

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Caio Cotta Natale

**A IL-18 NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS NA INFECÇÃO POR
Leishmania amazonensis E INFLAMAÇÃO ESTÉRIL INDUZIDA PELA
λ-CARRAGENINA**

**Belo Horizonte
2019**

Caio Cotta Natale

**A IL-18 NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS NA INFECÇÃO POR
Leishmania amazonensis E INFLAMAÇÃO ESTÉRIL INDUZIDA PELA
λ-CARRAGENINA**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia da Universidade
Federal de Minas Gerais para obtenção do
título de Doutor em Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Leda Quercia
Vieira

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Manzoni de
Almeida

**Belo Horizonte
2019**

AGRADECIMENTOS

À Professora Leda Quercia Vieira pela orientação e pela oportunidade no seu laboratório. Agradeço ao incentivo e à boa convivência 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 quatro anos do meu doutorado.

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

Ao Professor Daniel Manzoni de Almeida, que além de co-orientador é meu amigo e compartilha comigo de seu brilhantismo e bom humor. Que nosso grupo se fortaleça cada vez mais no campo da educação, para que possamos, como educadores, traçar rumos fortes e resistentes em meio ao obscurantismo que tomou nossas instituições.

À Paula Seixas, minha amiga e companheira de laboratório, pela amizade imprescindível para a sobrevivência em um doutorado. Pelas conversas e discussões sempre enriquecedoras. Pela companhia em todos os momentos desses nossos 11 anos, momentos que não cabem aqui.

À Debora Marioto pela amizade e apoio em todos esses anos do doutorado. Que essa amizade transborde os muros da universidade.

Aos meus amigos Liliane, Grazi, Matheus, Pierre, Peter, Ana Clara e Alícia pelos ensinamentos e pelos ótimos anos que me proporcionaram no laboratório.

Aos meus amigos Lorena, Paulo, Pompea, Gabi, Raoni, Flavi por me mostrarem que o mundo vai muito além do conforto da nossa área de conhecimento. E ao pequeno Benjamin que em pouco tempo já nos trouxe tanta alegria.

Ao meu irmão e minha mãe por todo o apoio e compreensão nesses anos tão conturbados.

Ao Marquinho, que entrou definitivamente na minha vida no início deste doutorado. Não consigo definir o tanto que me ajudou nesse caminho. Obrigado por ser meu companheiro e por estar comigo em todo esse trajeto. Obrigado pelo amor, pelo carinho e pela compreensão em ainda me amar mesmo eu cheirando a camundongo quase todos os dias. Obrigado por estar

comigo desde o início dessa aventura e além. Te amo muito e que possamos construir novos rumos perto do mar.

*“Quem anda em direção ao infinito continua,
a partir da perspectiva do infinito, no mesmo lugar.*

Dessa maneira, a estrutura da oscilação contínua

*Entre dever e desejo de transgressão acaba
por se transformar em situação intransponível.”*

Vladimir Safatle

RESUMO

Na infecção por *Leishmania amazonensis*, o modelo clássico de polarização Th1 e Th2, encontrado no modelo de infecção por *Leishmania major*, não se aplica. O que é descrito é uma mistura de respostas Th1, Th2, Treg e Th17. A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória que tem a capacidade de polarizar os linfócitos T para os fenótipos Th1, Th17 e Th2, dependendo do ambiente em que se encontra. Nosso trabalho visa identificar o papel da IL-18 no curso da infecção e desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos infectados por *L. amazonensis*. Nossos dados mostraram que os camundongos IL-18 KO apresentaram lesões menores do que os camundongos do tipo selvagem (C57BL/6). Além disso, nos tempos analisados, as duas linhagens apresentam a mesma carga parasitária quando infectadas com 10^2 , 10^4 e 10^5 formas promastigotas de *L. amazonensis*. No perfil de citocinas na lesão, encontramos níveis consideráveis de IL-12, TNF nas duas linhagens de camundongos, mas encontramos níveis mais elevados de IL-10 nos camundongos KO. Durante o curso da infecção, identificamos uma porcentagem maciça de células T CD4⁺ na lesão expressando o receptor para IL-18 após a quarta semana de infecção. Isso coincide com o aparecimento da lesão exacerbada em camundongos WT e pode estar associado ao pico de produção de IL-18 observado por ELISA. Tratamos os camundongos KO e WT com anti-CD4 (GK1.5) e também observamos o perfil de ativação das células T CD4⁺ antes, durante e após o tratamento com GK.1.5. Para validar nossa hipótese, nós infectamos os camundongos IL-18 KO e tratamos estes animais com células T CD4⁺ de um camundongo GFP⁺ WT. Nossos dados sugerem que a IL-18 está parcialmente envolvida na suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*. Isto é provavelmente devido à interação da IL-18 nos linfócitos T. Em outro modelo como a inflamação induzida pela carragenina os camundongos IL-18 KO também apresentaram lesões menores do que as lesões dos animais selvagens. Um fato interessante foi que as células inflamatórias, como macrófagos e monócitos, que não apresentam expressão para o receptor da IL-18 durante a infecção por *L. amazonensis* passaram a expressar no modelo de inflamação induzida pela carragenina. Nossos dados indicam que a IL-18 está envolvida no agravamento das lesões, tanto nos modelos de inflamação na infecção por *L. amazonensis* como na inflamação induzida pela carragenina.

