amastigota do parasito são ingeridas. Após a ingestão, essas células se rompem no terço posterior do tubo digestório do vetor, liberando, então, as formas amastigotas (BAJENOFF *et al.*, 2006; BATES, 2007; ROGERS; BATES, 2007; SCHAIBLE *et al.*, 1999). As amastigotas diferenciam-se na forma promastigota, que entram em metaciclogênese e se diferenciam na forma promastigota metacíclica, menor e

com maior mobilidade, o que facilita a infecção do hospedeiro vertebrado quando o vetor fizer o próximo repasto sanguíneo.

A mudança de forma do parasito, juntamente com a mudança de hospedeiro, se dá, provavelmente, devido às diferenças de temperatura e pH entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados (CAMPBELL; RAINEY, 1993; SACKS; PERKINS, 1984). Após a liberação da forma amastigota ingerida pelo vetor no terço anterior do seu tubo digestório, o parasito se diferencia para a forma procíclica. Esse processo ocorre na membrana peritrofica (MP), onde essa forma mais alongada se replica. Com o aumento da quantidade de parasitos, devido a replicação contínua, o parasito se diferencia gradualmente para a forma promastigota denominada nectomona. Após cerca de 72 horas depois do repasto sanguíneo, a forma nectomona; flagelar, rompe a MP e migra para o terço anterior do tubo digestório do vetor (BATES, 1994). Já na porção anterior do aparelho digestório do vetor o parasito, num processo dependente de um glicolípido chamado de lipofosfoglicano (LPG), insere seu flagelo na parede do intestino do vetor (PIMENTA *et al.*, 1992). Após a inserção do flagelo no epitélio do aparelho digestório do hospedeiro invertebrado, o parasito se diferencia para uma forma menor conhecida como haptomona, sendo essa a outra forma replicativa do parasito. Nesse momento há também parasitos já diferenciados na forma metacíclica, uma forma não replicativa. Ou seja, a replicação do parasito ocorre em dois momentos e em dois locais distintos no hospedeiro invertebrado, primeiramente no terço posterior do intestino na forma procíclica e posteriormente na porção anterior do intestino na forma haptomona (JECNA *et al.*, 2013; WILSON *et al.*, 2010). Como já há, após cerca de 5 dias após o repasto, formas metacíclicas no tubo digestório do vetor, este já está apto

a infectar os hospedeiros vertebrados (SACKS, 1989; SACKS; PERKINS, 1984). A forma promastigota metacíclica é, então, a forma que infecta as células no hospedeiro. Quando dentro das células, nos fagossomos, entram num processo de diferenciação para as formas amastigotas, que são as formas replicativas nas células do hospedeiro vertebrado (BAJENOFF *et al.*, 2006; SACKS; PERKINS, 1984).

Experimentalmente, utilizando o vetor *Lutzomyia longipalpis* infectados com *Leishmania mexicana*, observou-se que a porção anterior do intestino do hospedeiro vertebrado apresentava-se bloqueada por um gel produzido pelas formas promastigotas do parasito, que tem como um de seus principais componentes uma glicoproteína tipo-mucina, produzida apenas por protozoários do gênero *Leishmania*, conhecida como proteofosfoglicano filamentoso. Nesse gel há um acúmulo de formas promastigotas metacíclicas do parasito. Além de ser o ambiente provável da ocorrência da metaciclogênese, o gel, ao promover o bloqueio do terço anterior do tubo digestório do vetor, dificulta o repasto sanguíneo do vetor no hospedeiro vertebrado. Isso acarreta num aumento do tempo de repasto, o que facilitaria o inóculo de parasitos na pele do hospedeiro. Além de aumentar o tempo de repasto, devido à dificuldade em alimentar-se, o vetor infectado, como tem o aparelho digestório bloqueado pelo gel, tende, também, a procurar outros hospedeiros para alimentar-se, já que esse processo é mais difícil. Esse ambiente causado pelo parasito no vetor favorece a transmissão de parasitos num maior número de hospedeiro, além do inóculo de uma quantidade aumentada das formas promastigotas metacíclicas (BATES, 2007; ROGERS *et al.*, 2004; ROGERS; BATES, 2007; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002).

1.3-Resposta imunológica desenvolvida na infecção por *Leishmania*

1.3.1- Modelo de infecção por *Leishmania major*

A correlação do modelo de suscetibilidade, representado pelo camundongo BALB/c, e do modelo de resistência, representado pelo camundongo C57BL/6, com uma polarização de resposta do tipo Th2 e Th1, respectivamente, frente a infecção por *Leishmania major*, abriu caminho para a descrição do papel dos componentes celulares e humorais da resposta imunológica aos protozoários do gênero *Leishmania* (LOCKSLEY *et al.*, 1987; MOSMANN *et al.*, 2005).

A resposta polarizada do tipo Th1 se caracteriza por altos níveis de IFN- γ acompanhados de baixos níveis de IL-4, já a resposta Th2 apresenta um perfil com altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- γ (HEINZEL *et al.*, 1989; LOCKSLEY *et al.*, 1987). Outra citocina que desempenha papel crucial no desenvolvimento de células T CD4+ do tipo Th1 é a IL-12, que, inicialmente produzida por células dendríticas (DC), ativa as células *Natural Killer* (NK) a produzirem IFN- γ (SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1995; SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995). Essa IL-12 acarreta tanto na polarização das células para Th1, como na sua manutenção durante a resposta imunológica (PARK *et al.*, 2002; PARK; HONDOWICZ; SCOTT, 2000). Camundongos BALB/c quando tratados com IL-12 revertem o quadro de suscetibilidade e se tornam resistentes à infecção por *Leishmania major*, o que demonstra, claramente, o papel dessa

citocina na polarização da resposta do tipo Th1(HEINZEL *et al.*, 1993; HONDOWICZ *et al.*, 2000). Em sinergia com a IL-12, a citocina IL-18 age amplificando o sinal de ativação de células NK, aumentando, conseqüentemente, a produção de IFN- γ (KOSAKA *et al.*, 2012). Já num ambiente polarizado para Th2, a IL-4 é a citocina que orchestra a polarização dessa resposta. Camundongos BALB/c tratados com anti-IL-4 passam a produzir maiores quantidades de IL-12, revertendo o quadro de suscetibilidade. Quando camundongos C57BL/6 são tratados com IL-4 recombinante, passam, então, a ter uma resposta predominante do tipo Th2. Além de estimular um ambiente de citocinas predominante da resposta Th2 com citocinas como IL-10 e IL-13, há indícios de que a IL-4 inibe a expressão de receptores para IL-12 em linfócitos T e B. Ou seja, a resposta Th2, provavelmente, predomina sobre a Th1 ao inibir a amplificação do sinal via IL-12 (CHATELAIN; VARKILA; COFFMAN, 1992; HURDAYAL; BROMBACHER, 2014; SADICK *et al.*, 1990).

Na infecção por *Leishmania major* o perfil Th1 está associado ao modelo de resistência, pois a citocina IFN- γ produzida, principalmente, por linfócitos e células NK, atua diretamente nos macrófagos, que são as principais células infectadas pelo parasito, além de ativarem outras células efetoras (MOSSER; EDWARDS, 2008). A combinação de dois sinais, IFN- γ e TNF, resulta na ativação de uma população de macrófagos com atividade microbicida. Os macrófagos ativados por essas citocinas produzem IL-12, que ativam mais células T e NK a produzirem mais IFN- γ (DALE; BOXER; LILES, 2008; GORDON; TAYLOR, 2005; MACKANESS, 1977). Além de IL-12, macrófagos classicamente ativados produzem TNF, que age de maneira autócrina, aumentando o sinal de ativação, além de produzir outras citocinas pró-

inflamatórias como IL-1 β e IL-18. O macrófago infectado e ativado produz, então, ânions superóxido e radicais de oxigênio e nitrogênio. Através do metabolismo do aminoácido L-arginina pela enzima óxido sintase indutível (iNOS), há produção de óxido nítrico (NO), que mata o parasito intracelular. A expressão de iNOS é induzida por TNF (GREEN *et al.*, 1990; MOSSER; EDWARDS, 2008; O'SHEA; MURRAY, 2008). As células NK apresentam uma produção de IFN- γ transiente, dessa maneira, a manutenção de macrófagos ativados é feita pela produção de IFN- γ pelas células Th1, continuamente ativadas por IL-12, produzidas pelos próprios macrófagos já ativados. A produção de TNF ocorre, provavelmente, após ativação de receptores do tipo *Toll* (TLR) dependentes de Myd88. Há, então, indução de fatores de transcrição para que haja produção de TNF, que age em cooperação com o IFN- γ na manutenção do perfil de ativação (MOSSER; EDWARDS, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2003). Já as outras citocinas produzidas pelos macrófagos ativados, como a IL-6 e IL-23, estão associadas ao desenvolvimento de uma resposta do tipo Th17, que produz grandes quantidades de IL-17, uma citocina pró-inflamatória, associada ao recrutamento de grandes quantidades de células polimorfonucleares (PMN) para o sítio da inflamação (KOLLS; LINDEN, 2004). Ou seja, a resposta do tipo Th1 promove um ambiente intracelular tóxico ao parasito, impedindo, então, sua replicação.

Já num contexto de resposta do tipo Th2, no qual a citocina predominante é a IL-4, os macrófagos por ela ativados possuem características distintas daqueles ativados por IFN- γ e TNF. Em sinergia com a IL-4, a IL-13 contribui para uma amplificação e manutenção do sinal de ativação dos macrófagos no contexto Th2. Os macrófagos quando ativados por IL-4, diferentemente de quando ativados por IFN- γ e TNF, promovem a ativação de fatores de transcrição

que irão aumentar a expressão da enzima Arginase I, que converte a L-arginina em ornitina, um precursor de poliaminas e do colágeno. Ao contrário do produto da ação da iNOS, a ornitina não mata o parasito. Assim, o macrófago ativado por IL-4 mantém um ambiente intracelular propício para a replicação do parasito (KREIDER *et al.*, 2007; LOKE *et al.*, 2007). Outro ponto é que macrófagos quando tratados *in vitro* com IL-4 ou IL-13, apresentação falha na apresentação de antígenos para as células T. Dessa maneira, uma resposta do tipo Th2 induz uma população de macrófagos muito mais susceptível a parasitos intracelulares, como as *Leishmanias* (HARRIS *et al.*, 2007; TUMITAN *et al.*, 2007).

Num processo independente da resposta do tipo Th1 ou Th2, a citocina IL-10 inibe a produção de NO por macrófagos infectados. Quando os macrófagos fagocitam parasitos opsonizados por IgG do hospedeiro, esses são induzidos a produzirem maiores quantidades de IL-10, o que, mais uma vez, assim como a IL-4 e/ou IL-13, favorece a proliferação do parasito (KANE; MOSSER, 2001; NOBEN-TRAUTH *et al.*, 2003). Na infecção por *L. major*, nas primeiras 12 horas, os neutrófilos são a maioria das células infectadas no sítio da infecção (PETERS *et al.*, 2008). Esses neutrófilos infectados são comumente fagocitados por DCs e macrófagos, permitindo uma entrada silenciosa do parasito, promovendo uma maneira da *Leishmania* escapar de qualquer mecanismo leishmanicida das células fagocitárias (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Ou seja, há outros fatores além da polarização para Th1 e Th2 que favorecem os perfis de resistência e suscetibilidade à infecção por *Leishmania major*.

1.3.2-Resposta à infecção por *Leishmania amazonensis*

A polarização Th1/Th2 e seu papel no desenvolvimento de modelos de resistência e suscetibilidade, vistos na infecção por *L. major*, servem de parâmetro para os estudos acerca da relação entre resposta imunológica do hospedeiro e os parasitos do gênero *Leishmania*, porém esse papel protetor e indutor de suscetibilidade não se aplica a todos os hospedeiros e nem a todas as espécies de parasitos (JI; SUN; SOONG, 2003; MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Quase todas as linhagens de camundongos, exceto a C3H/HeJ, são susceptíveis à *Leishmania amazonensis*, até mesmo as que são modelo de resistência a outras espécies, como a linhagem C57BL/6 frente à infecção por *L. major*. Quando infectados com *L. amazonensis*, esses camundongos desenvolvem lesões progressivas com formação de vacúolo parasitóforo nas células infectadas, e carga parasitária alta e persistente (AFONSO; SCOTT, 1993; QI; POPOV; SOONG, 2001; SOONG *et al.*, 1997). Esses modelos de suscetibilidade não estão, necessariamente, ligados a uma polarização do tipo Th2 ou a uma alta produção de IL-4, mas sim a uma baixa quantidade de citocinas como IFN- γ , IL-10 e IL-17 no balanço geral. Até a quarta semana de infecção há uma baixa produção de diversas outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , CCL-5, MCP-1, e à baixa expressão de receptores de quimiocinas como CCR1, CCR2 e CCR5. Nesse mesmo período há um contrabalanço com a maior produção de IL-4 e IL-10. Esse cenário inicial pode ser crucial para a sobrevivência do parasito e manutenção da carga parasitária (JI; SUN; SOONG, 2003). Essa mistura de uma baixa polarização tanto Th1 quanto Th2 encontrada nos

modelos murinos com *L. amazonensis* são bastante similares ao que é encontrado nos casos em humanos (SOONG *et al.*, 1997; XIN; LI; SOONG, 2007). Macrófagos infectados com *L. amazonensis*, mesmo na presença de IFN- γ e TNF, não conseguem eliminar os parasitos eficientemente (GOMES *et al.*, 2003). Isso acontece, provavelmente, devido ao grande tamanho do vacúolo parasitóforo, o que pode comprometer a ação leishmanicida do NO e das espécies reativas de oxigênio (ROS) (WILSON *et al.*, 2008). Os baixos níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias nos modelos de infecção por *L. amazonensis* tem sido relacionados, provavelmente, a uma dificuldade na maturação das DC, que em modelos experimentais, apresentam baixos níveis de CD40, ou seja, apresentam comprometimento na ativação de células T efectoras (SOONG, 2012; XIN; LI; SOONG, 2007). Recentemente, relatou-se que a infecção por *L. amazonensis* dificulta a migração de DC do sítio de infecção para os linfonodos drenantes (HERMIDA *et al.*, 2014). Além de níveis baixos na produção de citocinas, como a IL-12, há, também, um comprometimento na expressão da cadeia $\beta 2$ de seu receptor, o que compromete a sua cascata de ativação. Dessa maneira, o tratamento com IL-12 recombinante é ineficaz na tentativa de reverter o quadro de suscetibilidade frente à *L. amazonensis* (HEINZEL *et al.*, 1993; JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000). Sabe-se que o comprometimento da ativação das DCs é independente de IL-4, TGF- β ou IL-10, sendo que mesmo na presença de células NK não há alteração no perfil das DCs (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; SOONG, 2008; XIN; LI; SOONG, 2008).

Ao contrário do que acontece na infecção por *L. major*, na infecção por *L. amazonensis* os neutrófilos apresentam um papel protetor. Camundongos

BALB/c quando infectados por *L. amazonensis* tornam-se mais susceptíveis quando há depleção de neutrófilos, num mecanismo que parece ser dependente de IL-10 e IL-17 (SOUSA *et al.*, 2014). Quando feita co-cultura de neutrófilos e macrófagos infectados, estes foram capazes de matar as formas amastigotas do parasito em um mecanismo dependente de TNF e elastase, porém independente da produção de ROS e NO. Este fato não acontece quando é feita cultura apenas com macrófagos infectados (DE SOUZA CARMO; KATZ; BARBIERI, 2010). Já em humanos, neutrófilos infectados por formas promastigotas do parasito, produzem NETs (neutrophil extracellular traps) que eliminam a *Leishmania* (GUIMARAES-COSTA *et al.*, 2009; GUIMARAES-COSTA *et al.*, 2014). Neutrófilos internalizam tanto as formas promastigotas quanto as formas amastigotas do parasito, porém em resposta à forma promastigota neutrófilos secretam TNF, preferencialmente. Porém, em resposta à forma amastigota do parasito, IL-10 é a citocina secretada em maior quantidade, sendo essa, provavelmente, a explicação para a capacidade dos neutrófilos eliminarem as formas promastigotas do parasito, mas não as formas amastigotas (CARLSEN *et al.*, 2013). Como são as primeiras células a chegarem ao sítio de infecção, os neutrófilos apresentam papel importante no controle do parasitismo nos tempos iniciais de infecção (CARLSEN *et al.*, 2013; GUIMARAES-COSTA *et al.*, 2014).

Outro ponto bastante distinto na infecção por *L. amazonensis* é o papel desempenhado pela citocina IFN- γ . Na infecção por *L. major*, o IFN- γ tem papel crucial na ativação de macrófagos, na morte do parasito e na resolução da infecção, porém em baixas doses o IFN- γ pode favorecer a proliferação das formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos infectados *in vitro*, mesmo estimulando a morte das formas promastigotas. Esse ponto dual no

papel do IFN- γ foi independente do fundo genético dos macrófagos, demonstrando seu papel na interação direta do parasito com as células do hospedeiro (QI *et al.*, 2004).

Experimentalmente, demonstrou-se que a transferência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ para o sítio de infecção em camundongos C57BL/6 gerou uma diminuição progressiva da lesão e da carga parasitária, porém o mesmo não acontece quando se faz a transferência de células T CD4⁺ efetoras. Apesar de as células T reguladoras produzirem grandes quantidades de IL-10 e TGF- β , o papel protetor dessas células não foi associado à produção das citocinas supracitadas (JI *et al.*, 2005). Ainda é bastante controversa a forma como o sistema imunológico responde à infecção por *L. amazonensis*, já que papéis clássicos descritos para o modelo na infecção por *L. major*, não se aplicam ao modelo de *L. amazonensis*.

1.4 – O inflamassoma

1.4.1- Estrutura e ativação

O inflamassoma é um complexo macromolecular relacionado à ativação celular e processos inflamatórios e consequente liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias, assim como desencadear um processo de morte celular conhecido como piroptose (KAYAGAKI *et al.*, 2011). A formação do inflamassoma ocorre após ativação dos receptores do tipo NOD (NLR). Em humanos existem cerca de três subfamílias desses receptores, são elas: NOD,

NLRP e IPAF. As proteínas que pertencem ao grupo das NLRs são receptores intracelulares que possuem em sua região N-terminal um domínio pirina (PYD) ou um domínio de recrutamento de caspase (CARD) ou ainda um domínio inibidor de baculovírus (BIR) Esses domínios estão relacionados com o recrutamento de moléculas efetoras na via de sinalização do inflamassoma (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

A ativação do inflamassoma depende de dois sinais distintos. Começando pela ativação de receptores de reconhecimento padrão (PPR). Na imunidade inata o reconhecimento de patógeno é feito a partir de um número de receptores que reconhecem estruturas simples e comuns a grandes grupos de patógenos. OS PPR reconhecem estruturas microbianas únicas chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), tais como componentes da parede celular de bactérias, ácido nucléico de alguns patógenos, estruturas e proteínas de membrana, dentre outros. Sinais de perigo do meio extracelular podem, também, ser reconhecidos pelos PPR e são chamados de padrões moleculares associados ao perigo (DAMP), como cristais de ácido úrico, moléculas de ATP e proteínas de choque térmico (Hsp) hsp70 e hsp90. Os PPR são subdivididos ainda em duas classes, receptores do tipo Toll (TLR) e receptores de lectina tipo C (CLR). Ambos são proteínas transmembranares (LAMKANFI; DIXIT, 2014; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Quando os PPR são ativados, desencadeiam uma cascata de ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (AGOSTINI *et al.*, 2004). A via que ocorre com ativação de TLR é dependente da proteína adaptadora Myd88. Os genes alvo codificam uma série de proteínas, incluindo as citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas suas formas não ativas. Nos macrófagos a pró-IL-18 é expressa constitutivamente, sem a

necessidade da ativação da cascata, porém para a expressão da pró-IL-1 β o primeiro sinal é necessário (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). A ativação dessa primeira cascata promove uma saída de íons K⁺ para o meio extracelular, assim como a geração de ROS. Esse sinal da diminuição da concentração intracelular de K⁺ é o limiar para ocorrência da ativação da segunda via do inflamassoma. A sinalização por TNF pode, também, desencadear o primeiro sinal (ARLEHAMN *et al.*, 2010; CAIN *et al.*, 2001; MUNOZ-PLANILLO *et al.*, 2013).

O segundo sinal acontece por ativação dos NLR. Existem vários tipos de NLR, porém apenas NLRP3, NLRP1 e NLRC4 foram fisiologicamente descritos como ativadores do inflamassoma (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Há também a proteína AIM2, que mesmo não sendo ligada à família dos NLR, está envolvida na formação do inflamassoma. Os NLR são importantes no reconhecimento de PAMP e DAMP intracelulares. O NLRP1 é ativado na presença de toxinas (FAUSTIN *et al.*, 2007; LIAO; MOGRIDGE, 2009). Já a proteína AIM2 se liga a DNA de fita dupla, detectando a presença de dsDNA no citosol (FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 2009). O NAIP5, uma das isoformas encontradas em camundongos, foi estabelecido como um sensor de flagelina de bactérias, assim como NAIP6. Já o NAIP2 é ativado pela proteína Rod do sistema excretor tipo III (TTSS) (KOFOED; VANCE, 2011; RAYAMAJHI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013). O NLRP3, também conhecido como *Cryopyrin* ou NALP3, cliva a pro-caspase-1 via ASC; uma proteína adaptadora, e pode ser ativado por ATP, cristais de colesterol e alumínio, assim como acidose extracelular (DAVIS; WEN; TING, 2011; IYER *et al.*, 2009; RAYAMAJHI *et al.*, 2013). Patógenos intracelulares como *Candida albicans*, o vírus influenza A e a *L. amazonensis* são capazes de ativar o inflamassoma NALP3. Como ele não se

liga diretamente a nenhum dos patógenos, age, provavelmente como um sensor intracelular (ALLEN *et al.*, 2009; HISE *et al.*, 2009; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013). Alguns trabalhos relacionam a ativação do NALP3 com a produção mitocondrial de ROS (ZHOU *et al.*, 2011). Após ativação do NLR, o seu domínio PYD oligomeriza e recruta o CARD associado à ASC, uma proteína associada aos processos de apoptose. O complexo PYD-CARD(ASC) se liga, então, ao complexo CARD-pro-Caspase-1, que é clivada na sua forma ativa Caspase-1. A caspase-1 se liga, então, às formas pró-IL-1 β e pró-IL-18, clivando-as e liberando as citocinas em suas formas ativas IL-1 β e IL-18. A via ativada pro RNA viral ativa uma cascata que leva à transdução e expressão de IFN do tipo I, que não precisa passar pela clivagem por caspases, sendo excretado assim que formado (KANNEGANTI, 2010; LAMKANFI; DIXIT, 2014; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Caspase-1 e caspase-11 podem induzir piroptose, mas somente a caspase-1 processa IL-1 β e IL-18 (DINARELLO, 2009).

1.4.2-A IL-18

A IL-18 foi descoberta em 1989. Células murinas, previamente estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), quando expostas a *Mycobacterium bovis*, aumentaram dramaticamente a produção de IFN- γ . A substância que levou a esse aumento da produção de IFN- γ foi nomeada na época como Fator de indução de Interferon- γ (NAKAMURA *et al.*, 1989). Quando purificada pela primeira vez em 1995 é que recebeu o nome de Interleucina 18 (OKAMURA *et*

al., 1995). Foi, então, colocada na grande família IL-1, por conter diversas similaridades com a IL-1 β , tais como ser sintetizada na sua proforma inativa. O receptor de IL-18 era previamente classificado como sendo um dos receptores de IL-1, sendo agrupado na família dos receptores de IL-1 e TLR, pois contém um domínio intracelular conhecido como Toll/IL-1 receptor domain (TIR), que em sua cascata de ativação resulta na ativação do fator de transcrição NF κ B e MAPK (TSUTSUI *et al.*, 1999). Essa via leva à transcrição de diversos genes associados à resposta inflamatória. Genes que codificam diversas quimiocinas como CXCL8, CX₃CL1 e citocinas como IL-6 e TNF, bem como moléculas de adesão como E-selectina e ICAM1 (FANTUZZI; REED; DINARELLO, 1999).

A IL-18 é produzida por muitos tipos celulares, incluindo macrófagos, DC, osteoblastos e condrócitos (BROSSART *et al.*, 1998; STOLL *et al.*, 1998; UDAGAWA *et al.*, 1997). A IL-18 age em sinergia com a IL-12 na indução da produção de IFN- γ por células T, independente da ativação dos receptores de células T (TCR) (YOSHIMOTO *et al.*, 1998). Além da produção de IFN- γ pelas células T e conseqüente polarização para uma resposta Th1, a IL-18 induz produção de IFN- γ pelas células NK, assim como a maturação dessas células. Camundongos deficientes para IL-18 apresentam atividade citolítica diminuída nas células NK (DINARELLO; FANTUZZI, 2003). A IL-18, está envolvida, também, na resposta Th17 pois, em sinergia com a IL-23, aumenta a produção de IL-17 por essas células, polarizando as células T para essa resposta independentemente de TCR (HARRINGTON; MANGAN; WEAVER, 2006). Em contato com fibroblastos, células endoteliais e sinoviócitos, a IL-18 induz a produção de quimiocinas como CXCL8, CXCL5 e CCL20, assim como moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectinas (MOREL *et al.*, 2001a;

MOREL *et al.*, 2001b). Por outro lado, a IL-18, quando na presença de IL-3, induz a produção de IL-4 e IL-13 por mastócitos. Já em células B, a IL-18 induz diretamente a produção de IL-4, IL-13 e o aumento da expressão de IgE, induzindo, então um cenário de resposta Th2 (YOSHIMOTO *et al.*, 2000). De maneira interessante, IL-12 e IFN- γ não conseguem bloquear a via de ativação de IL-18 no sentido de criar um ambiente Th2, ou seja, a IL-18 auxilia a ocorrência simultânea das respostas Th1 e Th2 (YOSHIMOTO *et al.*, 1999). A IL-18 regula, então, a diferenciação das células T *helper*, a ativação de células B e produção de Ig, assim como a atividade de DC, NK e neutrófilos. De maneira bastante versátil, a IL-18 permeia as respostas inata e adaptativa, podendo aumentar respostas pró-inflamatórias ou reguladoras, dependendo do ambiente em que forem produzidas e de qual forem o seu alvo celular (CARROLL; PAUNOVIC; GADINA, 2008).

1.4.3-O Inflamassoma, a IL-18 e as Leishmanioses

Foi demonstrado que o inflamassoma NLRP3 é ativado em resposta à infecção por *Leishmania*, sendo importante para a restrição da replicação do parasito, seja em macrófagos *in vitro* ou *in vivo*. Utilizando camundongos C57BL/6 deficientes para diversas proteínas do inflamassoma e infectados por *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. infantum chagasi*, mostrou-se que a diminuição da produção de IL-1 β , devida a defeitos na maquinaria do inflamassoma, contribuiu para aumentar a suscetibilidade do hospedeiro. Esse aumento da

suscetibilidade foi atribuído a falha nos receptores dependentes de MyD88, já que fazem parte de uma via necessária para a indução do óxido nítrico sintase (iNOS), mediando a produção de NO (ARTIS *et al.*, 2003; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013; MOSSER; EDWARDS, 2008). Outro estudo revelou que os níveis de caspase-1 e IL-1 β estão aumentados durante a infecção por *L. major*. Foi demonstrado que camundongos deficientes para caspase-1, IL-1 β e IL-18 apresentam maior sensibilidade ao parasito, sendo esta uma via importante para inibir a proliferação do parasito (SANI *et al.*, 2014). Num modelo de infecção por *L. major* com camundongos *knock-out* (KO) para MyD88, demonstrou-se uma tendência a polarização Th2, com baixos níveis de IFN- γ e IL-12 acompanhados de altos níveis de IL-4. Quando esses camundongos receberam tratamento com IL-12 recombinante, a resistência ao parasito foi reestabelecida, dessa maneira, o paralelo entre resistência e suscetibilidade nesse camundongo é dependente de IL-12, e a produção da IL-12 dependente de MyD88, sendo importante, também, para a definição da polarização para Th1 ou Th2 na infecção por *L. major* (DEBUS *et al.*, 2003; MURAILLE *et al.*, 2003).

Em um modelo experimental utilizando camundongos KO para IL-18 no fundo 129/sv e camundongos selvagens no mesmo fundo genético, o camundongo KO mostrou-se bastante susceptível à infecção por *L. major* sem a cura da lesão em tempos longos. Isso ocorreu devido a uma supressão da resposta Th1 e aumento da polarização do tipo Th2. Apesar de não controlar a infecção, o camundongo deficiente para IL-18, após 40 dias de infecção apresentou uma maior produção de IL-12 quando comparado com o camundongo selvagem (WEI *et al.*, 1999). Já na infecção por *L. mexicana*, camundongos BALB/c deficientes em IL-18 foram mais resistentes à infecção em comparação

com o selvagem. O mesmo grupo, em outro estudo, demonstrou que o fundo genético do hospedeiro determina se o papel desenvolvido pela IL-18 na infecção por *L. major* será a favor da resistência ao parasito ou contra ela (BRYSON; WEI; ALEXANDER, 2008; WEI *et al.*, 2004). Porém, a IL-12 sem a presença da IL-18 mostrou-se incapaz de estimular uma polarização do tipo Th1 (XU *et al.*, 1998). Já em um modelo de infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para IL-18, o camundongo KO apresentou uma lesão maior, em comparação com o camundongo suficiente para IL-18, nas primeiras semanas de infecção, porém apresentou um padrão de cura da lesão e carga parasitária após a nona semana de infecção. Nos tempos analisados, os dois camundongos apresentavam a mesma carga parasitária. Além disso, quando comparados com camundongos deficientes para IL-12, os camundongos IL-12 KO apresentaram lesões progressivas, enquanto os selvagens e os IL-18 KO curaram a lesão. O camundongo IL-18 KO apresentou, também, uma maior quantidade de IFN- γ durante todo o curso de infecção, e maiores níveis de IL-12 e IL-4 no início da infecção, demonstrando que, mesmo tardiamente, o animal IL-18 KO foi capaz de desenvolver uma resposta Th1 eficiente (MONTEFORTE *et al.*, 2000). Ou seja, o papel da IL-18 na infecção por *Leishmania* é extremamente dependente do fundo genético do hospedeiro, assim como da espécie do parasito, podendo agir no sentido de cura da lesão e da carga parasitária ou no sentido de favorecer a replicação do parasito e exacerbação da lesão.

Apesar dos diversos trabalhos com modelos de infecção com *L. amazonensis*, a forma como esse parasito interage com o sistema imunológico do hospedeiro e os mecanismos de evasão do parasito não são completamente compreendidos. Como a IL-18 é uma citocina que tem seu papel descrito

relativamente há pouco tempo, e nos trabalhos em modelos de *Leishmaniose*, a ênfase foi no estudo do papel do inflamassoma e da IL-1 β , a descrição do papel da IL-18 frente a essa infecção faz-se necessária para a compreensão do processo patológico e da interação parasito-hospedeiro. Visto que os modelos de polarização Th1 e Th2 não se aplicam à infecção por *L. amazonensis* e a IL-18 tem um papel bastante versátil na resposta imune, nos perguntamos: qual seria, então, o papel da IL-18 na infecção e no desenvolvimento das lesões cutâneas de camundongos infectados por *L. amazonensis*?

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o papel da citocina IL-18 no desenvolvimento das lesões cutâneas de camundongos infectados por *Leishmania amazonenses*

Objetivos específicos:

- Analisar o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos IL-18 KO infectados com *L. amazonensis*;
- Analisar a carga parasitária nas lesões cutâneas dos camundongos IL-18 KO infectados com *L. amazonensis*;
- Determinar o perfil das citocinas IFN- γ TNF, IL-10, IL-4, IL-17, IL-12p70 e IL-18 nas lesões cutâneas dos camundongos selvagens
- Avaliar a produção da quimiocina MCP-1 nas lesões dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *L. amazonensis*;
- Avaliar o perfil do infiltrado de celular nas lesões cutâneas de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *L. amazonensis*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6 (selvagens) fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os camundongos *knockout* (KO) (nos quais o gene de interesse foi deletado por recombinação homóloga, utilizados foram: KO para o gene da citocina IL-18 [IL-18 $-/-$, Jackson Laboratories **B6.129P2-il18^{tm1Aki}/J**] (TAKEDA *et al.*, 1998)) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Alan Sher (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e as colônias de criação foram mantidas em micro isoladores em estantes dotadas de filtro e ventilação forçada, (Allentown Inc, Allentown, NJ, EUA) no biotério de criação do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, UFMG.

Foram utilizados camundongos fêmeas, sendo cinco animais por grupo, sendo os grupos: animais selvagens no fundo C57BL/6 sem infecção, animais IL-18 KO no fundo C57BL/6 sem infecção, animais selvagens no fundo C57BL/6 infectados com *Leishmania amazonensis*, animais IL-18 KO no fundo C57BL/6 infectados com *Leishmania amazonensis*. Os experimentos foram realizados nos tempos de duas, quatro e oito semanas após a infecção.

Os animais utilizados durante os experimentos foram mantidos sob condições de temperatura e fotoperíodo controladas, em espaço com barreiras ambientais. Foi oferecida ração convencional para camundongos (Labina,

Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Para os experimentos foram utilizados camundongos fêmeas com idade entre quatro a seis semanas.

Todos os procedimentos realizados com os camundongos estão em acordo e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob o protocolo 050/09.

3.2 – Parasitos

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em *Grace's Insect Medium* (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco BLR Life Technologies). As culturas foram mantidas em estufa BOD (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 25°C, e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Após a décima passagem, os parasitos foram novamente isolados das patas de camundongos BALB/c, previamente infectados. Para o isolamento das culturas, os animais foram anestesiados com 100 µL de solução anestésica contendo cloridrato de ketamina (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) a 15 mg/mL e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/mL, e tiveram suas patas higienizadas com álcool. Em seguida, com o auxílio de uma seringa contendo uma agulha de calibre 26 G $\frac{1}{2}$, as patas foram puncionadas, e o conteúdo da seringa foi transferido para o primeiro poço de uma placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 200 µL de meio *Grace's* (GIBCO) completo.

Posteriormente, foram transferidos 50 μ L do conteúdo do primeiro poço para o segundo poço e deste para o terceiro, e assim sucessivamente. A placa foi, então, selada e mantida em estufa BOD a 25°C. Após sete dias, formas promastigotas de *Leishmania* foram recuperadas da placa e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm³ (TPP).

3.3 – Infecção dos camundongos por *Leishmania amazonensis*

Para realização de infecção intra-dérmica foram utilizadas 10⁴ formas metacíclicas do parasito, com quatro dias de cultura. As promastigotas metacíclicas foram obtidas por separação de parasitos da fase estacionária através de gradiente de densidade como descrito anteriormente (SPATH; BEVERLEY, 2001). Em síntese, as culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a 2.000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento recuperado em 2 mL de PBS (NaCl xM tamponado com fosfato xM, pH 7,3), sendo este transferido para um tubo contendo gradiente de Ficoll (Ficoll® 400, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA), o qual é composto por uma fase de Ficoll 20% e uma fase de Ficoll 10%. Esse material foi centrifugado a 1.250 x g por 10 minutos a 4°C, e a fase contendo as formas metacíclicas foi coletada e lavada duas vezes com PBS antes de ser usada para a infecção. O volume do inóculo injetado na orelha dos camundongos foi de 10 μ L. A lesão induzida na orelha desses camundongos foi acompanhada semanalmente, com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett, Itu, SP, Brasil).

3.4 – Quantificação de parasitos

A quantificação de parasitos foi realizada pela técnica de diluição limitante (VIEIRA *et al.*, 1996), em que diluições sucessivas foram feitas a partir dos homogenatos das orelhas infectadas dos camundongos experimentais. Primeiramente, as amostras foram maceradas em um homogeneizador de tecidos estéril. O homogenato foi centrifugado a 140 x *g* por 4 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Esse sobrenadante foi centrifugado a 2000 x *g* por 15 minutos. O sedimento foi suspenso em 200 µL de meio Grace's (GIBCO). Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços e fundo chato (TPP), foram colocados 150 µL/poço de meio de Grace's (GIBCO) completo, exceto na primeira coluna de poços, onde foi colocada 200 µL da suspensão do órgão macerado. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas 1:4, tomando-se o cuidado de trocar o conjunto de ponteiros da pipeta multicanal a cada diluição para evitar o arraste de parasitas e um consequente resultado falso-positivo. As placas foram mantidas a 25°C em estufa BOD e a leitura dos resultados foi feita de 7-14 dias após o início da cultura.

3.5 – Extração de tecido para dosagem de citocinas na lesão

Nos tempos determinados para o estudo das lesões cutâneas, os camundongos foram sacrificados como descrito acima e as orelhas dos animais infectados e não infectados foram retiradas e congeladas a -70°C para posterior

dosagem de citocinas. Após o descongelamento dos tecidos, as orelhas foram pesadas e foi adicionada solução para extração de citocinas: 1 cápsula do inibidor de proteases (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) diluída em 50 mL de PBS, na proporção de 1000 µL desta solução para 50 mg de tecido. O tecido foi, então, macerado com homogeneizador elétrico e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, e congelado a -70°C até a realização do ELISA.

3.6 – Detecção de citocinas por ELISA

As dosagens de TNF e IL-10 a partir do sobrenadante do homogenato das células dos linfonodos e da orelha foram feitas com a utilização de kits (BD Pharmingen, São Diego, CA, EUA) exclusivos para a detecção dessas citocinas e o procedimento foi feito exatamente como recomenda o fabricante. O limite de detecção foi de 32 pg/mL nas três citocinas.

Para a detecção da IL-4, as placas de ELISA (Nalgene NUNC, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100 µL a 2 µg/mL do anticorpo monoclonal de captura 11B11, gentilmente cedido pelo Prof. Luís Carlos Crocco Afonso, (NUPEB, UFOP, Ouro Preto, MG, Brasil) e incubadas por 18 horas a 4°C. No dia seguinte as placas foram transferidas para estufa seca a 37°C por uma hora. Em seguida foi feito o bloqueio da placa com PBS 5% de soro fetal bovino (Nutricell, cidade, estado, país) por 1h. Passado esse tempo, as placas foram lavadas cinco vezes com uma solução de Tween (Sigma Aldrich) a 0,05% em PBS. O padrão foi colocado a uma concentração de 1 ng/mL em duplicata e diluído (1:2) nos

poços subsequentes para montagem da curva. Então, as placas foram incubadas por 2h a 25°C. As placas foram lavadas novamente por cinco vezes e adicionaram-se anticorpos BVD-6 biotilado, (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso). Incubou-se por 1h a 25°C. Depois de lavadas cinco vezes com Tween 0,05% em PBS, foi adicionado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso), seguido de incubação por 1h a 25°C. Após novo ciclo de lavagem, agora por 10 vezes, adicionou-se a solução substrato de TMB (3,3',5,5'-tetra-metil-1benzidina) (Sigma Aldrich) 0,05% em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 4,0) acrescido de H₂O₂ a 0,005%. Após acompanhar o aparecimento de cor, a reação foi parada com a utilização de dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich) a 1%. As placas foram lidas em um comprimento de onda de 405 nm com um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). O limite de detecção foi de 0,02 ng/mL.

A detecção de IFN- γ e MCP-1 foi feita a partir de kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as especificações do fabricante. O limite de detecção foi de 30 pg/mL. Para a dosagem de IL-17A seguimos as recomendações do kit da eBioscience, cujo limite de detecção é de 40 pg/mL (eBioscience) e para a detecção de IL-18 foi utilizado o kit da Invitrogen (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) seguindo as especificações do fabricante. O limite de detecção foi de 25pg/mL.

Para todas as citocinas e quimiocina supracitadas, foram utilizados 50 μ L de amostra por poço na placa.

3.7 – Detecção de mRNA por transcriptase reversa e PCR em tempo real (RT-PCR Real Time)

3.7.1 – Extração de RNA

O RNA total foi isolado das orelhas dos camundongos após a infecção com *L. amazonensis*. As mesmas foram coletadas e foi adicionado 1 mL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 100 mg de tecido. Os tecidos foram triturados completamente até formar um homogenato. No caso da extração de RNA de cultura de macrófagos derivados de medula-óssea lisamos as células após 24h em cultura, com ou sem estímulo a partir da adição de 600 µL de TRIZOL. A extração do RNA se deu da mesma forma para o homogenato do tecido ou da cultura celular. Ambas as amostras foram primeiramente incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Posteriormente, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) para cada mL de TRIZOL utilizado. As amostras foram homogeneizadas, incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior cor de rosa composta por fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permaneceu na fase aquosa, a qual foi transferida para um microtubo novo. Para precipitar o RNA da fase aquosa, foram adicionados 500 µL de isopropanol (Merck) para cada mL de TRIZOL utilizado, e a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado

foi lavado em 1 mL de etanol (Merck) 75% em água tratada com DEPC (USB Corp. Cleveland, OH, EUA) e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e permitiu-se que o precipitado secasse por 5 a 10 minutos. O RNA precipitado foi diluído em 50 µL de água de alta qualidade livre de RNase tratada com DEPC, e armazenado a -70°C. A quantificação de RNA foi realizada utilizando o espectrômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Foram consideradas apropriadas as amostras que apresentaram uma relação ácido nucléico/proteína (OD260/OD280) com valores entre 1,6 e 2,0.

3.7.2 – Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído como indicado acima. Foi utilizado um volume final de reação de 25 µL, contendo 2 µg de RNA, 250 nM dNTPs (Promega Corp. Madison, WI, EUA), 10 mM TRIS-HCL (pH8,3), 15 mM KCL, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT (Gibco BRL Life Technologies), RNAsin inibidor de RNase (Promega Corp.) e 0,75 pmoles de oligo (dT) 15 primer (Promega Corp.). A mistura foi levada a um termociclador, onde as amostras foram incubadas inicialmente por 5 minutos a 70°C e 5 minutos a 4°C. Após tal incubação, foram adicionadas, a cada amostra, 50 U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega Corp.). Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos a 23°C, 5 minutos a 4°C, 60 minutos a 37°C, 5 minutos a 90°C, e finalmente a 4°C até que as amostras fossem recolhidas do termociclador. O cDNA, produto da reação, foi armazenado a -20°C até sua amplificação.

3.7.3 – Amplificação específica por Real time PCR

A amplificação da expressão de mRNA específica foi realizada através de PCR em tempo real (RT-PCR) usando iniciadores com sequências específicas detalhadas na tabela 1. As reações foram desenvolvidas sob um sistema de detecção de sequência ABI PRISM®7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando 20% da reação de cDNA em volume total de 10 µL de mistura de PCR. Todas as reações foram desenvolvidas em triplicatas usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação relativa do produto foi determinada pelo método de limiar de ciclos para determinar o incremento em vezes do produto. O programa de PCR para amplificação de cDNA foi desenvolvido sob as seguintes condições: 2 minutos a 50°C, ativação da AmpliTaq a 95°C durante 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos. Para o anelamento e extensão final, as amostras foram submetidas a 60°C por 1 minuto durante 45 ciclos. Para a geração da curva de dissociação, as amostras foram aquecidas a 95°C por 15 segundos, em seguida a 60°C por 5 segundos. Finalmente, as amostras foram esfriadas por 1 minuto a 4°C. O gene de interesse foi normalizado em relação à expressão do gene da β -actina, que é expresso de forma constitutiva, baseado no cálculo do $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A mudança na expressão foi representada como relativa aos animais não infectados.