ABSTRACT

In infection by *Leishmania amazonensis* the classic model of polarization Th1 and Th2, found in the model of infection with *Leishmania major*, does not apply. What is described is a mixture of the profiles Th1, Th2, Treg and Th17. The IL-18 is a pro-inflammatory cytokine that has a capability to polarizes T lymphocytes to Th1, Th17 and Th2 phenotypes, depending on the environment in which it finds. Our work aims to identify the role of the IL-18 in the course of infection and development of skin lesions in mice infected by *L. amazonensis*. Our data showed that the IL-18 KO mice have a smaller lesion than the wild-type animals (C57BL/6) since the beginning of the infection. In addition, the times analyzed, the two strains have the same parasite burden when infected with 10^2 , 10^4 and 10^5 promastigotes forms of *L. amazonensis*. On the cytokine profile, we found considerable levels of IL-12, TNF in both strains, but we found higher levels of IL-10 in the KO mice. During the course of infection we identified a massive percentage of T cells CD4⁺ expressing the receptor for IL-18 after the fourth week of infection. This coincides with the appearance of the lesion exacerbated in wt mice and can be associated with the peak production of IL-18 seen by ELISA. We treat the mice KO and wt, with anti-CD4(GK1.5) and we also look the profile of activation of the CD4⁺ T cells before, during and after the treatment with GK.1.5. To validate our hypothesis, we infected the IL-18 KO mice and treated these animals with CD4⁺ T cells from a wt GFP⁺ mice. Our data suggests that the IL-18 is partially involved in susceptibility to infection by *L. amazonensis*. This is likely due to the interaction of IL-18 on T lymphocytes helping the maintenance of the lesion. In other model like the inflammation induced by carrageenan, the IL-18 KO mice has also a smaller lesion in comparison to the lesion of the wild-type mice. An interesting fact was that inflammatory cells, such as macrophages and monocytes, that did not present expression of IL-18 receptor during infection by *L. amazonensis* began to express in the model of carrageenan-induced inflammation. Our data indicate that IL-18 is involved in increasing of lesions, both in the models of inflammation in *L. amazonensis* infection and in carrageenan-induced inflammation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estrutura do receptor da IL-18. Figura adaptada (Krumm et al., 2014) | 18 |
| Figura 2: Esquema representativo das funcionalidades da IL-18..... | 21 |
| Figura 3. Desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> | 47 |
| Figura 4. Carga parasitária nas lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>L. amazonensis</i> | 49 |
| Figura 5. Imuno-histoquímica das lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>L. amazonensis</i> | 51 |
| Figura 6. A análise da concentração de IL-18 nas lesões cutâneas dos camundongos infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> | 53 |
| Figura 7. Desenvolvimento da lesão cutânea, carga parasitária e dosagem das citocinas TNF, IL-12p70 e IFN- γ nas lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>L. amazonensis</i> | 55 |
| Figura 8. A expressão do receptor de IL-18 nas células T CD4 ⁺ presentes no infiltrado inflamatório das lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> | 58 |
| Figura 9. Curso de infecção e a carga parasitária em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados com GK1.5 (anti-CD4)..... | 60 |
| Figura 10. Estratégia de <i>gating</i> para seleção do perfil de ativação das células T CD4 ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 62 |
| Figura 11. Cinética das células T CD4 ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com IgG ou Gk1.5..... | 65 |
| Figura 12. Cinética células T CD4 ⁺ IL-18R ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5..... | 68 |
| Figura 13. Cinética células T CD4 ⁺ T-bet ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5..... | 70 |
| Figura 14. Cinética células T CD4 ⁺ Gata3 ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5..... | 72 |
| Figura 15. Cinética células T CD4 ⁺ RoryT ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5..... | 74 |
| Figura 16. Cinética células T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5..... | 76 |