Gene	Foward	Reverse
β -actina	5'-AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA-3'	5'-TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT-3'
Arginase I	5'-CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT-3'	5'-CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT-3'

Tabela 2. Sequência dos primers.

3.8 – Citometria de fluxo

Orelhas de camundongos selvagens e IL-18 KO foram coletadas após infecção por *L. amazonensis*. As amostras foram cortadas em pedaços menores e incubadas por 1h 30min em 1 mL de meio RPMI (GIBCO) sem SFB contendo 62,5 μ g/mL de Liberase TL (Roche) e 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (Sigma Aldrich). Após este período foi adicionado mais 1 mL de RPMI 10% SFB por amostra. As amostras foram então maceradas, e o homogenato centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os precipitados das amostras foram incubados por 20 minutos a 4°C com anticorpo anti Fc- γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) e os seguintes marcadores de superfície: anti-Ly6G (clone 1A8); anti-Ly6C (clone HK1.4); anti-F4/80 (clone BM8) (eBioscience); anti-CD11c (clone HL3); anti-MHC II (clone M5/114,15,2); anti-CD11b (clone M1/70); anti-CD8 (clone 53-6.72); anti-CD3 (clone 145-2C11); anti-CD4 (clone GK1.5); anti-TCR- β (clone H57-497); anti-Foxp3 (clone MF23); anti-IL-18R(CD-218 α) (clone P3TUNYA) (eBioscience) e anti-NK1.1 (clone PK-136). Foi utilizado, também, o kit para avaliação de viabilidade celular LIVE/DEAD (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) seguindo as especificações do fabricante. Exceto quando especificado o contrário, todos os anticorpos utilizados foram da BD (BD Biosciences Pharmingen, São Jose, CA, EUA). Em seguida adicionamos 1 mL

de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 400 x *g* por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos. As amostras foram adquiridas logo em seguida. Cem mil eventos foram adquiridas para cada amostra de orelha, usando o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Bioscience). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

3.9 – Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea e infecção *in vitro* por formas amastigotas de *L. amazonensis* RFP+

As células da medula óssea foram obtidas a partir do lavado do fêmur e tibia dos camundongos selvagens e IL-18 KO com PBS complementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). Para diferenciação dos monócitos em macrófagos, estas células foram incubadas em placa de petri (Prolab, Osasco, SP, BR) por nove dias em meio DMEM F12 (GIBCO) complementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Nutricell), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929, que produzem o fator M-CSF. Após quatro dias em cultura adicionamos mais 5 mL do meio DMEM F12 (GIBCO); e depois de 3 dias descartamos 5 mL do sobrenadante da cultura e adicionamos mais 5mL de meio novo. Finalmente, após nove dias em cultura, os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado e então plaqueados em tubos de poliestireno (BD Bioscience) (ZHANG; GONCALVES; MOSSER, 2008). A infecção por *L. amazonensis* RFP+ na taxa de 1 macrófago para cada 5 amastigotas, foi realizada em suspensão. Após 24h de infecção realizamos a imunomarcagem dessas células (CD11b+F4/80+MHCII)

e adquirimos 10^5 macrófagos para cada condição utilizando FACSCanto™ II (BD Bioscience). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

3.10 – Detecção do receptor para IL-18 em de macrófagos derivados da medula óssea sob diversos estímulos

Para esse ensaio os macrófagos derivados de monócitos da medula óssea, como descrito anteriormente, foram plaqueados em tubos de poliestireno (BD Bioscience) e incubados por 24 horas na concentração de 10^6 células/mL na presença dos seguintes estímulos: 50ng/mL de IFN- γ (Sigma Aldrich), 100 ng/mL de LPS (InvitroGen, São Diego, CA, EUA), 100ng/mL de IL-18 (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 40ng/mL de IL-12 (BD Bioscience) e 40ng/mL de IL-4 (BD Bioscience).

Após a incubação, realizamos a imunomarcagem dessas células com anti-F4/80 (eBioscience); anti-CD11c; anti-MHC; anti-CD11b; anti-CD3 e anti-IL-18R (eBioscience). Quando não relatado, todos os anticorpos utilizados foram da BD Biosciences. Os controles foram feitos a partir do homogenato de células do baço de animais C57 BL/6 selvagens.

3.11 – Análise histopatológica

As lesões das orelhas foram removidas e fixadas em formalina tamponada com fosfato a 10% (pH 7,2), desidratadas e posteriormente diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes histológicos seriados de 5 μ m de espessura em micrótomo de rotação SPENCER (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), os quais foram montados em lâminas e corados segundo as técnicas de Hematoxilina-Eosina (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014). As análises histológicas foram desenvolvidas sob microscopia de luz usando de 100 a 400 vezes de aumento.

3.12 – Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão (EP) para cada grupo. Nos ensaios de cinética de produção de citocinas foi realizado o teste Two-Way ANOVA, seguido de Bonferroni para determinar diferenças entre os tempos e os grupos avaliados. Para determinar diferenças entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* de Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1- Análise do curso da infecção de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*

Sabendo que camundongos C57BL/6 são susceptíveis à infecção por *Leishmania amazonensis* (SOONG *et al.*, 1997), escolhemos esse modelo de infecção para verificar a participação da IL-18 na susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de lesões quando infectados por *L. amazonensis*. Com esse objetivo, infectamos camundongos selvagens e IL-18 KO, ambos no fundo C57BL6, com cepa PH8 de *L. amazonensis* e avaliamos o desenvolvimento da doença por até 8 semanas. Nossos dados mostraram que o camundongo IL-18 KO é mais resistente ao desenvolvimento das lesões quando comparado ao camundongo selvagem. A partir da segunda semana o animal selvagem apresenta um aumento progressivo da lesão em comparação com o IL-18 KO, sendo que a diferença entre as lesões se acentua após a quarta semana de infecção (entre 0,5 e 0,6 mm), se mantendo até a oitava semana (**Figura 1A**). O animal IL-18 KO apresenta lesão persistente até a oitava semana de infecção, porém a espessura da lesão é menor e não ulcerativa, quando comparadas às lesões cutâneas na orelha dos camundongos selvagens (**Figura 1B**).

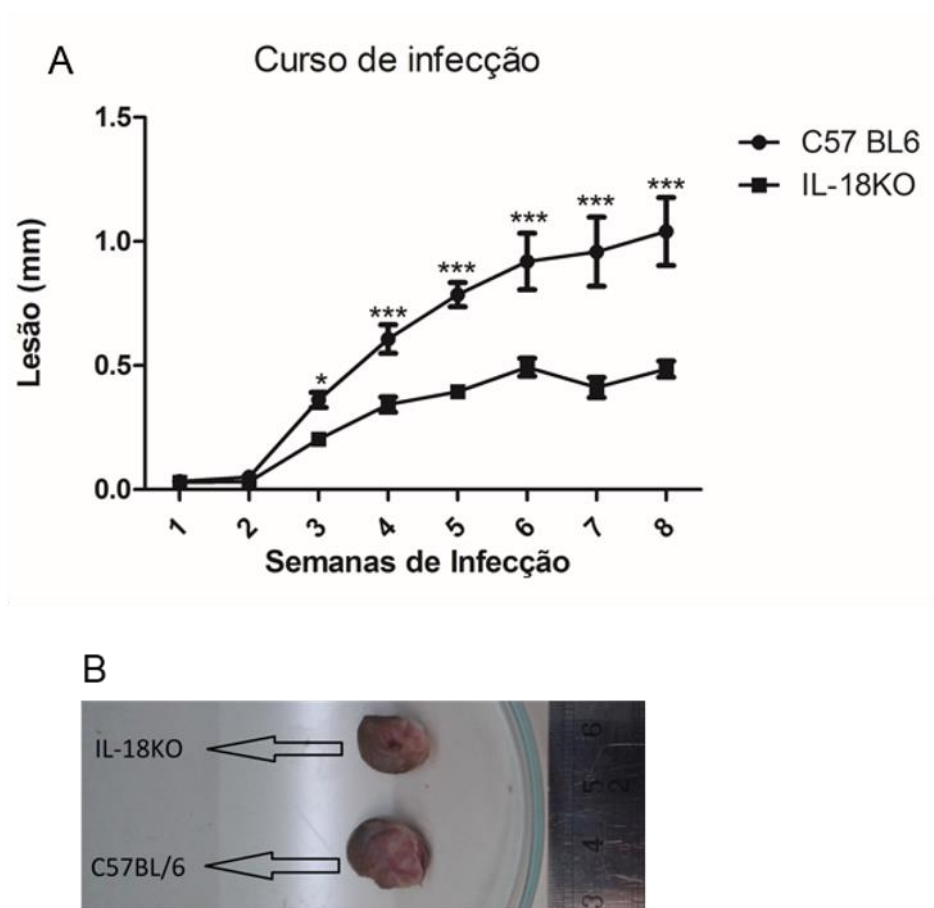


Figura 1. Desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*. Os camundongos foram infectados na orelha com 1×10^4 formas promastigotas de *L. amazonensis* e as lesões foram medidas semanalmente. **(A)** representa as medidas das orelhas dos camundongos C57BL/6 selvagens e IL-18KO até a oitava semana de infecção. A média dos valores das orelhas de camundongos não infectados foi subtraída de cada orelha infectada para estimativa das lesões provocadas. **(B)** representa uma imagem das lesões nas orelhas de camundongos selvagem e KO infectados após 8 semanas de infecção. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,001$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.2- Análise da carga parasitária das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*

Apesar da diferença nas lesões dos camundongos selvagem e IL-18 KO infectados por *L. amazonensis*, a análise da carga parasitária nos locais de infecção nos camundongos selvagens e IL-18 KO não mostrou diferenças do número de parasitos na lesão nos tempos analisados (**Figura 2A**). Os resultados das análises nos linfonodos drenantes (cervical superficial) (**Figura 2B**), também, não mostraram diferença no número de parasitas entre os grupos, nos tempos de duas, quatro, oito e doze semanas após a infecção.

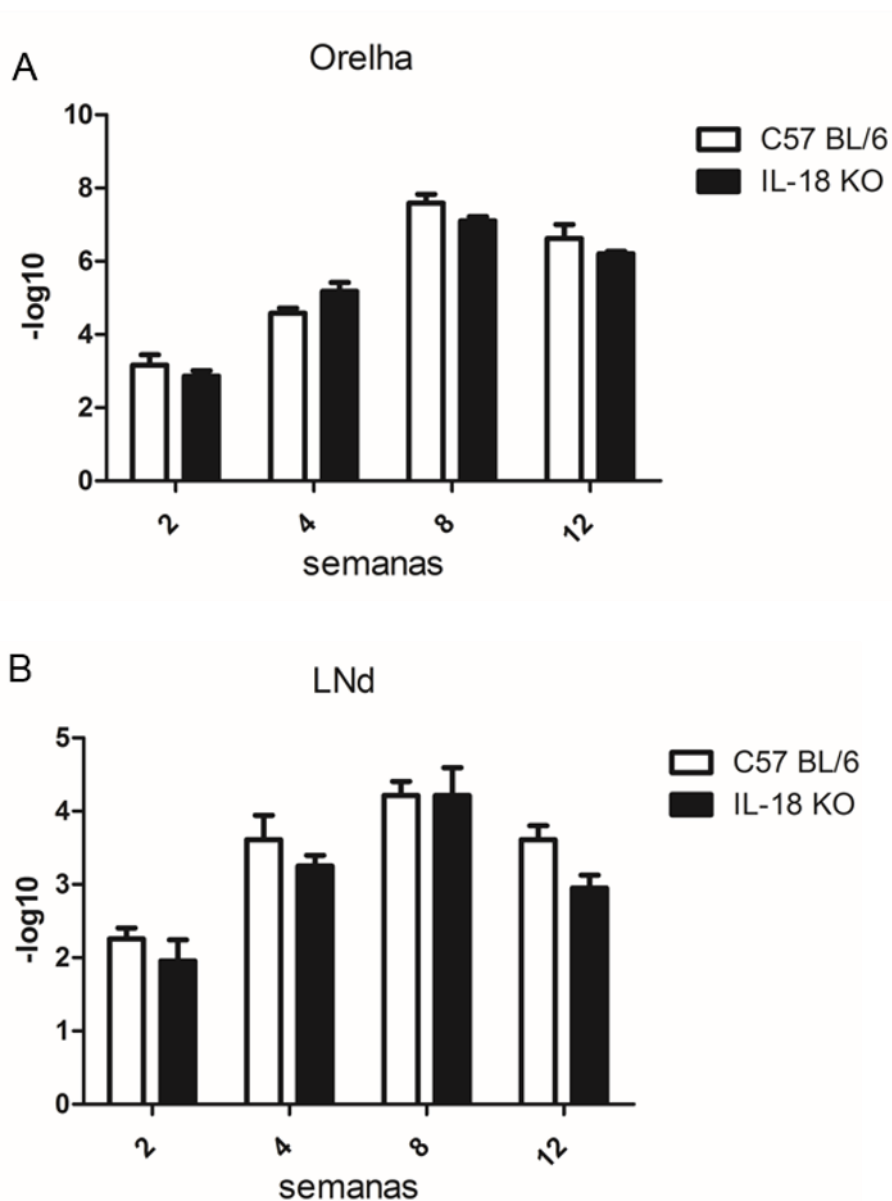


Figura 2. Carga parasitária nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *L. amazonensis*. Após duas, quatro, oito e doze semanas de infecção, os camundongos foram eutanasiados e as lesões foram removidas para determinação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante. A carga dos parasitos nos animais infectados (**A**) na orelha e (**B**) nos linfonodos drenantes foi determinada individualmente e as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição positiva). Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.3- Análises histopatológicas das lesões cutâneas de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*

Os resultados da observação microscópica das lesões dos camundongos, durante a infecção por *L. amazonensis*, mostraram que na segunda semana de infecção há uma discreta inflamação, com predomínio de neutrófilos, na orelha do camundongo IL-18 KO (**Figura 3B e Figura 3B1**) e que ainda não há inflamação aparente na orelha do camundongo selvagem (**Figura 3A e Figura 3A1**). Já na quarta semana de infecção, encontramos inflamação intensa tanto na orelha dos camundongos selvagens como na orelha dos camundongos IL-18 KO (**Figura 3C e Figura 3D**), com infiltrado inflamatório misto com neutrófilos (**Figura 3C1 e Figura 3D1**) e macrófagos vacuolizados repletos de amastigotas (cabeça das setas pequenas). Na oitava semana de infecção encontramos na orelha das duas linhagens um intenso infiltrado inflamatório misto e difuso, atingindo tanto a derme superficial e profunda (**Figura 3E e Figura 3F**). Há pontos significativos de necrose tanto na orelha de camundongos selvagens como na orelha de camundongos IL-18 KO, porém é aparentemente mais extensa na orelha do camundongo selvagem (N). Em maior aumento, nota-se um predomínio de macrófagos infectados, com vacúolos repletos de formas amastigotas da *Leishmania amazonensis*. Já na análise por citometria, encontramos um maior número de células nas lesões de camundongos selvagens, em comparação com as lesões de camundongos IL-18 KO, nos tempos de quatro e oito semanas após a infecção (**Figura 3G**).

Figura 3. Análises histopatológicas das lesões cutâneas de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonenses*. Figuras **A** e **B** – camundongos infectados por duas semanas. Orelha de WT sem inflamação aparente, **A1** detalhe de **A**. Em **(B)** observar orelha de IL-18 KO com inflamação discreta, focal. Em detalhe da figura em maior aumento (**B1**) evidenciando infiltrado inflamatório misto com neutrófilos (**cabeça de setas preta**). Já em camundongos infectados por 4 semanas, observar em **(C)** WT e **(D)** IL-18 KO inflamação intensa, difusa com área de necrose (**N**). A inflamação atinge regiões superficiais e profundas da derme ventral e dorsal da orelha, com aspecto mais espessado comparada ao fragmento de orelha em **(A e B)**. **C1 e D1** - Detalhe das figuras em maior aumento evidenciando infiltrado inflamatório misto com neutrófilos (**cabeça de setas preta e grande**), e macrófagos vacuolizados repleto de amastigotas de *Leishmania* (**cabeça de setas preta pequena**). Figuras **E** e **F** – camundongos infectados por 8 semanas. Observar em **(E)** WT e **(F)** IL-18 KO inflamação intensa, difusa atingindo derme superficial a profunda, do tipo exsudativa mista e presença de área de necrose (**N**) - Detalhe das figuras em maior aumento evidenciando infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos vacuolizados repleto de formas amastigotas de *Leishmania* (**cabeça de setas preta pequena**). EP – epiderme dorsal; C – cartilagem; INF - inflamação. A - F coloração pela H&E. Barra em A - F representa 62 μ m (50x) e detalhes A1 – F1 - 16 μ m (400 x). A análise de células totais vivas foi feita, também, por citometria de fluxo. Foi feita a marcação por AmCyan LIVE/DEAD e definida as populações totais de células vivas nas lesões dos camundongos selvagens e IL-18 KO (**G**).

4.4- Análise das citocinas IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*

Determinamos as concentrações das citocinas IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 nas lesões cutâneas nos tempos de duas, quatro e oito semanas após a infecção nos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *L. amazonensis*.

A **Figura 4** mostra as concentrações de citocinas IFN- γ (**A**), TNF (**B**), IL-12p70 (**C**) e IL-10 (**D**) no local de lesão.

Para IFN- γ os resultados mostraram concentrações similares de IFN- γ nas lesões dos camundongos selvagens e IL-18 KO nos tempos analisados (Figura 4A).

Para TNF, os resultados mostraram uma maior produção de TNF nas lesões dos camundongos IL-18 KO, a partir da segunda semana de infecção, quando comparadas as concentrações nas lesões dos camundongos selvagens (**Figura 4B**).

Na análise das concentrações de IL-12p70, os resultados mostraram maiores concentrações de IL-12p70 nas lesões dos camundongos IL-18 KO, a partir da quarta semana de infecção, em comparação aos camundongos selvagens (**Figura 4C**).

Para a IL-10, os resultados mostraram maiores concentrações de IL-10 nas lesões dos camundongos IL-18, a partir da quarta semana de infecção, quando comparadas as concentrações nas lesões dos camundongos selvagens (**Figura 4D**).

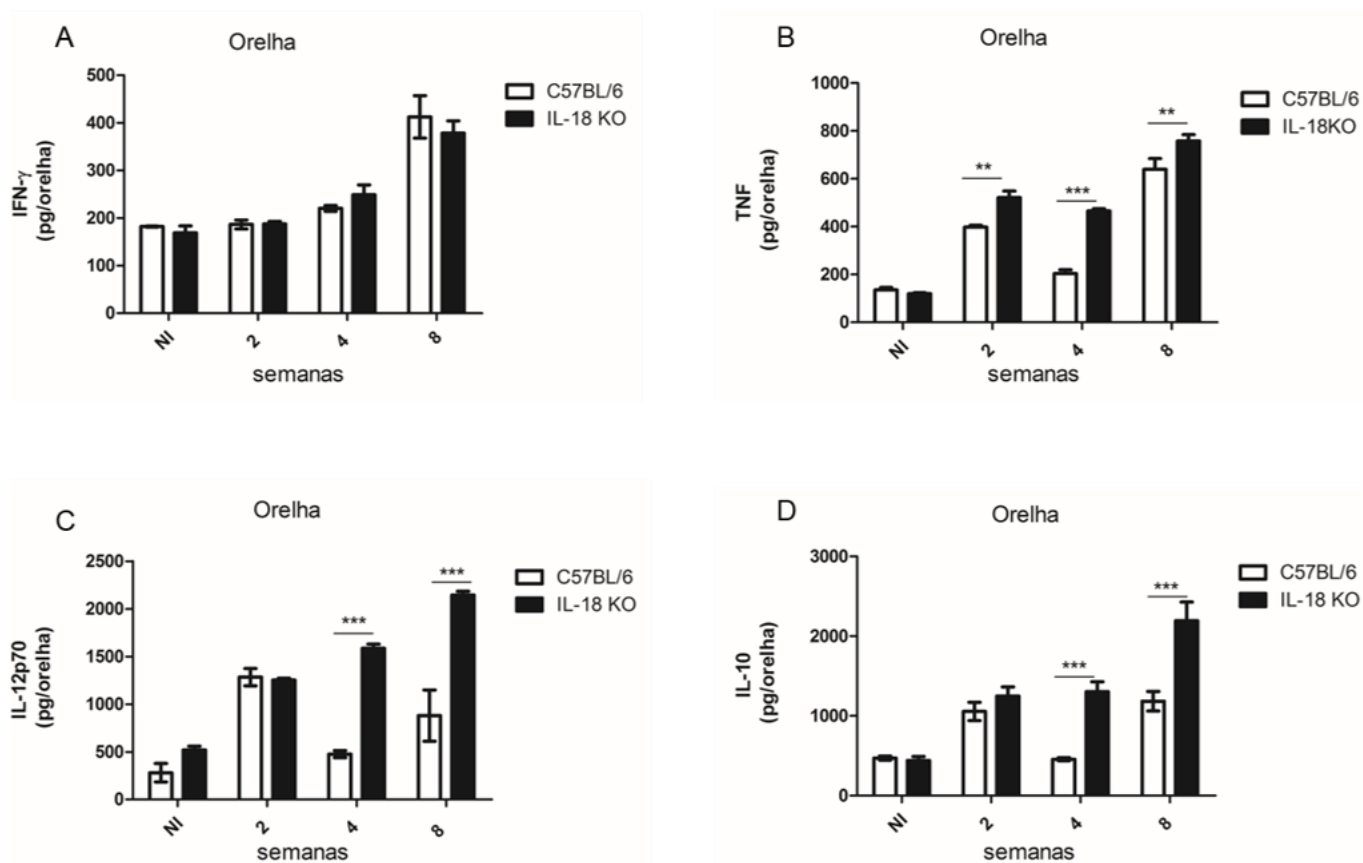


Figura 4. Avaliação das concentrações de IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*.

Camundongos selvagens e IL-18 KO (quatro por grupo) foram infectados com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis* na orelha direita e nos tempos indicados os camundongos foram sacrificados e as orelhas foram coletadas, maceradas em solução com inibidores de proteases e os níveis de (A) IFN- γ , (B) TNF, (C) IL-12p70 e (D) IL-10 foram determinados por ELISA. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de dois experimentos independentes. NI – Não infectado.

4.5- Análise das concentrações das citocinas IL-4, IL-17 e IL-18 e da quimiocina MCP-1 nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*

Analizamos as concentrações das citocinas IL-4 e IL-17 e da quimiocina MCP-1 nas lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 infectados com *L. amazonensis* após duas, quatro e oito semanas de infecção. Para a citocina IL-18, as análises foram realizadas apenas nos animais selvagens infectados com *L. amazonensis*. A **Figura 5** mostra as concentrações de citocinas IL-17 (**A**), IL-18 (**B**), IL-4 (**C**) e da quimiocina MCP-1 (**D**) no local de lesão.

Os resultados mostraram concentrações similares de IL-17 nas lesões entre camundongos selvagens e IL-18 KO nos tempos analisados (**Figura 5A**).

As análises das concentrações de IL-4 nas lesões, os resultados mostraram que as lesões dos camundongos IL-18 KO apresentam maiores concentrações de IL-4, na segunda e quarta semana de infecção, quando comparados aos camundongos selvagens. Entretanto, na oitava semana de infecção, as lesões dos camundongos selvagens, passaram a apresentar maiores concentrações de IL-4, quando comparadas as lesões dos camundongos IL-18 KO (**Figura 5B**).

Para a quimiocina MCP-1, os resultados mostraram menor concentração de MCP-1 nas lesões dos camundongos IL-18, apenas na segunda semana de infecção, quando comparados aos camundongos selvagens. Observamos, também, um aumento significativo de MCP-1, para ambos os grupos de camundongos infectados, na oitava semana de infecção (**Figura 5C**).

As análises das concentrações de IL-18 nas lesões dos camundongos selvagens infectados com *L. amazonensis* mostraram um aumento significativo dessa citocina ao longo do tempo analisado de infecção (**Figura 5D**).

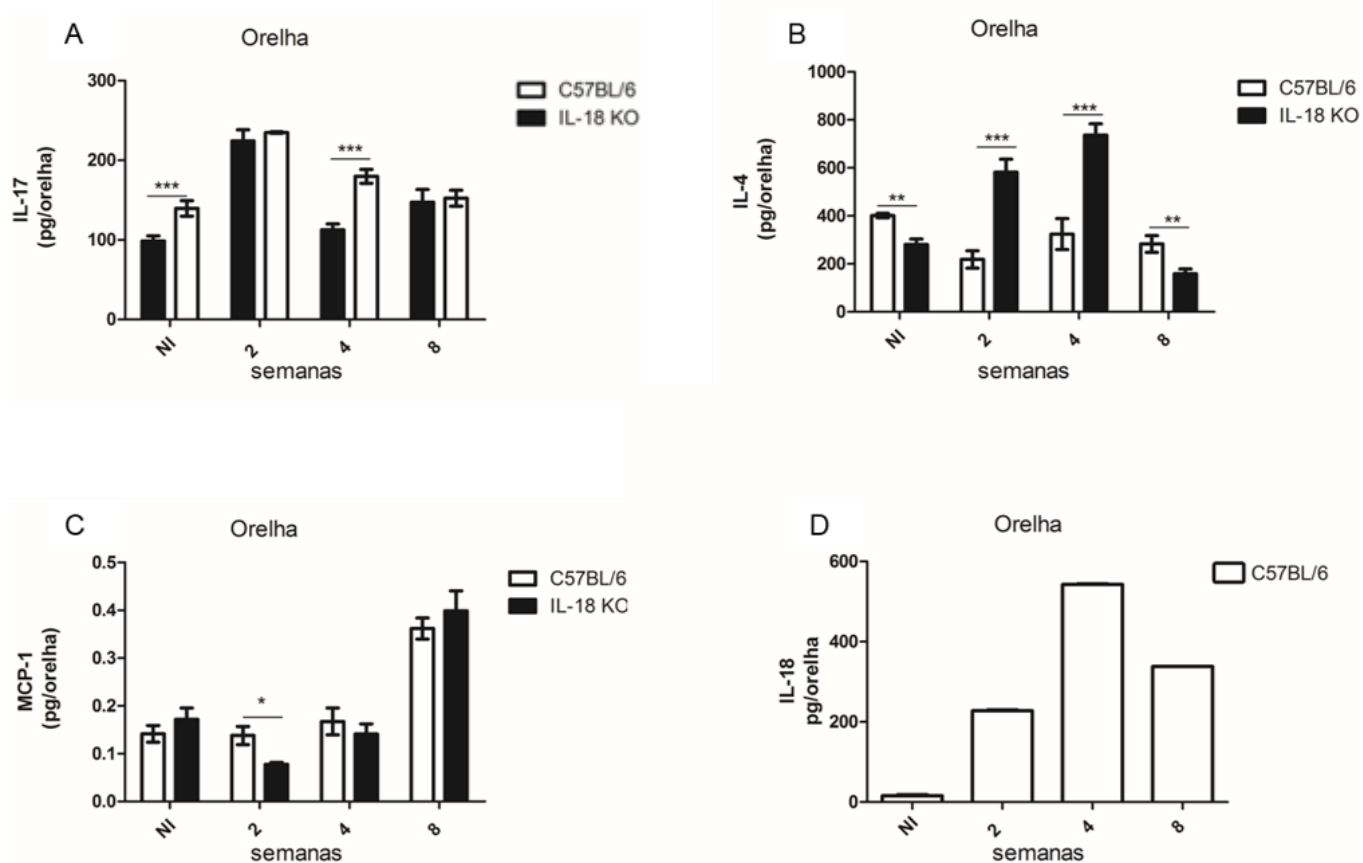


Figura 5. Análise das concentrações de IL-17, IL-18 e IL-4 e da quimiocinas MCP-1 nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*. Camundongos selvagens e IL-18 KO (quatro por grupo) foram infectados com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis* na orelha direita e nos tempos indicados os camundongos foram sacrificados e as orelhas foram coletadas, maceradas em solução com inibidores de proteases e os níveis de (A) IL-17, IL-4 (B), MCP-1 (C) e IL-18 (D) foram determinados por ELISA. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. No gráfico B $p < 0,001$ para os valores obtidos dos camundongos IL-18 KO, quando comparadas 2 semanas com 4 e 8, assim como entre 4 e 8 semanas. Os resultados são a média de dois experimentos independentes. NI – Não infectado.

4.6- Análise das citocinas TNF, IL-12p70 e IL-10 nos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*

Analisamos as concentrações de TNF, IL-12p70 e IL-10 nos órgãos linfoides secundários nos tempos de duas, quatro e oito semanas após a infecção nos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *L. amazonensis*.

A **Figura 6** mostra as concentrações de citocinas TNF (**A**), IL-12p70 (**B**), IL-10 (**C**) nos linfonodos drenantes.

Para TNF, os resultados mostraram uma maior produção de TNF nos linfonodos drenantes dos camundongos IL-18 KO, a partir da segunda semana de infecção, quando comparadas as concentrações nos linfonodos drenantes dos camundongos selvagens (**Figura 6A**).

Na análise das concentrações de IL-12p70, os resultados mostraram maiores concentrações de IL-12p70 nos linfonodos drenantes dos camundongos IL-18 KO, a partir da segunda semana de infecção, em comparação aos camundongos selvagens (**Figura 6B**).

Para a IL-10, os resultados mostraram maiores concentrações de IL-10 nos linfonodos drenantes dos camundongos IL-18, a partir da segunda semana de infecção, quando comparadas as concentrações nas lesões dos camundongos selvagens. Porém na quarta semana de infecção a concentração de IL-10 é similar entre os camundongos IL-18 KO e os camundongos selvagens (**Figura 6C**).

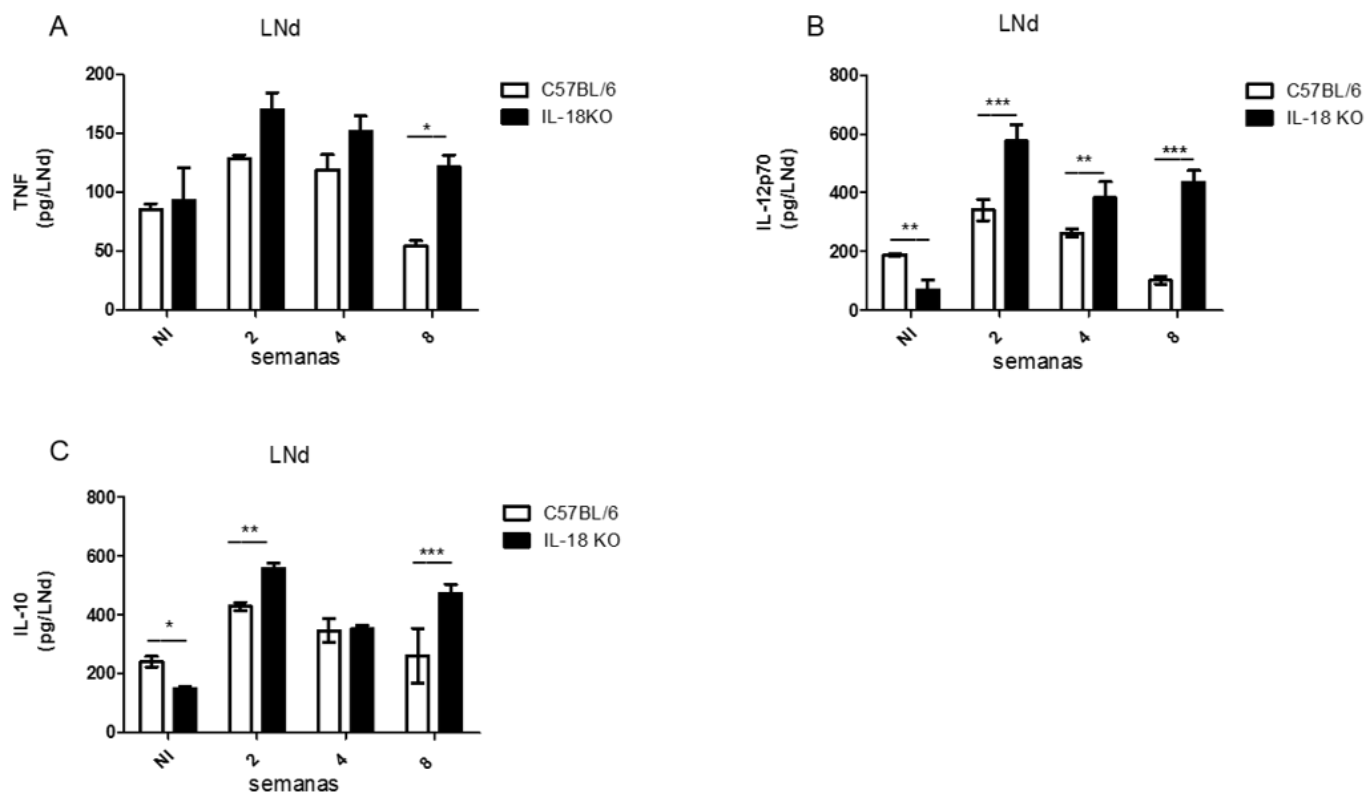


Figura 6. Análise das concentrações de TNF, IL-12p70 e IL-10 nos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*. Camundongos selvagens e IL-18 KO (quatro por grupo) foram infectados com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis* na orelha direita e nos tempos indicados os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes foram coletados, macerados em solução com inibidores de proteases e os níveis de **(A)** TNF, **(B)** IL-12p70 e **(C)** IL-10 foram determinados por ELISA. Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). As barras sem * é devido diferença não significativa(NS). Os resultados são a média de dois experimentos independentes. NI – Não infectado.

4.7-Avaliação dos Macrófagos e Monócitos presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*

Avaliamos nas células inflamatórias das lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO a presença de macrófagos e monócitos na segunda, quarta e oitava semana de infecção (**Figura 7**).

A análise do número absoluto de macrófagos (CD11b+Ly6G-Ly6C-F4/80+CD11c-) mostrou que estão presentes em quantidades similares na lesão nos camundongos selvagens e IL-18 KO nos tempos de duas e quatro semanas. Entretanto, os resultados mostraram que na oitava semana há mais macrófagos nos animais selvagens quando comparados aos KO (**Figura 7A**).

Ao analisarmos as porcentagens de células CD11b+Ly6G-Ly6C-F4/80+CD11c- nos tempos de duas, quatro e oito semanas encontramos nos camundongos selvagens as porcentagens 54,9%, 39,7% e 44,4%, desse fenótipo de células, respectivamente. Já nos camundongos IL-18 KO encontramos as porcentagens 39,2%, 22,7% e 42%, desse fenótipo de células, nos mesmos tempos analisados (**Figura 7C**).

A análise do número absoluto de monócitos inflamatórios (CD11b+Ly6G-Ly6C^{hi-int}) mostrou que estão presentes em maiores quantidades na lesão dos camundongos selvagens em comparação com as lesões de camundongos IL-18 KO em todos os analisados (**Figura 7B**).

Ao analisarmos as células CD11b+Ly6G-Ly6C^{hi/int} nos tempos de duas, quatro e oito semanas encontramos nos camundongos selvagens as porcentagens de 58,3%, 46,6% e 35,1% desse fenótipo celular,

respectivamente. Já nos camundongos IL-18 KO encontramos 26,1%, 42,2% e 64,7%, respectivamente, nos mesmos tempos analisados (**Figura 7D**).

Todas as porcentagens foram definidas pela quantidade de eventos dentro dos *gates* analisados e escolhidas com base na média das porcentagens.

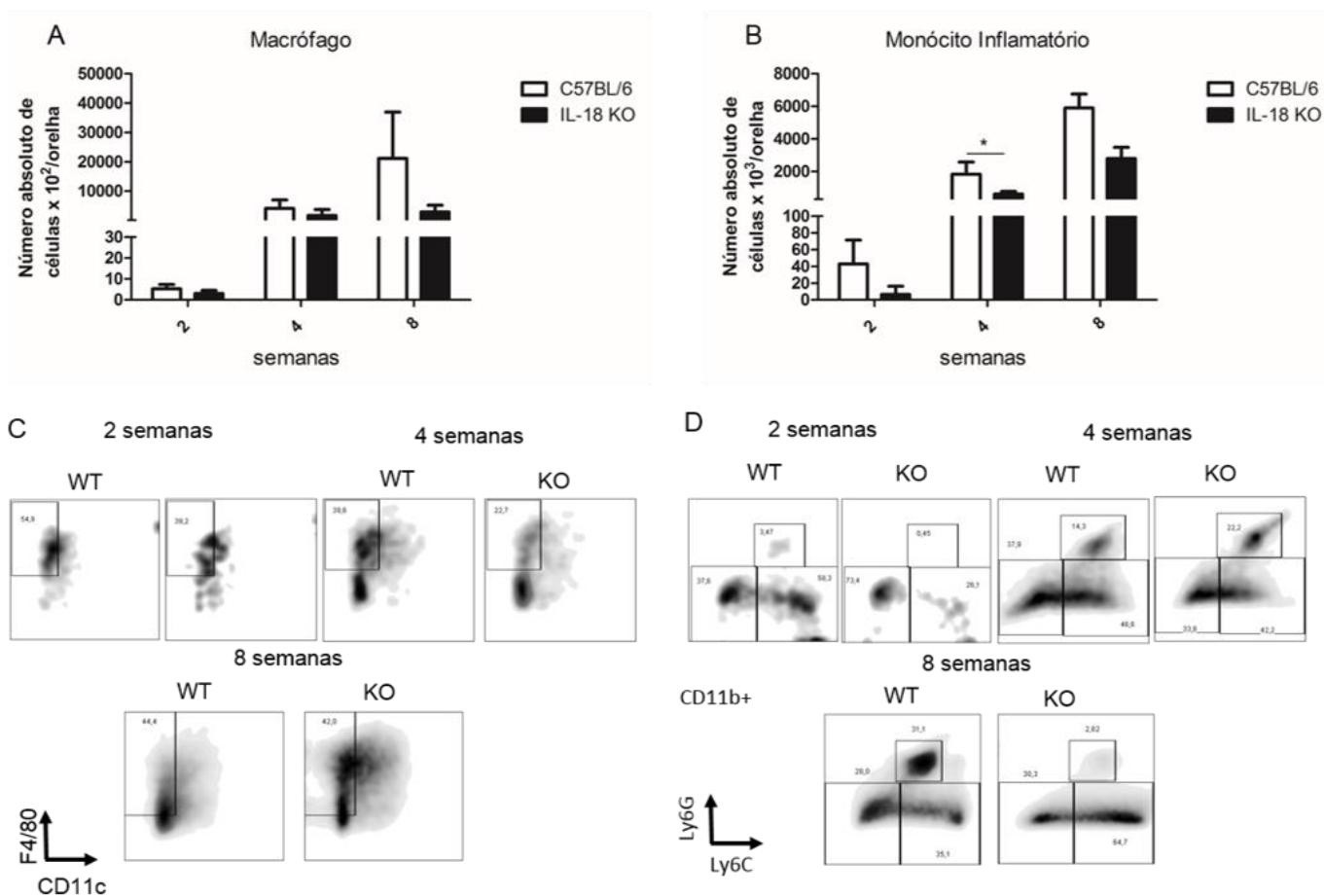


Figura 7. Avaliação de Macrófagos e Monócitos presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*.

Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. Após duas, quatro e oito semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. (A) Número absoluto de células representados pelo *gate* F4/80+CD11c-(Ly6G-Ly6C-). (B) Número absoluto de células representados pelo *gate* Ly6G-Ly6C^{Hi/int}(CD11b+). Barras representam a média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. (C) *dot plots* representam os *gates* das células F4/80+CD11c-(Ly6G-Ly6C-) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. (D) *dot plots* representam os *gates* das células Ly6G-Ly6C^{Hi/int}(CD11b+) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.8 Avaliações de Células Dendríticas e dos Neutrófilos presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*

Avaliamos nas células do infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO a presença de células dendríticas e neutrófilos na segunda, quarta e oitava semana após infecção (**Figura 8**).

A análise do número absoluto de células dendríticas (CD11b+Ly6G-Ly6C-MHCII+CD11c+) mostrou que as células dendríticas estão presentes em maiores quantidades nas lesões dos camundongos selvagens em comparação com as lesões de camundongos IL-18 KO em todos os tempos analisados (**Figura 8A**).

Ao analisarmos as porcentagens das células dendríticas CD11b+Ly6G-Ly6C-MHCII+CD11c+ nos tempos de duas, quatro e oito semanas encontramos nos camundongos selvagens as porcentagens de 18,3%, 36,6% e 51,8%, desse fenótipo de células dendríticas respectivamente. Já nos camundongos IL-18 KO encontramos as porcentagens de 8,71%, 12,2% e 39,3% nos mesmos tempos analisados (**Figura 8C**).

A análise do número absoluto de neutrófilos (CD11b+Ly6G+Ly6C^{int}) mostrou que há quantidades similares de neutrófilos na lesão dos camundongos selvagens e na lesão de camundongos IL-18 KO na segunda e quarta semanas de infecção. Porém, na oitava semana há mais neutrófilos nos animais selvagens quando comparados aos IL-18 KO (**Figura 8B**).

Ao analisarmos as porcentagens de células CD11b+Ly6G+Ly6C^{int} nos tempos de duas, quatro e oito semanas encontramos nos camundongos

selvagens as porcentagens de 3,47%, 14,3% e 31,1%, desse fenótipo celular, respectivamente. Já nos camundongos IL-18 KO encontramos as porcentagens de 0,45%, 22,2% e 2,82% nos mesmos tempos analisados (**Figura 8D**).

Todas as porcentagens foram definidas pela quantidade de eventos dentro dos *gates* analisados escolhidas com base na média das porcentagens.