| | |
|---|-----|
| Figura 17. Estratégia de <i>gating</i> para seleção do perfil de células IL-4 ⁺ , IL-10 ⁺ , IL-17 ⁺ e do IFN- γ ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 78 |
| Figura 18. Células T CD4 ⁺ IL-4 ⁺ , IL-10 ⁺ , IL-17 ⁺ e do IFN- γ ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 80 |
| Figura 19. Células TCR β ⁺ CD4 ⁻ IL-4 ⁺ , IL-10 ⁺ , IL-17 ⁺ e do IFN- γ ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 82 |
| Figura 20. Transferência de células dos animais IL-18 KO e C57BL/6 para os animais IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 84 |
| Figura 21. Perfil das células T CD4 ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO <i>naïve</i> | 86 |
| Figura 22. Perfil das células T CD4 ⁺ e das células IL-18R ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO <i>naïve</i> | 88 |
| Figura 23. Cortes diversos de órgãos de camundongos C57BL/6 sem infecção e camundongos C57BL/6 infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> | 90 |
| Figura 24. Cortes diversos de órgãos de camundongos IL-18 KO sem infecção e camundongos IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> | 92 |
| Figura 25. Desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina..... | 94 |
| Figura 26. Perfil celular nos animais selvagens e IL-18 KO desafiados pela carragenina..... | 96 |
| Figura 27 Avaliação dos monócitos inflamatórios presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina..... | 98 |
| Figura 28 Avaliação dos macrófagos presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina..... | 100 |
| Figura 29 Avaliação das células dendríticas presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina..... | 102 |
| Figura 30. Avaliação dos neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina..... | 104 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AIM#:** Ausentes no melanoma
- AMP:** Adenosina monofosfato
- ASC:** Proteína adaptadora de caspase
- ATP:** Adenosina trifosfato
- BOD:** Demanda bioquímica de oxigênio
- CARD:** Domínio de recrutamento de caspase
- CCL#:** Ligantes de receptores de quimiocinas CC
- CD:** Grupo de diferenciação
- cDNA:** DNA complementar
- CEBIO:** Centro de Bioterismo
- CEUA:** Comitê de ética no uso de animais
- CXCL#:** Ligantes de receptores de quimiocinas CXC
- DAB:** 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloro
- DAMP:** Padrão molecular associado ao perigo
- dsDNA:** DNA de cadeia dupla
- DSS:** Dextrano sulfato de sódio
- ECM:** Matriz extracelular
- ELISA:** Ensaio imunoenzimático
- eNOS:** Óxido nítrico sintase endotelial
- ERK:** Cinase regulada por sinal extracelular
- FoxP3:** do inglês *forkhead box p3*

Gata: do inglês *zinc-finger transcription factor-3*

GFP: Proteína verde fluorescente

H&E: Hematoxilina e eosina

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HDAC1: Histona deacetilase 1

hi: Alto

IFI: Proteína indutora de interferon

Ig#: Imunoglobulina

IGIF: Fator de Indução de interferon

IL-#: Interleucina

ILC#: Células linfóide inata

iNOS: Óxido nítrico sintase indutível

int: Intermediário

IRAK: Cinase associada ao receptor da IL-1

IκB: Inibidor de κB

LC: Leishmaniose cutânea

LES: Lúpus eritematoso sistêmico

LPS: Lipopolissacarídeo

LV: Leishmaniose visceral

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno

MCP-1: Proteína quimiotática de monócito

MFI: Intensidade mediana de fluorescência

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

MPO: Mieloperoxidase

KO: Nocaute

MRL/lpr: Linfoma Murphy-Roth/linfoproliferação

mRNA: RNA mensageiro

MyD88: Gene de resposta primária de diferenciação mielóide

NETs: Redes extracelulares de neutrófilo

NFκB: Fator de transcrição nuclear κ B

NK: células matadoras naturais

NKT: Célula matadora natural T

NLR#: Receptor do tipo domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos

NLRP#: Domínio de proteína contendo pirina

NO: Óxido nítrico

p/v: Peso/volume

PAMP: Padrão molecular associado a patógeno

PAS: Ácido periódico de Schiff

PBS: Salina tamponada com fosfato

PMA: Acetato miristato de forbol

PPR: Receptores de reconhecimento padrão

PYD: Domínio pirina

RoryT: do inglês *retinoic-acid related orphan receptor γ T*

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPMI: Meio do Instituto Roswell Park Memorial

SFB: Soro fetal bovino

SIGRR: Imunoglobulina única contendo domínio do receptor Toll/IL-1

SOCS: Supressor da sinalização de citocinas

STAT#: Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição

T-bet: do inglês *T cell-specific Tbox transcription factor*

TCR: Receptor de célula T

Th#: Células T auxiliares do tipo #

TIR: Domínio do receptor Toll/IL-1

TLR#: Receptor do tipo Toll

TNBS: Solução de ácido 2,4,6-tritrobenzenossulfônico

TNF: Fator de necrose tumoral

WT: Tipo selvagem

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 A INTERLEUCINA 18 (IL-18) | 16 |
| 1.2 O RECEPTOR DA IL-18 (IL-18R) E A PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DA IL-18 (IL-18BP) | 17 |
| 1.3 AÇÃO BIOLÓGICA DA IL-18 | 20 |
| 1.4 IL-18 EM PROCESSOS PATOLÓGICOS | 22 |
| 1.4.1 IL-18 em modelos de colite | 22 |
| 1.4.2 IL-18 em modelos de aterosclerose e lesões do miocárdio | 23 |
| 1.4.3 IL-18 em modelos de patologias do sistema respiratório | 24 |
| 1.4.4 IL-18 em modelos de artrite | 24 |
| 1.4.5 IL-18 em doenças de pele | 25 |
| 1.4.6 IL-18 nas infecções bacterianas..... | 27 |
| 1.4.7 IL-18 nas infecções por protozoários | 28 |
| 1.5 MODELOS DE ESTUDO DE INFLAMAÇÃO NA PELE | 29 |
| 1.5.1 - Infecção por <i>Leishmania</i>..... | 29 |
| 1.5.1.1 <i>Epidemiologia e ciclo de vida</i> | 29 |
| 1.5.1.2 <i>Resposta imune</i> | 31 |
| 1.6 Λ -CARRAGENINA..... | 35 |
| 2 OBJETIVOS..... | 38 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 39 |
| 3.1 OS ANIMAIS | 39 |
| 3.2 OS PARASITOS | 39 |
| 3.3 INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS POR <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i> | 40 |
| 3.4 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR CARRAGENINA | 40 |
| 3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS | 41 |
| 3.6 EXTRAÇÃO DE TECIDO PARA DOSAGEM DE CITOCINAS NA LESÃO..... | 41 |
| 3.7 DETECÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA | 42 |
| 3.8 CITOMETRIA DE FLUXO | 42 |
| 3.9 DEPLEÇÃO EXPERIMENTAL DE LINFÓCITOS T CD4+..... | 43 |
| 3.10 BLOQUEIO EXPERIMENTAL DO RECEPTOR DA IL-10 | 43 |
| 3.11 TRATAMENTO COM CÉLULAS DO LINFONODO DRENANTE..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 3.12 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA | 44 |
| 3.13 A ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 45 |
| 4 RESULTADOS..... | 47 |
| 4.1 PARTE I..... | 47 |
| 4.1.1 Análise do desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> | 47 |
| 4.1.2 Análise da carga parasitária das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> | 50 |
| 4.1.3 Análise imuno-histoquímica das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> | 52 |
| 4.1.4 Análise da citocina IL-18 nas lesões de camundongos selvagens infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> | 54 |
| 4.1.5 Avaliação da lesão, carga parasitária e produção de TNF, IL-12p70 e IFN-γ nos tempos iniciais da infecção por <i>Leishmania amazonensis</i> | 56 |
| 4.1.6 A avaliação da presença de células T CD4⁺IL-18R⁺ no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> e o seu perfil da expressão do receptor de IL-18 | 58 |
| 4.1.7 A avaliação do efeito da depleção de linfócitos T CD4⁺ em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> | 61 |
| 4.1.8 Estratégia de <i>gate</i> para a seleção das células T CD4⁺ quanto ao perfil de ativação nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 63 |
| 4.1.9 Análise da cinética das células T CD4⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5..... | 65 |
| 4.1.10 Análise da cinética das células T CD4⁺IL-18R⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> e tratados com IgG ou Gk 1.5..... | 68 |