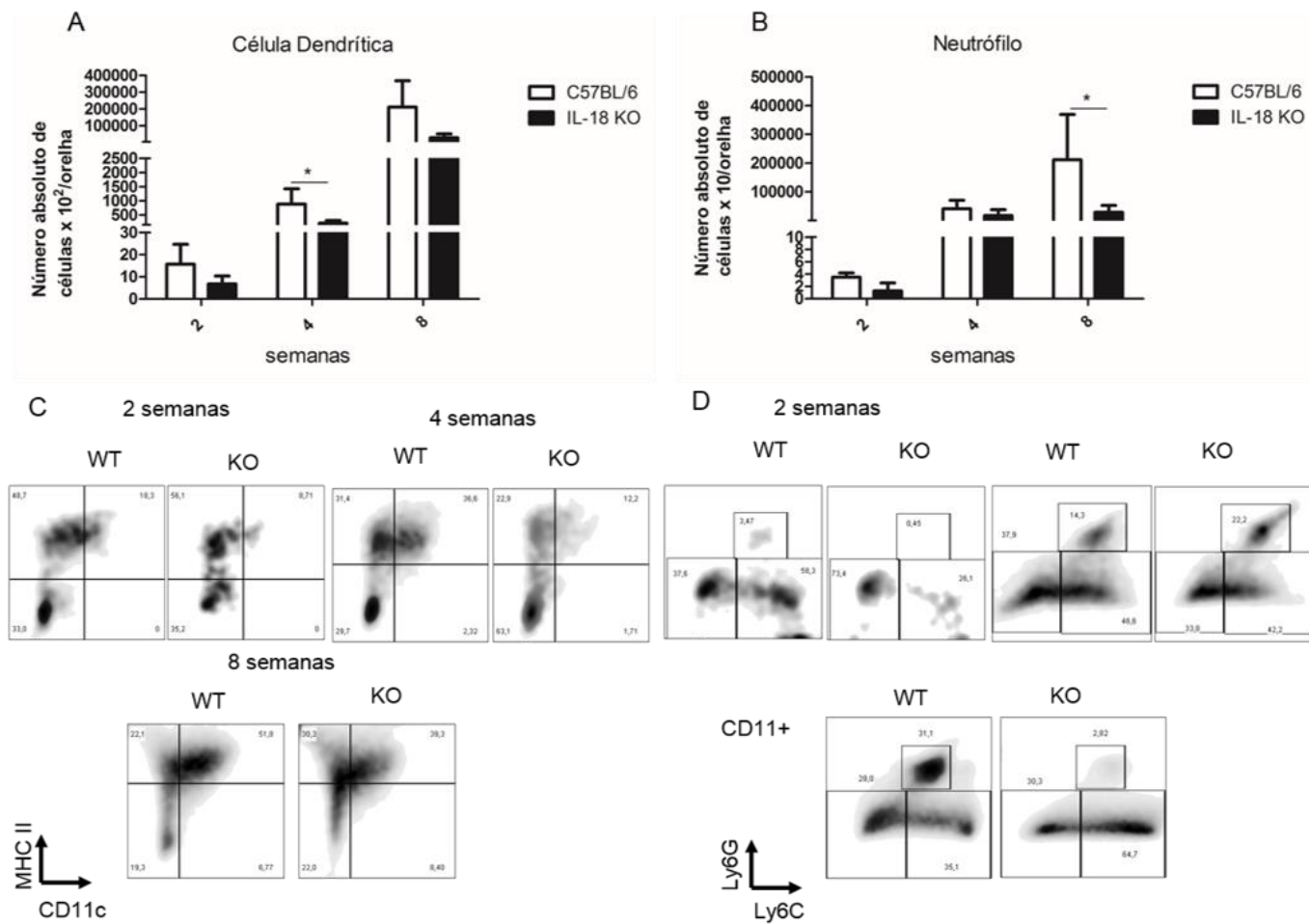


Figura 8. Avaliação das Células Dendríticas e Neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. Após duas, quatro e oito semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. **(A)** Número absoluto de células representados pelo *gate* MHC II+ CD11C+ (Ly6G-Ly6C-). **(B)** Número absoluto de células representados pelo *gate* Ly6G+Ly6C+ (CD11b+). Barras representam a média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. **(C)** *dot plots* representam os *gates* das células MHC II+ CD11C+ (Ly6G-Ly6C-) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. **(D)** *dot plots* representam os *gates* das células Ly6G+Ly6C+ (CD11b+) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.9-Avaliação das células *Natural Killer* (NK) presentes nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis* e cinética da expressão do receptor de IL-18

Avaliamos as células NK presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO na segunda, quarta e oitava semana de infecção (**Figura 9**).

A análise do número absoluto de células NK (NK1.1+CD3-) mostrou que essas células estão presentes em maiores quantidades na lesão dos camundongos selvagens em comparação com as lesões de camundongos IL-18 KO em todos os tempos analisados (**Figura 9A**).

Ao analisarmos as porcentagens de células NK1.1+CD3- nos tempos de duas, quatro e oito semanas encontramos nos camundongos selvagens as porcentagens de 9,59%, 20,9% e 27,1%, dessas células, respectivamente. Já nos camundongos IL-18 KO encontramos as porcentagens de 2,66%, 7,33% e 17,4% nos mesmos tempos analisados (**Figura 9B**).

A análise da expressão do receptor de IL-18 nas células NK, no tempo de duas semanas mostrou que 13,7% das células NK1.1+CD3-, nas lesões de camundongos selvagem, expressaram esse receptor. Entretanto, 0,76% expressaram o receptor de IL-18 nas células NK1.1+CD3- nas lesões de camundongos IL-18 KO. No tempo de quatro semanas a expressão foi de 9,04% no selvagem e 11,8% no KO. Na oitava semana 0,77% no selvagem e 3,29% no IL-18 KO. Dessa maneira, observamos um decréscimo na expressão do receptor para IL-18 nos camundongos selvagens e nos camundongos KO (**Figura 9C**).

Todas as porcentagens foram definidas pela quantidade de eventos dentro dos *gates* analisados escolhidas com base na média das porcentagens.

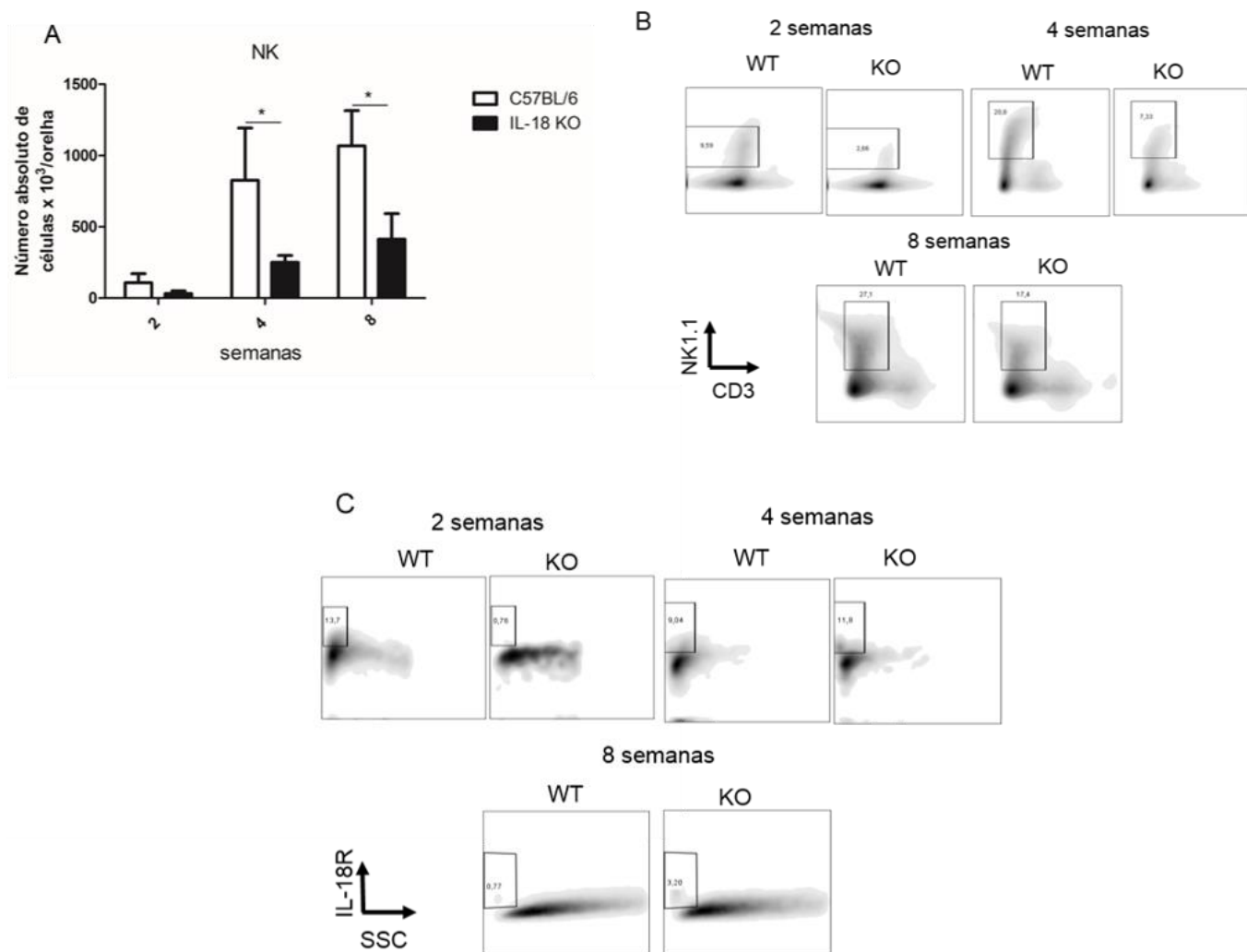


Figura 9. Avaliação das células NK presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis* e cinética da expressão do receptor de IL-18. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. Após duas, quatro e oito semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. **(A)** Número absoluto de células representados pelo *gate* NK1.1+CD3⁻. **(B)** *dot plots* representam os *gates* das células NK1.1+CD3⁻ da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Barras representam a média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. **(C)** *dot plots* representam os *gates* das células IL18R⁺ (NK1.1+CD3⁻) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.10-Avaliação das células T CD4+ presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis* e a cinética da expressão do receptor de IL-18

Avaliamos as células TCD4+, e a sua expressão do receptor da IL-18, nas células do infiltrado inflamatório presente nas lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO na segunda, quarta e oitava semana de infecção (**Figura 10**).

A análise do número absoluto dos linfócitos T CD4+ (CD3+CD4+) mostrou que estão presentes em quantidades similares na lesão dos camundongos selvagens IL-18 KO em todos os tempos analisados (**Figura 10A**).

Ao analisarmos as porcentagens de células CD3+CD4+ nos tempos de duas, quatro e oito semanas encontramos nos camundongos selvagens as porcentagens de 21,0%, 40,6% e 56,1%, dessas células, respectivamente. Já nos camundongos IL-18 KO encontramos as porcentagens de 15,7%, 36,3% e 57,2% nos mesmos tempos analisados (**Figura 10B**).

Na análise da expressão do receptor de IL-18 nos linfócitos T CD4+, os resultados mostraram que no tempo de duas semanas 4,14% das células CD3+CD4+, nas lesões de camundongos selvagem, expressaram o receptor. Entretanto, as análises mostraram expressão negativa do receptor de IL-18 nas células CD3+CD4+ nas lesões de camundongos IL-18 KO. No tempo de quatro semanas a expressão foi de 53,8% no selvagem e 49,0% no KO. Na oitava semana 42,4% no selvagem e 51,2% no IL-18 KO. Dessa maneira, observamos

que a expressão do receptor ocorre de maneira significativa após a quarta semana de infecção, se mantendo até a oitava semana (**Figura 10C**).

Todas as porcentagens foram definidas pela quantidade de eventos dentro dos *gates* analisados escolhidas com base na média das porcentagens.

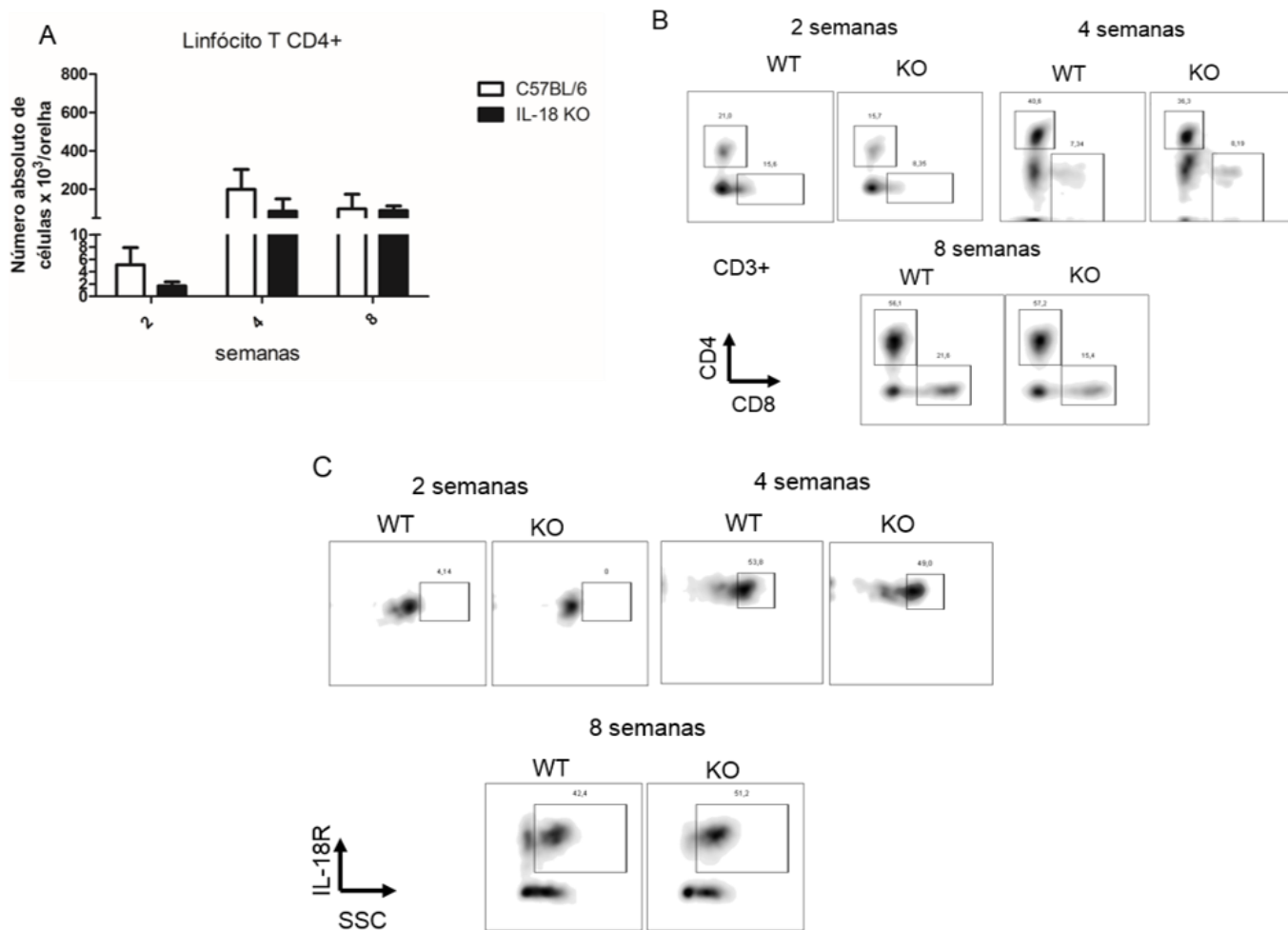


Figura 10. Avaliação das células T CD4+ presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis* e cinética da expressão do receptor de IL-18. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. Após duas, quatro e oito semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. **(A)** Número absoluto de células representados pelo *gate* CD4+CD8-(CD3+). **(B)** *dot plots* representam os *gates* das células CD4+CD8-(CD3+) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Barras representam a média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. **(C)** *dot plots* representam os *gates* das células IL18R+ (CD4+CD8-) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.11-Avaliação da presença de células T CD8+ no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis* e cinética da expressão do receptor de IL-18

Avaliamos a presença de células TCD8+, e a sua expressão do receptor da IL-18, no infiltrado inflamatório das lesões cutâneas de camundongos selvagens e IL-18 na segunda, quarta e oitava semana de infecção (**Figura 11**).

A análise do número absoluto dos linfócitos T CD8+ (CD3+CD8+) mostrou que essas células estão presentes em maior quantidade na lesão dos camundongos selvagens na segunda e quarta semana quando comparados com as células das lesões dos camundongos IL-18 KO. Entretanto, na oitava semana de infecção, os números de células TCD8+ foram similares. (**Figura 11A**).

Ao analisarmos as porcentagens de células CD3+CD8+ nos tempos de duas, quatro e oito semanas encontramos nos camundongos selvagens as porcentagens de 15,6%, 7,34% e 21,6%, desse tipo celular, respectivamente. Já nos camundongos IL-18 KO encontramos 8,36%, 8,19% e 15,4% nos mesmos tempos analisados (**Figura 11B**).

Na análise da expressão do receptor de IL-18 nos linfócitos T CD8+, no tempo de duas semanas, não encontramos expressão do receptor nas células CD3+CD8+ nas lesões de camundongos selvagem e IL-18 KO. Entretanto, no tempo de quatro semanas a expressão foi de 28,1% no selvagem e 49,0% no KO. Na oitava semana 15,7% no selvagem e 11,4% de expressão no IL-18 KO. Dessa maneira, observamos que a expressão do receptor ocorre de maneira significativa após a quarta semana de infecção, se mantendo até a oitava

semana no camundongo selvagem e com queda da expressão no camundongo IL-18 KO (**Figura 11C**).

Todas as porcentagens foram definidas pela quantidade de eventos dentro dos *gates* analisados escolhidas com base na média das porcentagens.

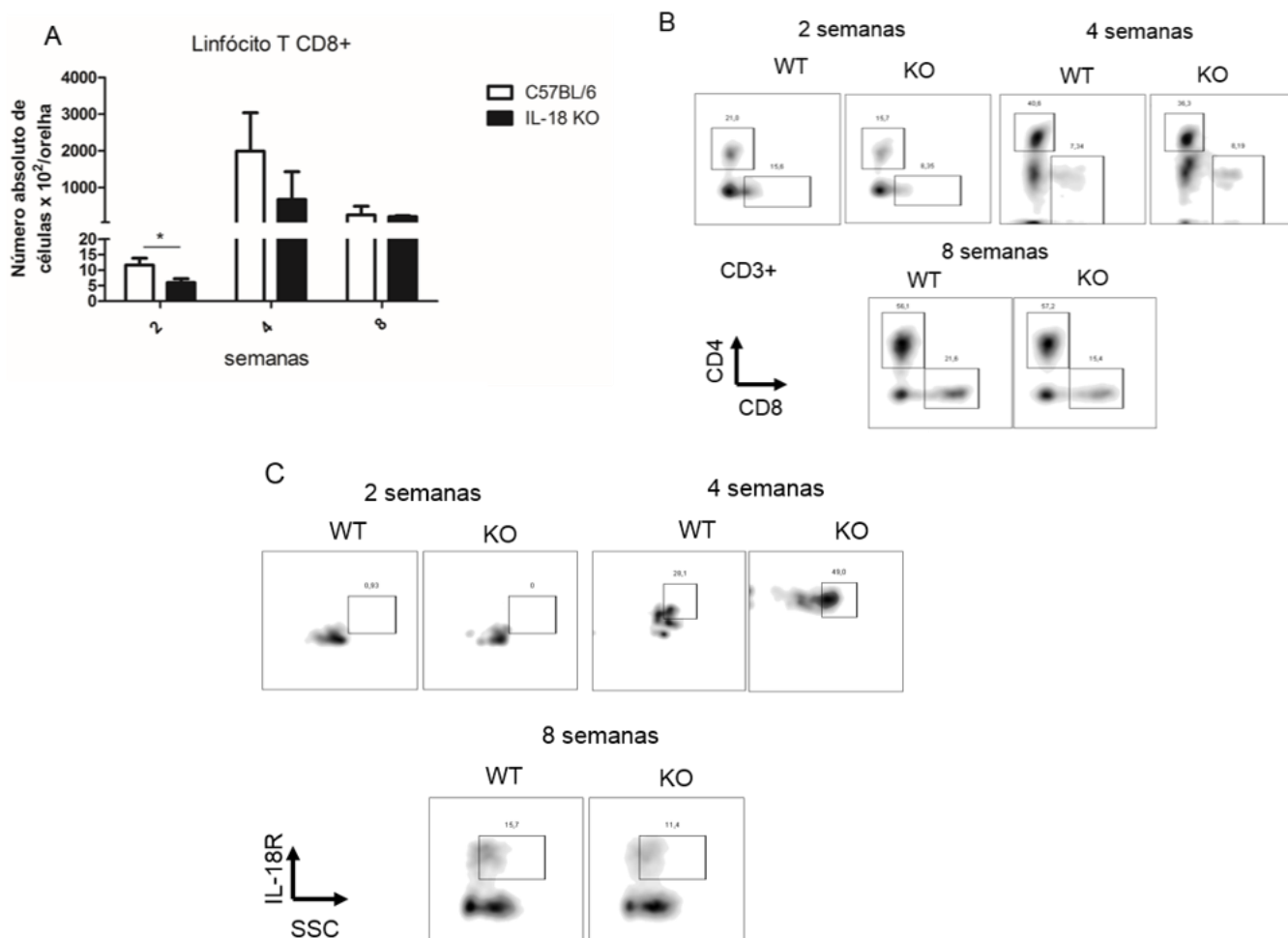


Figura 11. Avaliação de células T CD8+ presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis* e cinética da expressão do receptor de IL-18. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. Após duas, quatro e oito semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. **(A)** Número absoluto de células representados pelo *gate* CD4-CD8+(CD3+). **(B)** *dot plots* representam os *gates* das células CD4-CD8+(CD3+) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Barras representam a média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. **(C)** *dot plots* representam os *gates* das células IL18R+ (CD4-CD8+) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.12-Avaliação da presença de células T reguladoras (CD3+CD4+FoxP3+) no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*

Avaliação das células T regulatórias no infiltrado inflamatório das lesões cutâneas de camundongos selvagens e IL-18 na segunda, quarta e oitava semana de infecção (**Figura 12**).

A análise do número absoluto das células T reguladoras (CD3+CD4+FoxP3+) mostrou que essas células estão presentes em maior quantidade na lesão dos camundongos selvagens na segunda e quarta semana quando comparados com as células das lesões dos camundongos IL-18 KO. Entretanto, na oitava semana de infecção, os números de células T regulatórias foram similares. (**Figura 12A**).

Ao analisarmos as porcentagens de células CD3+CD4+FoxP3+ nos tempos de duas, quatro e oito semanas encontramos nos camundongos selvagens as porcentagens de 3,93%, 8,79% e 2,08%, dessas células, respectivamente. Já nos camundongos IL-18 KO encontramos 1,22%, 6,56% e 3,32% nos mesmos tempos analisados (**Figura 12B**).

Todas as porcentagens foram definidas pela quantidade de eventos dentro dos *gates* analisados escolhidas com base na média das porcentagens.

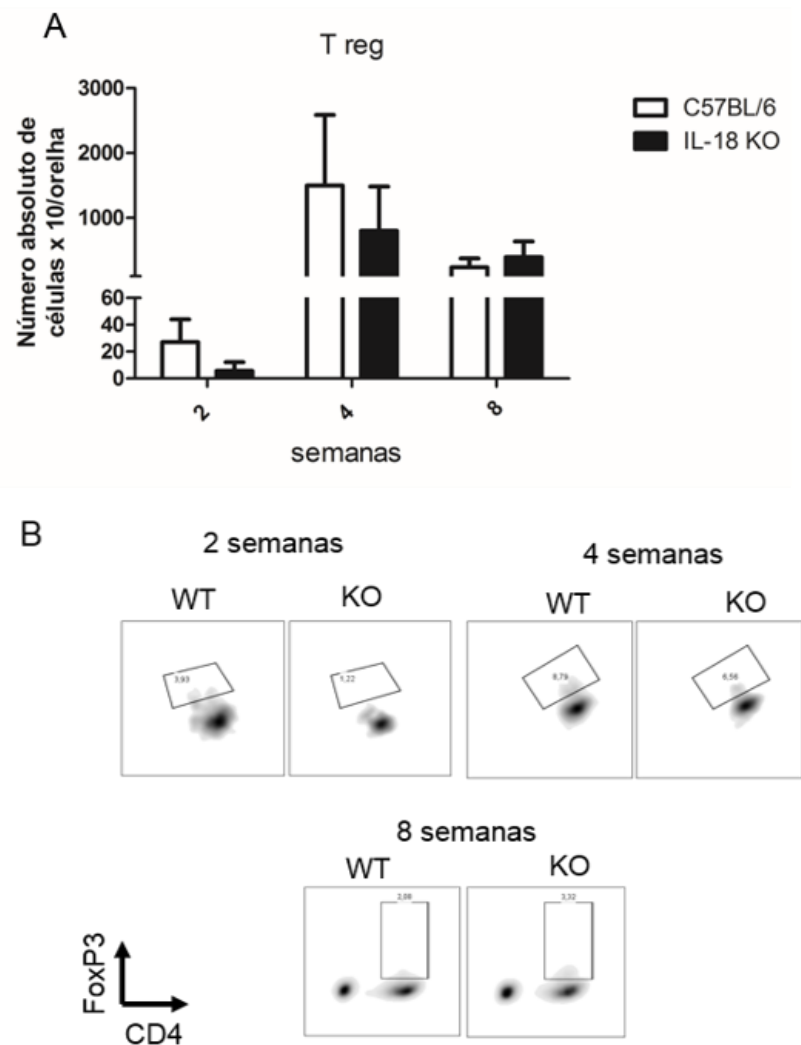


Figura 12. Avaliação de células T reguladoras presentes no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. Após duas, quatro e oito semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. **(A)** Número absoluto de células representados pelo FoxP3+CD4+(CD3+). **(B)** dot plots representam os gates das células FoxP3+CD4+(CD3+) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após duas, quatro e oito semanas de infecção. Barras representam a média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.13- Análise da fagocitose do parasito em macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO

Analizamos a capacidade dos macrófagos, derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO, de fagocitar a *Leishmania amazonensis* (**Figura 13**).

Ao plaquearmos os macrófagos e os infectarmos com cinco *Leishmanias* para cada macrófago, notamos que há menos macrófagos viáveis, tanto na linhagem selvagem, quanto nos camundongos IL-18 KO. As porcentagens de células vivas F4/80+CD11b+CD11c-MHCII- nos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos selvagens não infectados foi de 90,8% e nos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos IL-18 KO não infectados foi de 89,7%. Já nos macrófagos infectados, a taxa de células viáveis F4/80+CD11b+CD11c-MHCII- reduziu 50% nas duas linhagens (**Figura 13A**).

Os macrófagos foram infectados por *Leishmania amazonensis* que expressa uma proteína fluorescente vermelha (RFP+), podendo assim ser analisada por citometria de fluxo. Ao analisarmos o histograma vemos o pico com o macrófago não infectado abaixo de 10^3 , sendo assim, considerado RFP-. Os picos acima de 10^3 são, então, RFP+, ou seja, contém *Leishmanias*. Os picos dos macrófagos derivados da medula óssea de camundongo selvagens e IL-18 KO estão sobrepostos e com intensidade de fluorescência similares, o que indica que possuem quantidades próximas de *Leishmania amazonensis* em seu interior (**Figura 13B**).

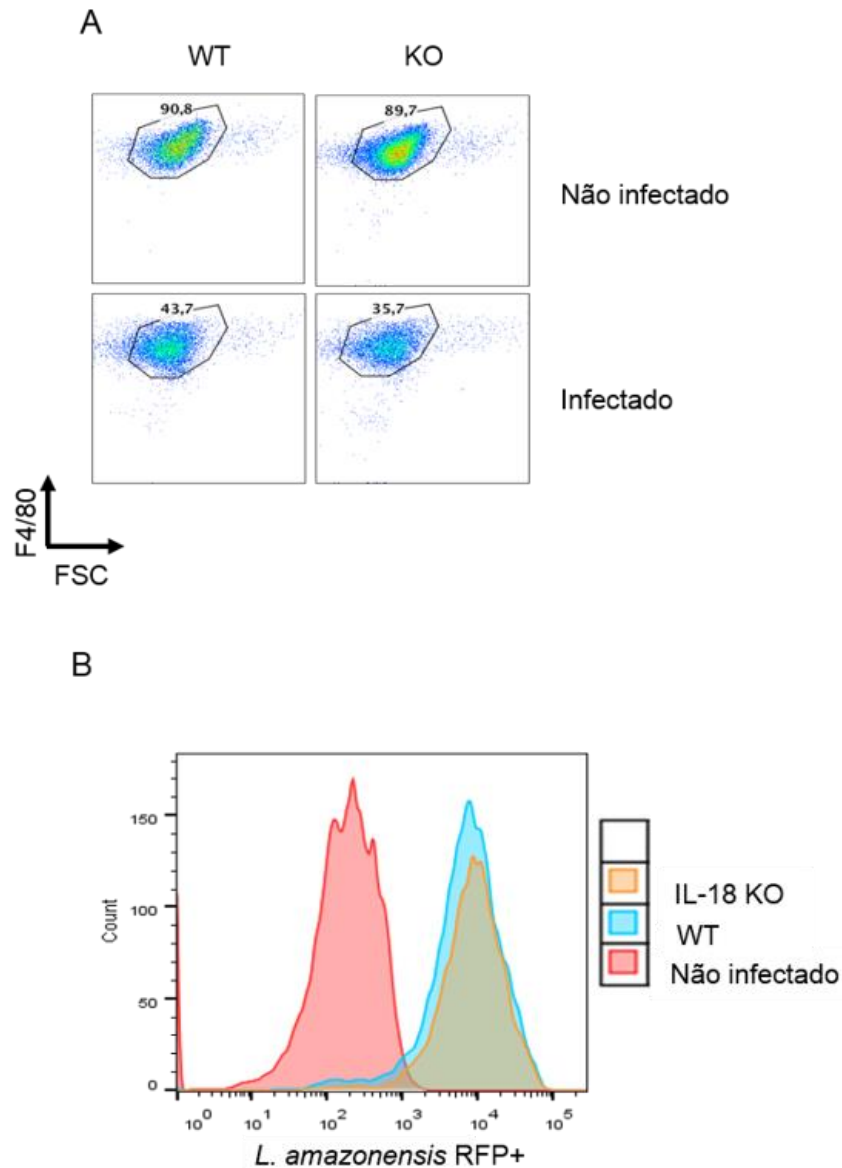


Figura 13. Avaliação da entrada do parasito em macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO. Os macrófagos foram derivados de medula óssea dos camundongos selvagem e IL-18KO. Foram plaqueados e infectados na proporção 1 macrófago para cada 5 *Leishmanias*. Foram usadas *Leishmania amazonensis* RFP+. Após 24 horas as células foram coletadas para a análise por citometria de fluxo. **(A)** dot plots representam os gates das células F4/80+(CD11b+CD11c-MHCII-) das células coletadas de uma das placas. **(B)** histograma representando as células RFP+ (acima de 10^3) e o controle RFP- (abaixo de 10^3). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.14-Avaliação da expressão do receptor de IL-18 em macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO

Avaliamos a expressão do receptor de IL-18 nos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens e IL-18 KO estimulados com IL-12 e IL-18, LPS, IL-4 e IFN- γ (**Figura 14**).

A Figura 14 A mostra o fenótipo F4/80+CD11b+CD11c-MHCII dos macrófagos derivados da medula óssea.

Realizamos, também, a marcação com anti-IL18R para verificar a expressão desse receptor nos macrófagos derivados de medula óssea. Como controle positivo da expressão de IL-18R utilizamos esplenócitos sem estímulo e estimulados com IL-12 e IL-18, LPS e IL-4 (**Figura 14B**). Já ao analisarmos os macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens e IL-18 KO não encontramos expressão significativa do receptor na presença dos estímulos, apenas na presença de LPS, em que 1,95% das células F4/80+CD11b+CD11c-MHCII- foram IL-18R+ nos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens e 2,66% foram IL-18R+ nos IL-18 KO. Essas porcentagens representam uma quantidade muito pequena de células (**Figura 14C**).

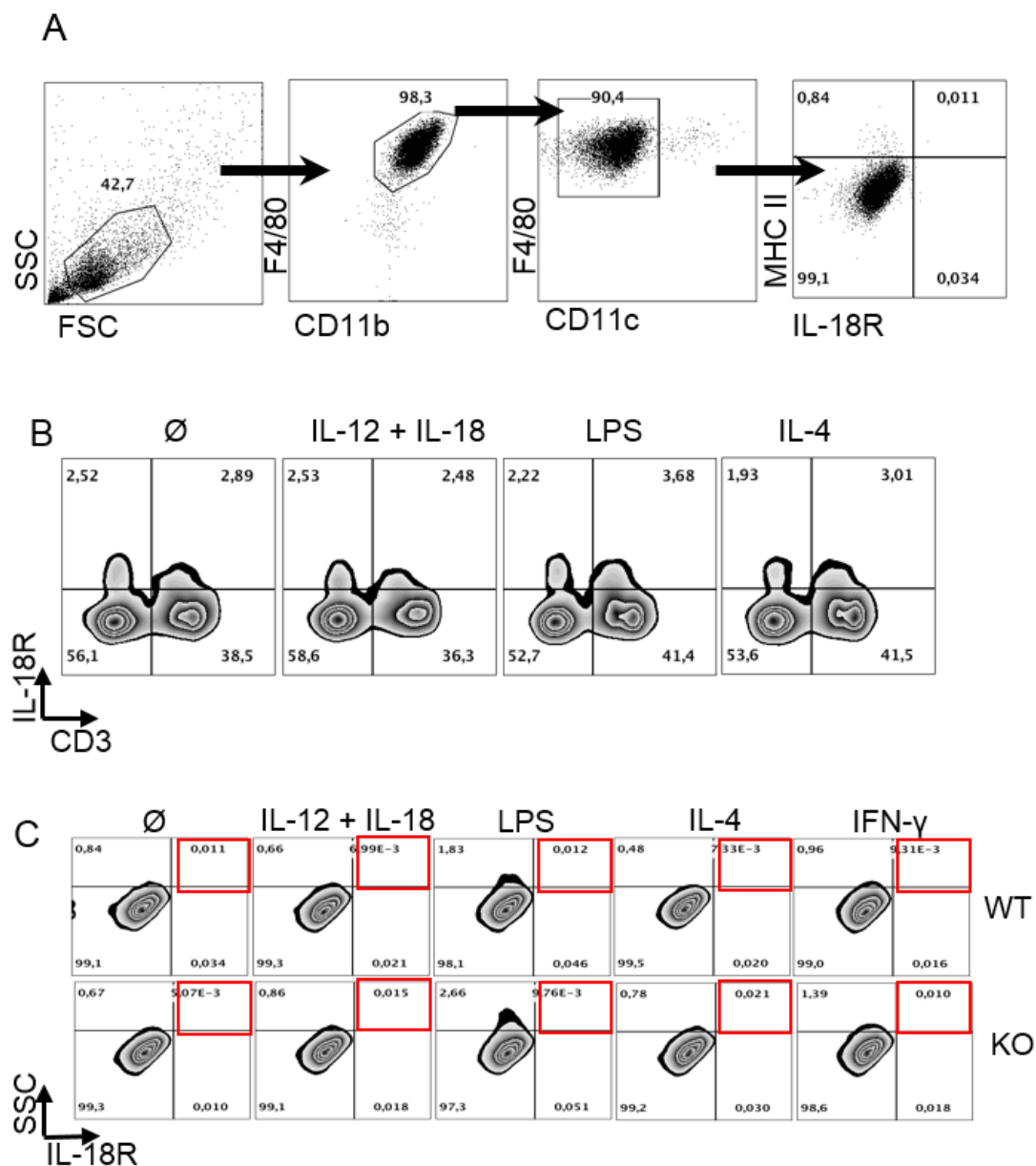


Figura 14. Avaliação da expressão do receptor de IL-18 em macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens e IL-18 KO. Os macrófagos foram derivados de medula óssea dos camundongos selvagem e IL-18 KO. Foram plaqueados e incubados com os estímulos 18 horas. Após 18 horas, as células foram coletadas para a análise por citometria de fluxo. **(A)** *dot plots* representam a estratégia de formação dos *gates* das células F4/80+IL-18R+(CD11b+CD11c-MHCII-) das células coletadas de uma das placas. **(B)** *dot plots* representando os controles IL-18R+ utilizando esplenócitos sem estímulo, estimulados com IL-12+IL-18, estimulados com LPS e estimulados com IL-4. **(C)** *dot plots* representando os macrófagos F4/80+IL-18R+(CD11b+CD11c-MHCII-) selvagens e IL-18 KO sem estímulo, estimulados com IL-12 + IL-18, estimulados com LPS, estimulados com IL-4 e estimulados com IFN- γ . Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente

4.15-Avaliação da expressão da enzima Arginase I nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*

Nossos resultados mostraram que as lesões dos camundongos selvagens e IL-18 KO, infectados por *L. amazonensis*, apresentaram números similares na carga parasitária, na fagocitose do parasito e expressão do receptor de IL-18 nos macrófagos. Dessa forma, avaliamos a expressão de Arginase I nos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis* nos tempos de 24 horas, 72 horas, duas, quatro e oito semanas após a infecção.

Os resultados mostraram maior expressão de Arginase I, em todos os tempos analisados da infecção, nas lesões dos camundongos selvagens quando comparados com os camundongos IL-18 KO (**Figura 15**).

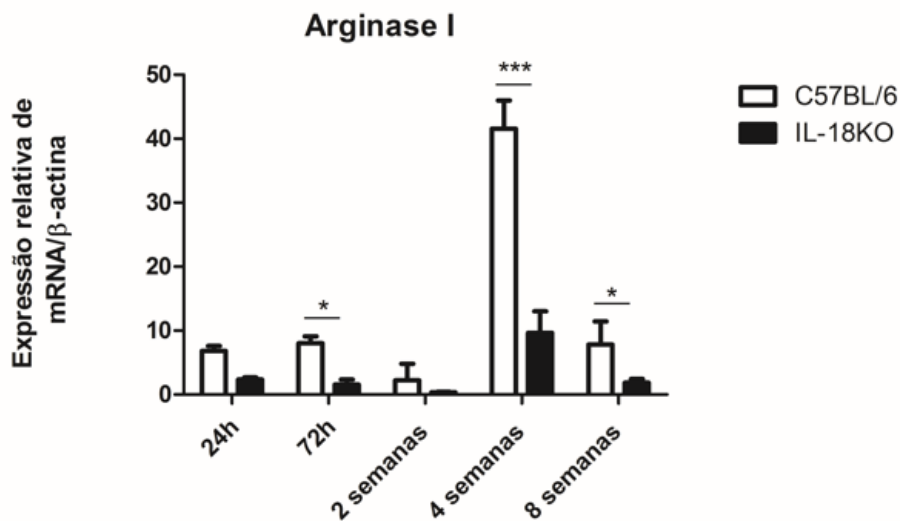


Figura 15. Avaliação da expressão da enzima Arginase I por RT-PCR real time na lesão de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*. Camundongos selvagens e IL-18 KO (quatro por grupo) foram infectados com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis* na orelha esquerda e nos tempos indicados os camundongos foram sacrificados e as orelhas foram coletadas e o RNA total foi isolado, transcrito e o gene da Arginase I amplificado por PCR tempo real. Os valores são mostrados como o aumento em vezes relativo à expressão da Arginase I na orelha de camundongos não infectados. Os dados são apresentados como média \pm para cada grupo. Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$). Os resultados são a média de dois experimentos independentes.

5-DISCUSSÃO

Por ser uma citocina que desempenha diversos papéis biológicos em células do sistema imune, a IL-18 é um dos fatores relevantes para determinar o desenvolvimento de diversas doenças, seja no sentido da cura ou exacerbação (DINARELLO, 2007; NOVICK *et al.*, 2013). Alguns exemplos: experimentalmente verifica-se um aumento na quantidade de IL-18 nos rins de camundongos MRL-*Fas^{pr}* com nefrite causada por lúpus, fator associado, também, à perda de função renal e desenvolvimento de glomerulonefrite (ESFANDIARI *et al.*, 2001; FAUST *et al.*, 2002). Ao utilizar camundongos caspase-1 KO, nota-se uma redução tanto de IL-1 β como de IL-18, porém, no modelo de colite, ao analisar o camundongo deficiente para IL-1 β , este é suscetível, enquanto o caspase-1 KO é resistente (BERSUDSKY *et al.*, 2014). Quando o animal selvagem é tratado com anti-IL-18 torna-se resistente ao desenvolvimento de colite, mas quando tratado com antagonista para o receptor de IL-1, não (SIEGMUND *et al.*, 2001a; SIEGMUND *et al.*, 2001b). Num modelo utilizando animais IL-18 KO infectados com *Trypanosoma cruzi*, observou-se que os camundongos KO apresentavam níveis aumentados de IL-12 e IFN- γ , além de uma redução significativa no infiltrado de leucócitos e menor carga parasitária no miocárdio quando comparados aos animais selvagens. Esses resultados nos levam a crer que a IL-18 está envolvida na patogênese da doença de Chagas (ESPER *et al.*, 2014). Em humanos, inibidores de caspase-1 ou inibidores de IL-18 são utilizados para o tratamento da artrite reumatoide, sendo observada uma redução dos sintomas após o tratamento (GHAYUR *et al.*, 1997; RANDLE *et al.*, 2001). A IL-18 apresenta papel bastante diverso, pois na presença de IL-12 ou

IL-15, induz a produção de IFN- γ , o que leva a uma resposta Th1. Dessa forma age exacerbando processos inflamatórios, um cenário que pode ser tanto de cura como de agravo do processo patológico. Porém, na ausência de IL-12 e IL-15 e na presença de IL-3, a IL-18 tende a estimular a polarização de células T *naïve* para um fenótipo Th2 (NAKANISHI *et al.*, 2001). Devido a essa característica dual, em doenças em que a inflamação faz parte do processo patológico, a ausência de IL-18 tende a amenizar os sintomas e a gravidade da doença, como acontece na artrite induzida por colágeno, lúpus e aterosclerose no camundongo ApoE, onde nota-se diminuição da inflamação, diminuição da ocorrência de nefrite e aumento de colágeno nos vasos, respectivamente (BOSSU *et al.*, 2003; MALLAT *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2001). Seguindo essa lógica, qual seria o papel da IL-18 no desenvolvimento das lesões cutâneas nos modelos experimentais de infecção por parasitas do gênero *Leishmania*?

Nas infecções por *Leishmania*, a inflamação é fator crucial para o desenvolvimento da lesão (KAYE; SCOTT, 2011). Já que camundongos KO para caspase-1, Myd88, Pycard e IL-1R apresentam lesões aumentadas quando comparados com os animais selvagens no fundo C57BL/6 (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013), como se comportaria o desenvolvimento da lesão na ausência da IL-18? Baseados nos modelos clássicos de infecção por *Leishmania* (AFONSO; SCOTT, 1993; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SCOTT *et al.*, 1988; SOONG *et al.*, 1997) esperávamos que, ao utilizarmos um camundongo IL-18 KO, teríamos uma lesão aumentada e maior carga parasitária, quando comparado ao camundongo selvagem, uma vez que a IL-18 está envolvida no aumento da produção de IFN- γ . Porém, encontramos uma lesão significativamente maior no camundongo selvagem quando comparado ao IL-18 KO desde a quarta semana

de infecção. Ao analisarmos a carga parasitária, surpreendentemente, encontramos o mesmo título de parasitos em todos os tempos analisados. Nos modelos de infecção por *Leishmania major* utilizando camundongos C57BL/6 foi mostrado que camundongos infectados quando tratados com IL-12 + IL-18 apresentavam lesão controlada nas patas infectadas e cura dessas lesões. Camundongos IL-18 KO apresentaram lesões progressivas (OHKUSU *et al.*, 2000). Porém, outro grupo, utilizando a mesma linhagem de camundongo infectados por *Leishmania major*, mostrou que após a quinta semana de infecção o animal IL-18 KO cura a lesão espontaneamente. O dado bastante interessante desse grupo é que, nos tempos de duas e dez semanas após a infecção, eles também encontram a mesma carga de parasitos entre os animais selvagens e IL-18 KO, apesar de encontrarem mais IFN- γ , nos mesmos tempos, e mais IL-12 e IL-4 na segunda semana de infecção nos camundongos IL-18 KO (MONTEFORTE *et al.*, 2000). Quando analisamos pacientes com a forma mucocutânea da leishmaniose, encontramos uma baixa carga parasitária, porém uma inflamação intensa, com lesões progressivas e necróticas (AMATO; DE ANDRADE; DUARTE, 2003; BOAVENTURA *et al.*, 2010; TUON *et al.*, 2014). Esses dados, juntamente com os nossos dados de medida de lesão e carga parasitária, abrem discussão para uma questão: será que o surgimento da lesão depende unicamente da carga de parasitos, ou dependeria, também, do orquestramento da resposta imune em Th1, Th2 ou Th17? E qual seria o papel da IL-18 nessa resposta imune?

Alguns trabalhos sugerem que a IL-18 apresenta um papel muito importante na cura de feridas, assim como na fibrogênese na pele. Mostrou-se que camundongos apresentam um aumento da expressão de IL-18 nos

primeiros sete dias após injúria na pele, sendo que na pele normal são encontrados níveis muito baixos dessa citocina. Outros estudos utilizando camundongos diabéticos db/db, também apresentam alta nos níveis de IL-18 durante o reparo tecidual (KAMPFER *et al.*, 1999; KAMPFER *et al.*, 2000). Em um trabalho com amostras de quelóide, notou-se que em comparação com a pele normal, o tecido com quelóide apresenta um aumento significativo nos níveis de IL-18 e de IL-18R α e IL-18R β . Associado aos altos níveis de IL-18, encontrou-se um aumento na secreção de colágeno e matriz extracelular (ECM) e angiogênese, assim como na secreção de citocinas profibróticas, como IL-6 e IL-8 e (DEBETS *et al.*, 2000; DO *et al.*, 2012). Ou seja, no camundongo suficiente para IL-18, talvez, haja uma produção excessiva de colágeno, assim maior dificuldade no remodelamento do tecido inflamado, favorecendo a progressão da lesão. Já no camundongo IL-18 KO, na ausência da citocina, outros fatores responsáveis por orquestrar o processo de cicatrização e remodelamento tecidual, sejam capazes de promover o remodelamento e contração da lesão através da deposição mais organizada do colágeno, assim como um equilíbrio entre a lise e a síntese de matriz extracelular por fibroblastos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; ROBSON; STEED; FRANZ, 2001; WITTE; BARBUL, 1997).

Já que a lesão nos camundongos selvagens é maior, fizemos uma análise do perfil celular inflamatório das duas linhagens de camundongos na lesão. Encontramos valores similares no número absoluto nas populações de macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, células dendríticas e células T reguladoras. Com relação ao número absoluto encontramos diferenças significativas principalmente nas populações de neutrófilos e células NK.

Analisamos, também, as porcentagens das células, pois dessa maneira teríamos uma visão das populações em cada linhagem de camundongos independentemente do número absoluto, o que facilitaria a visualização de diferença de migração ou manutenção de algum fenótipo celular específico. Porém, as populações entre os camundongos selvagens e IL-18 KO são bastante similar, exceto para as células NK, neutrófilos e células dendríticas. Um estudo em humanos demonstrou que monócitos tratados com IL-12 e IL-18 produziram algumas quimiocinas do tipo CXC, tais como CXCL8, CXCL9 e CXCL10, o que pode explicar a maior migração de neutrófilos nos camundongos selvagens, além da migração de linfócitos, apesar de não ter sido significativamente distinta entre as duas linhagens (COMA *et al.*, 2006). Também em humanos, a IL-18 promove acúmulo de neutrófilos no tecido inflamatório e maior expressão de mieloperoxidase (MPO). Quando feita a supressão de IL-18 em camundongos BALB/c após injeção de carragenina, notou-se o desenvolvimento de uma lesão menor quando comparada com a lesão do grupo tratado com o controle IgG (LEUNG *et al.*, 2001). Porém, o número de neutrófilos, no nosso experimento, é igual entre os selvagens e IL-18 KO na quarta semana de infecção, apesar de a lesão ser diferente. Também em humanos, sabe-se que a IL-18 está envolvida no aumento da expressão de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1. Células tratadas com IL-18 apresentaram aumento transiente na expressão dessas proteínas, sendo esse aumento dose dependente (MOREL *et al.*, 2001b). Assim, isso sugere que a diferença na lesão entre os animais selvagens e IL-18 KO seja devida à falha na migração celular ou na diminuição dos níveis de algumas quimiocinas, o que poderia explicar a quantidade de células aumentada encontrada nas lesões dos camundongos selvagens. Porém,

a diferença entre as populações inflamatórias não explica completamente a grande diferença do tamanho das lesões, sugerindo que haja outras populações celulares no sítio de infecção que possam estar favorecendo a diferença na lesão, já que manutenção das lesões vem do equilíbrio entre a inflamação e a o reparo do tecido. Alternativamente, há apenas um aumento no número de células migrando para o local da lesão, sem diferenças qualitativas. Em um modelo de infecção por *Leishmania major* e utilizando camundongos KO para o receptor 1 do TNF (TNFR1), apesar da queda na carga parasitária, o animal mantinha uma lesão exacerbada devido à sua incapacidade de realizar apoptose pela via do TNFR1. Ou seja, o *clearance* das células no local da lesão e resolução da inflamação, uma vez que houve diminuição do estímulo inflamatório, é também necessário para que haja diminuição da lesão (OLIVEIRA *et al.*, 2012). O cenário da lesão é bastante complexo, composto de células inflamatórias que migraram para o local da injúria, restos de células que foram destruídas no processo liberando diversos sinais de perigo como moléculas estritamente intracelulares. Além da resposta frente aos antígenos e aos sinais de perigo há, também, as células residentes e constituintes do tecido, como por exemplo, queratinócitos, fibroblastos e melanócitos. A esse cenário caótico, juntam-se as cascatas de coagulação e de ativação do complemento. Todos esses componentes geram, então, o cenário que irá formar a lesão. Logo, para sua resolução, não basta um infiltrado inflamatório competente (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; ROBSON; STEED; FRANZ, 2001).

Apesar de uma população de células inflamatórias similar, no geral, e quando não similar, menor nas lesões dos camundongos IL-18 KO, encontramos níveis aumentados de IL-12, TNF, IL-4 e IL-10 nas lesões desses camundongos.

Os níveis aumentados de IL-12 e IL-4 sugerem que não há uma polarização do tipo Th1 e Th2 nesses animais (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; XU *et al.*, 2000). Temos uma lesão menor com um perfil de citocinas inflamatórias aumentadas em relação ao camundongo selvagem, porém, com maiores níveis de IL-10, que provavelmente promove uma regulação da inflamação no sítio de infecção desses animais (KANE; MOSSER, 2001; SCHWARZ *et al.*, 2013). Talvez outras células, além das células inflamatórias na lesão, estejam contribuindo, também, na produção de algumas dessas citocinas, auxiliando na manutenção desse ambiente inflamatório com lesão controlada. Ao analisarmos os níveis de IL-18 na lesão de camundongos selvagens, encontramos um dado bastante interessante. Encontramos um aumento nos níveis de IL-18 na quarta semana de infecção, momento este em que há exacerbação da diferença entre as lesões dos camundongos selvagens e IL-18 KO. Ao analisarmos a expressão do receptor de IL-18 nas células CD4+ e CD8+, tanto nos animais selvagens quanto nos animais IL-18 KO, notamos que a expressão do receptor nessas células acontece na quarta semana de infecção, coincidindo com aumento nos níveis de IL-18 e com o aumento da lesão nos camundongos selvagens. Esse aumento dos níveis de IL-18 acontece, também, nos modelos de artrite reumatoide e lúpus, aumento concomitante com o agravamento da patologia (BOSSU *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 2001; YOSHIMOTO *et al.*, 1998). Porém, esse aumento de lesão não foi acompanhado de maiores níveis de citocinas inflamatórias. Além disso, quando analisada por histopatologia, tanto as lesões quanto ao infiltrado inflamatório são aparentemente iguais, exceto na oitava semana, onde encontramos mais necrose no camundongo selvagem quando comparado com o IL-18 KO. Mais uma vez, os resultados sugerem que a diferença nas lesões

desses animais selvagens e IL-18 KO não é apenas devida ao aumento do infiltrado inflamatório.

Alguns trabalhos mostraram que ao estimularmos macrófagos, sejam derivados de medula ou peritoneais, com IL-12 e IL-18 há um aumento da produção de IFN- γ , aumento esse visto apenas quando o estímulo é feito com as duas citocinas (MUNDER *et al.*, 1998; SCHLEICHER; HESSE; BOGDAN, 2005). Apesar das evidências, um outro grupo atentou para o fato de que não há estudos que mostrem a expressão do receptor de IL-12 ou IL-18 em macrófagos murinos, sugerindo que a produção de IFN- γ possa ser advinda de outros tipos celulares (GOLAB *et al.*, 2000; GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008). Como sabemos, os macrófagos são as principais células infectadas na leishmaniose (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002), desempenhando intenso papel quando ativadas, seja por respostas Th1 ou Th2, amplificando a resposta inflamatória e apresentando vasta capacidade efetora no sítio de infecção como no tecido em reparo (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). Resolvemos, então, analisar as diferenças entre os macrófagos derivados de medula dos camundongos selvagens e IL-18 KO. Ao olharmos a fagocitose do parasito notamos que não houve diferença na entrada desse parasito. Apesar da carga parasitária ser a mesma na lesão dos camundongos das duas linhagens, o que indicaria que a taxa de morte do parasito é similar na lesão dos camundongos selvagens e IL-18 KO, investigamos a expressão do receptor de IL-18 nas duas linhagens de macrófagos estimulados com LPS, IL-12 e IL-18, IL-4 e IFN- γ , porém não encontramos expressão significativa do receptor nos macrófagos derivados de medula das duas linhagens em nenhum dos estímulos. Em experimentos do nosso grupo utilizando *Western Blot* e *real time* RT-PCR, o

receptor de IL-18 também não foi encontrado (SOUSA et al., submetido para publicação). Continuando na análise das populações de macrófagos, investigamos a fagocitose do parasito por citometria, porém não encontramos diferenças na entrada da *L. amazonensis* nos macrófagos derivados de medula dos camundongos selvagens com os IL-18 KO. Ao avaliarmos a expressão de arginase I na lesão das duas linhagens de animais, encontramos uma maior quantidade na quarta semana de infecção nos animais selvagens, porém a carga parasitária nesse mesmo período de infecção é igual na lesão dos camundongos selvagens e IL-18 KO. O produto da arginase-I, a ornitina que age no sentido de reparo e cura tecidual, então, talvez seja uma tentativa de reparo da lesão que leve à expressão tão alta de arginase I nesses camundongos, porém sem sucesso, devido ao infiltrado inflamatório intenso (DZIK, 2014; MOSSER, 2003). Assim, mais uma vez os dados nos sugerem que o desenvolvimento da lesão nos camundongos IL-18 KO parece não se limitar à resposta frente ao parasito e ao infiltrado inflamatório, mas pode ser devido a um balanço entre inflamação e reparo tecidual.

Ao analisarmos a expressão do receptor de IL-18 nas populações de células da lesão nos animais selvagens e IL-18 KO (dados não mostrados), encontramos, na maioria das vezes, uma maior expressão nas células do camundongo IL-18 KO, o que sugere uma tentativa de tornar a célula mais sensível à citocina, já que na sua ausência não há sinalização dependente de IL-18. Talvez haja, também, uma ativação aumentada do inflamassoma, com a finalidade de produzir mais IL-18, mesmo sendo esse camundongo incapaz de produzi-la. Experimentalmente, sabe-se que a via do inflamassoma ativada pela *L. amazonensis* é a via da NLRP3 (LIMA-JUNIOR et al., 2013); uma vez ativada

essa a via, haverá formação da caspase-1 na sua forma ativa. A caspase-1 pode clivar a pro IL-1 e a pro IL-18, como pode, também, modificar uma série de outros precursores proteicos intracelulares, afetando o citoesqueleto celular, glicólise e função das mitocôndrias (KELLER *et al.*, 2008; SHAO *et al.*, 2007). Além da via de inflamação, a caspase-1 pode induzir diretamente um tipo de morte celular programada conhecido como piroptose (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; COOKSON; BRENNAN, 2001; GURCEL *et al.*, 2006; WREE *et al.*, 2014). O papel da piroptose *in vivo* ainda não foi bem descrito, porém sabe-se que nessa forma de morte celular há dano no DNA da célula, como na apoptose, porém, diferentemente, há a formação de poros e liberação de material intracelular (BRENNAN; COOKSON, 2000; FINK; COOKSON, 2005; FINK; COOKSON, 2006). Isso nos sugere que no camundongo IL-18 KO haja um desbalanço da ativação do inflamassoma, com excesso de formação de caspase-1 ativa, o que pode acarretar num robusto contingente de células em piroptose, gerando um ambiente inflamatório, devido extravasamento de conteúdo celular, porém, um ambiente com número decrescente de células.

Em resumo, nosso trabalho sugere que um camundongo que não produz a IL-18, apresenta uma lesão menor do que a do camundongo selvagem, porém com mesma carga parasitária, mas quantidade menor de células na lesão, com menos células NK, neutrófilos e células dendríticas. Macroscopicamente, apresenta lesão com menos necrose, porém ao corte histológico não se notam diferenças de infiltrado inflamatório entre as duas linhagens de camundongos. Temos maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias nos camundongos IL-18 KO, porém níveis maiores de IL-10.

6-CONCLUSÃO

A IL-18 é uma citocina bastante versátil, agindo tanto na promoção da inflamação, seja ativando células ou na migração celular para o sítio de infecção, como na regulação de mecanismos de reparo tecidual. O nosso modelo de infecção com um animal IL-18 KO abre possibilidades de investigação de diversos fatores que possam formar a lesão na leishmaniose e outras doenças de pele: reparo tecidual, balanço da inflamação, ativação de inflamassoma, piroptose e migração celular.

O presente trabalho mostrou que, provavelmente, os mecanismos de ação da IL-18 independem da ativação de macrófagos, já que esses não expressam IL-18R. Talvez por isso, no modelo de infecção por *Leishmania amazonensis*, não tenhamos encontrado diferenças significativas na carga parasitária. Além disso, encontramos níveis aumentados de IL-18 no animal selvagem no mesmo momento em que há exacerbação da lesão, o que leva a crer que a IL-18 tenha papel no desenvolvimento da patogênese na leishmaniose, por ser importante para a manutenção de um infiltrado inflamatório vasto. Porém, notamos que, mesmo na sua ausência, o organismo do camundongo ainda apresenta uma resposta inflamatória robusta, mas incapaz, também, de eliminar o parasito e curar a lesão. No camundongo IL-18 KO encontramos uma lesão mais controlada, talvez por um equilíbrio entre inflamação *versus* reparo tecidual, ou quem sabe um desequilíbrio nos mecanismos de ativação da piroptose.

Nossas observações da infecção do camundongo IL-18 KO possibilitam perspectivas de outros estudos sobre o desenvolvimento de lesões na leishmaniose, assim como o desenvolvimento de lesões em outras doenças de pele.

7. BIBLIOGRAFIA

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun.*, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993

AGOSTINI, L.; MARTINON, F.; BURNS, K.; MCDERMOTT, M. F.; HAWKINS, P. N.; TSCHOPP, J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity.*, v. 20, n. 3, p. 319-325, 2004

ALLEN, I. C.; SCULL, M. A.; MOORE, C. B.; HOLL, E. K.; MCELVANIA-TEKIPPE, E.; TAXMAN, D. J.; GUTHRIE, E. H.; PICKLES, R. J.; TING, J. P. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity.*, v. 30, n. 4, p. 556-565, 2009

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN, Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS.One.*, v. 7, n. 5, p. e35671-2012

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006

AMATO, V. S.; DE ANDRADE, H. F.; DUARTE, M. I. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.*, v. 85, n. 1, p. 39-49, 2003

ARLEHAMN, C. S.; PETRILLI, V.; GROSS, O.; TSCHOPP, J.; EVANS, T. J. The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *J.Biol.Chem.*, v. 285, n. 14, p. 10508-10518, 2010

ARTIS, D.; SPEIRS, K.; JOYCE, K.; GOLDSCHMIDT, M.; CAAMANO, J.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P. NF-kappa B1 is required for optimal CD4+ Th1 cell development and resistance to *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 170, n. 4, p. 1995-2003, 2003

BAJENOFF, M.; BREART, B.; HUANG, A. Y.; QI, H.; CAZARETH, J.; BRAUD, V. M.; GERMAIN, R. N.; GLAICHENHAUS, N. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J.Exp.Med.*, v. 203, n. 3, p. 619-631, 2006

BATES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp.Parasitol.*, v. 79, n. 2, p. 215-218, 1994

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int.J.Parasitol.*, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat.Rev.Microbiol.*, v. 7, n. 2, p. 99-109, 2009

BERSUDSKY, M.; LUSKI, L.; FISHMAN, D.; WHITE, R. M.; ZIV-SOKOLOVSKAYA, N.; DOTAN, S.; RIDER, P.; KAPLANOV, I.; AYCHEK, T.; DINARELLO, C. A.; APTE, R. N.; VORONOV, E. Non-redundant properties of IL-1alpha and IL-1beta during acute colon inflammation in mice. *Gut*, v. 63, n. 4, p. 598-609, 2014

BOAVENTURA, V. S.; SANTOS, C. S.; CARDOSO, C. R.; DE, Andrade J.; DOS SANTOS, W. L.; CLARENCIO, J.; SILVA, J. S.; BORGES, V. M.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL, A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur.J.Immunol.*, v. 40, n. 10, p. 2830-2836, 2010

BOSSU, P.; NEUMANN, D.; DEL, Giudice E.; CIARAMELLA, A.; GLOAGUEN, I.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A.; DI, Carlo E.; MUSIANI, P.; MERONI, P. L.; CASELLI, G.; RUGGIERO, P.; BORASCHI, D. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 100, n. 24, p. 14181-14186, 2003

BRENNAN, M. A.; COOKSON, B. T. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol.Microbiol.*, v. 38, n. 1, p. 31-40, 2000

BROSSART, P.; GRUNEBACH, F.; STUHLER, G.; REICHARDT, V. L.; MOHLE, R.; KANZ, L.; BRUGGER, W. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, v. 92, n. 11, p. 4238-4247, 1998

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. *Plast.Reconstr.Surg.*, v. 117, n. 7 Suppl, p. 1e-32e, 2006

BRYSON, K. J.; WEI, X. Q.; ALEXANDER, J. Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice. *Microbes.Infect.*, v. 10, n. 7, p. 834-839, 2008

CAIN, K.; LANGLAIS, C.; SUN, X. M.; BROWN, D. G.; COHEN, G. M. Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J.Biol.Chem.*, v. 276, n. 45, p. 41985-41990, 2001

CAMPBELL, S. M.; RAINEY, P. M. *Leishmania pifanoi*: kinetics of messenger RNA expression during amastigote to promastigote transformation in vitro. *Exp.Parasitol.*, v. 77, n. 1, p. 1-12, 1993

CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb. Protoc.*, v. 2014, n. 6, p. 655-658, 2014

CARLSEN, E. D.; HAY, C.; HENARD, C. A.; POPOV, V.; GARG, N. J.; SOONG, L. Leishmania amazonensis amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect. Immun.*, v. 81, n. 11, p. 3966-3974, 2013

CARROLL, H. P.; PAUNOVIC, V.; GADINA, M. Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)*, v. 47, n. 9, p. 1269-1277, 2008

CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R. L. IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice. *J. Immunol.*, v. 148, n. 4, p. 1182-1187, 1992

COMA, G.; PENA, R.; BLANCO, J.; ROSELL, A.; BORRAS, F. E.; ESTE, J. A.; CLOTET, B.; RUIZ, L.; PARKHOUSE, R. M.; BOFILL, M. Treatment of monocytes with interleukin (IL)-12 plus IL-18 stimulates survival, differentiation and the production of CXC chemokine ligands (CXCL8, CXCL9 and CXCL10). *Clin. Exp. Immunol.*, v. 145, n. 3, p. 535-544, 2006

COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.*, v. 9, n. 3, p. 113-114, 2001

CRUZ, I.; MORALES, M. A.; NOGUER, I.; RODRIGUEZ, A.; ALVAR, J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, v. 359, n. 9312, p. 1124-1125, 2002

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 29, n. 707-735, 2011

DE SOUZA CARMO, E. V.; KATZ, S.; BARBIERI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected macrophages. *PLoS. One.*, v. 5, n. 11, p. e13815-2010

DEBETS, R.; TIMANS, J. C.; CHURAKOWA, T.; ZURAWSKI, S.; DE WAAL, Malefyt R.; MOORE, K. W.; ABRAMS, J. S.; O'GARRA, A.; BAZAN, J. F.; KASTELEIN, R. A. IL-18 receptors, their role in ligand binding and function: anti-IL-18R α antibody, a potent antagonist of IL-18. *J. Immunol.*, v. 165, n. 9, p. 4950-4956, 2000

DEBUS, A.; GLASNER, J.; ROLLINGHOFF, M.; GESSNER, A. High levels of susceptibility and Th2 helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with Leishmania major are interleukin-4 dependent. *Infect. Immun.*, v. 71, n. 12, p. 7215-7218, 2003

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin.Dermatol.*, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996

DINARELLO, C. A. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin.Nephrol.*, v. 27, n. 1, p. 98-114, 2007

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 27, n. 519-550, 2009

DINARELLO, C. A.; FANTUZZI, G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J.Infect.Dis.*, v. 187 Suppl 2, n. S370-S384, 2003

DO, D. V.; ONG, C. T.; KHOO, Y. T.; CARBONE, A.; LIM, C. P.; WANG, S.; MUKHOPADHYAY, A.; CAO, X.; CHO, D. H.; WEI, X. Q.; BELLONE, G.; LIM, I.; PHAN, T. T. Interleukin-18 system plays an important role in keloid pathogenesis via epithelial-mesenchymal interactions. *Br.J.Dermatol.*, v. 166, n. 6, p. 1275-1288, 2012

DZIK, J. M. Evolutionary roots of arginase expression and regulation. *Front Immunol.*, v. 5, n. 544-2014

ESFANDIARI, E.; MCINNES, I. B.; LINDOP, G.; HUANG, F. P.; FIELD, M.; KOMAI-KOMA, M.; WEI, X.; LIEW, F. Y. A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease. *J.Immunol.*, v. 167, n. 9, p. 5338-5347, 2001

ESPER, L.; UTSCH, L.; SORIANI, F. M.; BRANT, F.; ESTEVES ARANTES, R. M.; CAMPOS, C. F.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; TANOWITZ, H. B.; VIEIRA, L. Q.; MACHADO, F. S. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes.Infect.*, v. 16, n. 6, p. 481-490, 2014

FANTUZZI, G.; REED, D. A.; DINARELLO, C. A. IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. *J.Clin.Invest*, v. 104, n. 6, p. 761-767, 1999

FAUST, J.; MENKE, J.; KRIEGSMANN, J.; KELLEY, V. R.; MAYET, W. J.; GALLE, P. R.; SCHWARTING, A. Correlation of renal tubular epithelial cell-derived interleukin-18 up-regulation with disease activity in MRL-Fas^{lpr} mice with autoimmune lupus nephritis. *Arthritis Rheum.*, v. 46, n. 11, p. 3083-3095, 2002

FAUSTIN, B.; LARTIGUE, L.; BRUEY, J. M.; LUCIANO, F.; SERGIENKO, E.; BAILLY-MAITRE, B.; VOLKMANN, N.; HANEIN, D.; ROUILLER, I.; REED, J. C. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol.Cell*, v. 25, n. 5, p. 713-724, 2007

FERNANDES-ALNEMRI, T.; YU, J. W.; DATTA, P.; WU, J.; ALNEMRI, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, v. 458, n. 7237, p. 509-513, 2009

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect.Immun.*, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.*, v. 8, n. 11, p. 1812-1825, 2006

GHAYUR, T.; BANERJEE, S.; HUGUNIN, M.; BUTLER, D.; HERZOG, L.; CARTER, A.; QUINTAL, L.; SEKUT, L.; TALANIAN, R.; PASKIND, M.; WONG, W.; KAMEN, R.; TRACEY, D.; ALLEN, H. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, v. 386, n. 6625, p. 619-623, 1997

GOLAB, J.; ZAGOZDZON; STOKLOSAL, T.; KAMINSKI, R.; KOZAR, K.; JAKOBISIĄK, M. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far? *Immunol.Lett.*, v. 72, n. 3, p. 153-157, 2000

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES, Rda S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes.Infect.*, v. 5, n. 4, p. 251-260, 2003

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania* major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990

GUIMARAES-COSTA, A. B.; DESOUZA-VIEIRA, T. S.; PALETTA-SILVA, R.; FREITAS-MESQUITA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SARAIVA, E. M. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect.Immun.*, v. 82, n. 4, p. 1732-1740, 2014

GUIMARAES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T.; FROMENT, G. S.; SOARES, R. P.; MORGADO, F. N.; CONCEICAO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 106, n. 16, p. 6748-6753, 2009

GURCEL, L.; ABRAMI, L.; GIRARDIN, S.; TSCHOPP, J.; VAN DER GOOT, F. G. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*, v. 126, n. 6, p. 1135-1145, 2006

HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 18, n. 3, p. 349-356, 2006

HARRIS, J.; DE HARO, S. A.; MASTER, S. S.; KEANE, J.; ROBERTS, E. A.; DELGADO, M.; DERETIC, V. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Immunity.*, v. 27, n. 3, p. 505-517, 2007

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J.Exp.Med.*, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with Leishmania major. *J.Exp.Med.*, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, 1993

HERMIDA, M. D.; DORIA, P. G.; TAGUCHI, A. M.; MENGEL, J. O.; DOS-SANTOS, W. Leishmania amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC.Infect.Dis.*, v. 14, n. 450-2014

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999

HISE, A. G.; TOMALKA, J.; GANESAN, S.; PATEL, K.; HALL, B. A.; BROWN, G. D.; FITZGERALD, K. A. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host.Microbe*, v. 5, n. 5, p. 487-497, 2009

HONDOWICZ, B. D.; PARK, A. Y.; ELLOSO, M. M.; SCOTT, P. Maintenance of IL-12-responsive CD4+ T cells during a Th2 response in Leishmania major-infected mice. *Eur.J.Immunol.*, v. 30, n. 7, p. 2007-2014, 2000

HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunol.Lett.*, v. 161, n. 2, p. 179-183, 2014

IYER, S. S.; PULSKENS, W. P.; SADLER, J. J.; BUTTER, L. M.; TESKE, G. J.; ULLAND, T. K.; EISENBARTH, S. C.; FLORQUIN, S.; FLAVELL, R. A.; LEEMANS, J. C.; SUTTERWALA, F. S. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 106, n. 48, p. 20388-20393, 2009

JECNA, L.; DOSTALOVA, A.; WILSON, R.; SEBLOVA, V.; CHANG, K. P.; BATES, P. A.; VOLF, P. The role of surface glycoconjugates in Leishmania midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies. *Parasitology*, v. 140, n. 8, p. 1026-1032, 2013

Jl, J.; MASTERSON, J.; SUN, J.; SOONG, L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during Leishmania amazonensis infection. *J.Immunol.*, v. 174, n. 11, p. 7147-7153, 2005

Jl, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with Leishmania amazonensis. *Infect.Immun.*, v. 71, n. 8, p. 4278-4288, 2003

JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during Leishmania amazonensis infection. *J.Immunol.*, v. 165, n. 1, p. 364-372, 2000

KAMPFER, H.; KALINA, U.; MUHL, H.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Counterregulation of interleukin-18 mRNA and protein expression during cutaneous wound repair in mice. *J.Invest Dermatol.*, v. 113, n. 3, p. 369-374, 1999

KAMPFER, H.; PAULUKAT, J.; MUHL, H.; WETZLER, C.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Lack of interferon-gamma production despite the presence of interleukin-18 during cutaneous wound healing. *Mol.Med.*, v. 6, n. 12, p. 1016-1027, 2000

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, 2001

KANNEGANTI, T. D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 10, n. 10, p. 688-698, 2010

KAYAGAKI, N.; WARMING, S.; LAMKANFI, M.; VANDE, Walle L.; LOUIE, S.; DONG, J.; NEWTON, K.; QU, Y.; LIU, J.; HELDENS, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; DIXIT, V. M. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, v. 479, n. 7371, p. 117-121, 2011

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat.Rev.Microbiol.*, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011

KELLER, M.; RUEGG, A.; WERNER, S.; BEER, H. D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, v. 132, n. 5, p. 818-831, 2008

KOFOED, E. M.; VANCE, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature*, v. 477, n. 7366, p. 592-595, 2011

KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.*, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004

KOSAKA, A.; YAN, H.; OHASHI, S.; GOTOH, Y.; SATO, A.; TSUTSUI, H.; KAISHO, T.; TODA, T.; TSUJI, N. M. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC triggers IFN-gamma production from NK and T cells via IL-12 and IL-18. *Int.Immunopharmacol.*, v. 14, n. 4, p. 729-733, 2012

KREIDER, T.; ANTHONY, R. M.; URBAN, J. F., Jr.; GAUSE, W. C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 19, n. 4, p. 448-453, 2007

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, v. 157, n. 5, p. 1013-1022, 2014

LEUNG, B. P.; CULSHAW, S.; GRACIE, J. A.; HUNTER, D.; CANETTI, C. A.; CAMPBELL, C.; CUNHA, F.; LIEW, F. Y.; MCINNES, I. B. A role for IL-18 in neutrophil activation. *J.Immunol.*, v. 167, n. 5, p. 2879-2886, 2001

LIAO, K. C.; MOGRIDGE, J. Expression of Nlrp1b inflammasome components in human fibroblasts confers susceptibility to anthrax lethal toxin. *Infect.Immun.*, v. 77, n. 10, p. 4455-4462, 2009

LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L.; MINEO, T. W.; GUTIERREZ, F. R.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FLAVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nat.Med.*, v. 19, n. 7, p. 909-915, 2013

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; GARDNER, K. D., Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann.Inst.Pasteur Immunol.*, v. 138, n. 5, p. 744-749, 1987

LOKE, P.; GALLAGHER, I.; NAIR, M. G.; ZANG, X.; BROMBACHER, F.; MOHRS, M.; ALLISON, J. P.; ALLEN, J. E. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4⁺ T cells to be sustained during chronic infection. *J.Immunol.*, v. 179, n. 6, p. 3926-3936, 2007

MACKANESS, G. B. Cellular immunity and the parasite. *Adv.Exp.Med.Biol.*, v. 93, n. 65-73, 1977

MALLAT, Z.; CORBAZ, A.; SCOAZEC, A.; GRABER, P.; ALOUANI, S.; ESPOSITO, B.; HUMBERT, Y.; CHVATCHKO, Y.; TEDGUI, A. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ.Res.*, v. 89, n. 7, p. E41-E45, 2001

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med.Vet.Entomol.*, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol.Cell*, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol.Rev.*, v. 201, n. 206-224, 2004

MONTEFORTE, G. M.; TAKEDA, K.; RODRIGUEZ-SOSA, M.; AKIRA, S.; DAVID, J. R.; SATOSKAR, A. R. Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous Leishmania major infection. *J.Immunol.*, v. 164, n. 11, p. 5890-5893, 2000

MOREL, J. C.; PARK, C. C.; KUMAR, P.; KOCH, A. E. Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NFkappaB activation. *Lab Invest*, v. 81, n. 10, p. 1371-1383, 2001a

MOREL, J. C.; PARK, C. C.; WOODS, J. M.; KOCH, A. E. A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF kappa B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J.Biol.Chem.*, v. 276, n. 40, p. 37069-37075, 2001b

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J.Immunol.*, v. 175, n. 1, p. 5-14, 2005

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. *J.Leukoc.Biol.*, v. 73, n. 2, p. 209-212, 2003

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008

MUNDER, M.; MALLO, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J.Exp.Med.*, v. 187, n. 12, p. 2103-2108, 1998

MUNOZ-PLANILLO, R.; KUFFA, P.; MARTINEZ-COLON, G.; SMITH, B. L.; RAJENDIRAN, T. M.; NUNEZ, G. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, v. 38, n. 6, p. 1142-1153, 2013

MURAILLE, E.; DE, Trez C.; BRAIT, M.; DE, Baetselier P.; LEO, O.; CARLIER, Y. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. *J.Immunol.*, v. 170, n. 8, p. 4237-4241, 2003

NAKAMURA, K.; OKAMURA, H.; WADA, M.; NAGATA, K.; TAMURA, T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect.Immun.*, v. 57, n. 2, p. 590-595, 1989

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 12, n. 1, p. 53-72, 2001

NOBEN-TRAUTH, N.; LIRA, R.; NAGASE, H.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 170, n. 10, p. 5152-5158, 2003

NOVICK, D.; KIM, S.; KAPLANSKI, G.; DINARELLO, C. A. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin.Immunol.*, v. 25, n. 6, p. 439-448, 2013

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.*, v. 28, n. 4, p. 477-487, 2008

OHKUSU, K.; YOSHIMOTO, T.; TAKEDA, K.; OGURA, T.; KASHIWAMURA, S.; IWAKURA, Y.; AKIRA, S.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania major* infection. *Infect.Immun.*, v. 68, n. 5, p. 2449-2456, 2000

OKAMURA, H.; NAGATA, K.; KOMATSU, T.; TANIMOTO, T.; NUKATA, Y.; TANABE, F.; AKITA, K.; TORIGOE, K.; OKURA, T.; FUKUDA, S.; . A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect.Immun.*, v. 63, n. 10, p. 3966-3972, 1995

OLIVEIRA, C. F.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MELLO, P. S.; NATALE, C. C.; SANTIAGO, Hda C.; MIRANDA, Lda S.; FERRAZ, F. O.; DOS SANTOS, L. M.; TEIXEIRA, M. M.; ARANTES, R. M.; VIEIRA, L. Q. Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*. *Clin.Dev.Immunol.*, v. 2012, n. 865708-2012

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B.; KOPF, M.; SCOTT, P. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 168, n. 11, p. 5771-5777, 2002

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B. D.; SCOTT, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J.Immunol.*, v. 165, n. 2, p. 896-902, 2000

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008

PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J.; MCCONVILLE, M. J.; LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V.; SACKS, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, v. 256, n. 5065, p. 1812-1815, 1992

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.*, v. 72, n. 2, p. 988-995, 2004

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. *J.Immunol.*, v. 167, n. 8, p. 4534-4542, 2001

RANDLE, J. C.; HARDING, M. W.; KU, G.; SCHONHARTING, M.; KURRLE, R. ICE/Caspase-1 inhibitors as novel anti-inflammatory drugs. *Expert.Opin.Investig.Drugs*, v. 10, n. 7, p. 1207-1209, 2001

RAYAMAJHI, M.; ZAK, D. E.; CHAVARRIA-SMITH, J.; VANCE, R. E.; MIAO, E. A. Cutting edge: Mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *J.Immunol.*, v. 191, n. 8, p. 3986-3989, 2013

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect.Microbiol.*, v. 2, n. 59-2012

ROBSON, M. C.; STEED, D. L.; FRANZ, M. G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr.Probl.Surg.*, v. 38, n. 2, p. 72-140, 2001

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS.Pathog.*, v. 3, n. 6, p. e91-2007

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, v. 124, n. Pt 5, p. 495-507, 2002

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, v. 430, n. 6998, p. 463-467, 2004

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp.Parasitol.*, v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984

SADICK, M. D.; HEINZEL, F. P.; HOLADAY, B. J.; PU, R. T.; DAWKINS, R. S.; LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J.Exp.Med.*, v. 171, n. 1, p. 115-127, 1990

SANI, M. R.; MOGHADDAM, M. M.; AGHAMOLLAIE, H.; HASSANPOUR, K.; TAHERI, R. A.; FARNOOSH, G. Investigation of caspase-1 activity and interleukin-1beta production in murine macrophage cell lines infected with *Leishmania major*. *Asian Pac.J.Trop.Med.*, v. 7S1, n. S70-S73, 2014

SCHAIBLE, U. E.; SCHLESINGER, P. H.; STEINBERG, T. H.; MANGEL, W. F.; KOBAYASHI, T.; RUSSELL, D. G. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J.Cell Sci.*, v. 112 (Pt 5), n. 681-693, 1999

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 154, n. 10, p. 5320-5330, 1995

SCHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J.Leukoc.Biol.*, v. 57, n. 4, p. 515-522, 1995

SCHLEICHER, U.; HESSE, A.; BOGDAN, C. Minute numbers of contaminant CD8+ T cells or CD11b+CD11c+ NK cells are the source of IFN-gamma in IL-12/IL-18-stimulated mouse macrophage populations. *Blood*, v. 105, n. 3, p. 1319-1328, 2005

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010

SCHWARZ, T.; REMER, K. A.; NAHRENDORF, W.; MASIC, A.; SIEWE, L.; MULLER, W.; ROERS, A.; MOLL, H. T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS.Pathog.*, v. 9, n. 6, p. e1003476-2013

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong

to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp.Med.*, v. 168, n. 5, p. 1675-1684, 1988

SHAO, W.; YERETSIAN, G.; DOIRON, K.; HUSSAIN, S. N.; SALEH, M. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J.Biol.Chem.*, v. 282, n. 50, p. 36321-36329, 2007

SIEGMUND, B.; FANTUZZI, G.; RIEDER, F.; GAMBONI-ROBERTSON, F.; LEHR, H. A.; HARTMANN, G.; DINARELLO, C. A.; ENDRES, S.; EIGLER, A. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, v. 281, n. 4, p. R1264-R1273, 2001a

SIEGMUND, B.; LEHR, H. A.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 98, n. 23, p. 13249-13254, 2001b

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004

SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites. *J.Immunol.*, v. 180, n. 7, p. 4355-4360, 2008

SOONG, L. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by Leishmania amazonensis. *Front Immunol.*, v. 3, n. 58-2012

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J., Jr.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with Leishmania amazonensis infection. *J.Immunol.*, v. 158, n. 11, p. 5374-5383, 1997

SOUSA, L. M.; CARNEIRO, M. B.; RESENDE, M. E.; MARTINS, L. S.; DOS SANTOS, L. M.; VAZ, L. G.; MELLO, P. S.; MOSSER, D. M.; OLIVEIRA, M. A.; VIEIRA, L. Q. Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol.*, v. 36, n. 1, p. 13-31, 2014

SOUSA,L.M.;CARNEIRO,M.B.;MARTINS,L.S.;NATALE,C.C.;RESENDE,M.E.;MOSSER,D.M.;VIEIRA,L. Q. IL-18 contributes to susceptibility to Leishmania amazonensis infection by macrophageindependent mechanisms. *Cytokine. Manuscript number CYTO-14-220R1*

SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp.Parasitol.*, v. 99, n. 2, p. 97-103, 2001

STOLL, S.; JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; MULLER, G.; YAMAUCHI, H.; KURIMOTO, M.; KNOP, J.; ENK, A. H. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur.J.Immunol.*, v. 28, n. 10, p. 3231-3239, 1998

TAKEDA, K.; TSUTSUI, H.; YOSHIMOTO, T.; ADACHI, O.; YOSHIDA, N.; KISHIMOTO, T.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K.; AKIRA, S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity.*, v. 8, n. 3, p. 383-390, 1998

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010

THALHOFER, C. J.; CHEN, Y.; SUDAN, B.; LOVE-HOMAN, L.; WILSON, M. E. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi. *Infect.Immun.*, v. 79, n. 1, p. 108-117, 2011

TSUTSUI, H.; KAYAGAKI, N.; KUIDA, K.; NAKANO, H.; HAYASHI, N.; TAKEDA, K.; MATSUI, K.; KASHIWAMURA, S.; HADA, T.; AKIRA, S.; YAGITA, H.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity.*, v. 11, n. 3, p. 359-367, 1999

TUMITAN, A. R.; MONNAZZI, L. G.; GHIRALDI, F. R.; CILLI, E. M.; MACHADO DE MEDEIROS, B. M. Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice. *Microbiol.Immunol.*, v. 51, n. 10, p. 1021-1028, 2007

TUON, F. F.; BOMBONATTO, G. M.; BATTAGLIN, E. R.; SAKUMOTO, M. H.; AMATO, V. S.; DE CAMARGO, R. A.; NICODEMO, A. C. Reactivation of mucosal and cutaneous leishmaniasis in a renal transplanted patient. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 91, n. 1, p. 81-83, 2014

UDAGAWA, N.; HORWOOD, N. J.; ELLIOTT, J.; MACKAY, A.; OWENS, J.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; CHAMBERS, T. J.; MARTIN, T. J.; GILLESPIE, M. T. Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J.Exp.Med.*, v. 185, n. 6, p. 1005-1012, 1997

VIEIRA, L. Q.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PFEFFER, K.; MAK, T.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J.Immunol.*, v. 157, n. 2, p. 827-835, 1996

WEI, X. Q.; LEUNG, B. P.; ARTHUR, H. M.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. *J.Immunol.*, v. 166, n. 1, p. 517-521, 2001

WEI, X. Q.; LEUNG, B. P.; NIEDBALA, W.; PIEDRAFITA, D.; FENG, G. J.; SWEET, M.; DOBBIE, L.; SMITH, A. J.; LIEW, F. Y. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. *J.Immunol.*, v. 163, n. 5, p. 2821-2828, 1999

WEI, X. Q.; NIEDBALA, W.; XU, D.; LUO, Z. X.; POLLOCK, K. G.; BREWER, J. M. Host genetic background determines whether IL-18 deficiency results in increased susceptibility or resistance to murine *Leishmania major* infection. *Immunol.Lett.*, v. 94, n. 1-2, p. 35-37, 2004

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASSES;WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Control of the leishmaniasis report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010*: ed. Geneva: World Health Organization, 2010.

WILSON, J.; HUYNH, C.; KENNEDY, K. A.; WARD, D. M.; KAPLAN, J.; ADEREM, A.; ANDREWS, N. W. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS.Pathog.*, v. 4, n. 10, p. e1000179-2008

WILSON, R.; BATES, M. D.; DOSTALOVA, A.; JECNA, L.; DILLON, R. J.; VOLF, P.; BATES, P. A. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 4, n. 9, p. 2010

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. *Surg.Clin.North Am.*, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997

WREE, A.; EGUCHI, A.; MCGEOUGH, M. D.; PENA, C. A.; JOHNSON, C. D.; CANBAY, A.; HOFFMAN, H. M.; FELDSTEIN, A. E. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology*, v. 59, n. 3, p. 898-910, 2014

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 445-455, 2013

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol.Immunol.*, v. 45, n. 12, p. 3371-3382, 2008

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD. *Infect.Immun.*, v. 75, n. 10, p. 5018-5026, 2007

XU, D.; CHAN, W. L.; LEUNG, B. P.; HUNTER, D.; SCHULZ, K.; CARTER, R. W.; MCINNES, I. B.; ROBINSON, J. H.; LIEW, F. Y. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J.Exp.Med.*, v. 188, n. 8, p. 1485-1492, 1998

XU, D.; TRAJKOVIC, V.; HUNTER, D.; LEUNG, B. P.; SCHULZ, K.; GRACIE, J. A.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur.J.Immunol.*, v. 30, n. 11, p. 3147-3156, 2000

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUGIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, v. 301, n. 5633, p. 640-643, 2003

YANG, J.; ZHAO, Y.; SHI, J.; SHAO, F. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 110, n. 35, p. 14408-14413, 2013

YOSHIMOTO, T.; MIZUTANI, H.; TSUTSUI, H.; NOBEN-TRAUTH, N.; YAMANAKA, K.; TANAKA, M.; IZUMI, S.; OKAMURA, H.; PAUL, W. E.; NAKANISHI, K. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat.Immunol.*, v. 1, n. 2, p. 132-137, 2000

YOSHIMOTO, T.; TAKEDA, K.; TANAKA, T.; OHKUSU, K.; KASHIWAMURA, S.; OKAMURA, H.; AKIRA, S.; NAKANISHI, K. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J.Immunol.*, v. 161, n. 7, p. 3400-3407, 1998

YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; TOMINAGA, K.; HOSHINO, K.; OKAMURA, H.; AKIRA, S.; PAUL, W. E.; NAKANISHI, K. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 96, n. 24, p. 13962-13966, 1999

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr.Protoc.Immunol.*, v. Chapter 14, n. Unit-2008

ZHOU, R.; YAZDI, A. S.; MENU, P.; TSCHOPP, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, v. 469, n. 7329, p. 221-225, 2011