| 4.1.11 Análise da cinética das células T CD4⁺T-bet⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5 | 71 |
| 4.1.12 Análise da cinética das células T CD4⁺Gata3⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5 | 73 |
| 4.1.13 Análise Da Cinética Das Células T Cd4⁺Roryt⁺ Nos Animais Selvagens E Il-18 Ko Infectados Pela <i>Leishmania Amazonensis</i> Nos Animais Tratados Com Igg Ou Gk 1.5 ... | 75 |
| 4.1.14 Análise da cinética das células T CD4⁺Foxp3⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5 | 77 |
| 4.1.15 Estratégia de <i>gate</i> para a seleção das células quanto à presença da IL-4, IL-10, IL-17 e do IFN-γ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 79 |
| 4.1.16 Análise das células T CD4⁺ quanto à presença da IL-4, IL-10, IL-17 e do IFN-γ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 81 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.1.17 | Análise das células TCR β ⁺ CD4 ⁺ quanto à presença da IL-4, IL-10, IL-17 e do IFN- γ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 83 |
| 4.1.18 | Análise da transferência de células dos animais IL-18 KO e C57BL/6 para os animais IL-18 KO infectados pela <i>Leishmania amazonensis</i> | 85 |
| 4.2 | PARTE II..... | 87 |
| 4.2.1 | Análise do perfil das células T CD4 ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO <i>naïve</i> | 87 |
| 4.2.2 | Análise do perfil das células T CD4 ⁺ e das células IL-18R ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO <i>naïve</i> | 89 |
| 4.2.3 | Análise histopatológica dos órgãos linfoides e orelha dos camundongos C57BL/6 <i>naïve</i> e infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> | 91 |
| 4.2.4 | Análise histopatológica dos órgãos linfoides e orelha dos camundongos C57BL/6 IL-18 KO <i>naïve</i> e infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> | 93 |
| 4.3 | PARTE III | 95 |
| 4.3.1 | Análise do desenvolvimento da lesão induzida por λ -carragenina em camundongos selvagens e IL-18 KO..... | 95 |
| 4.3.2 | Estratégia dos gates para a análise do perfil celular nos animais selvagens e IL-18 KO desafiados pela λ -carragenina | 97 |
| 4.3.3 | Avaliação do perfil dos monócitos presente no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO no modelo de inflamação induzida por λ -carragenina | 99 |
| 4.3.4 | Avaliação do perfil dos macrófagos presente no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO no modelo de inflamação induzida por λ -carragenina | 101 |
| 4.3.5 | Avaliação do perfil das células dendríticas presente no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO no modelo de inflamação induzida por λ -carragenina | 103 |
| 4.3.6 | Avaliação do perfil dos neutrófilos presente no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO no modelo de inflamação induzida por λ -carragenina | 105 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 107 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 118 |
| | REFERÊNCIAS..... | 120 |
| | ANEXO..... | 143 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A INTERLEUCINA 18 (IL-18)

A IL-18 foi descrita em 1989, quando foi classificada como membro da família de proteínas indutoras de IFN- γ (IFI) e chamada de Fator de Indução de Interferon- γ (IGIF), tendo sido isolada do soro de camundongos desafiados intraperitonealmente com endotoxina (Nakamura *et al.*, 1989). A IGIF foi posteriormente purificada a partir do macerado do fígado de animais inoculados com *Propionibacterium acnes* e desafiados com LPS. Dos peptídeos obtidos desse purificado, foram sintetizados *primers* que possibilitaram a obtenção de partes do cDNA, que foram utilizados para a triagem dos outros fragmentos no macerado do fígado dos animais. O clone completo obtido gerou uma proteína precursora com 192 aminoácidos, incluindo uma sequência incomum de 35-37 aminoácidos na região N-terminal (Okamura, Nagata, *et al.*, 1995; Okamura, Tsutsi, *et al.*, 1995). Após a purificação, verificou-se a similaridade desse fragmento gerado com a pró-IL-1 β , além de outras similaridades com os membros da família da IL-1, sendo denominada IL-1 γ (Bazan *et al.*, 1996). Posteriormente é que recebeu o nome de IL-18 (Micallef *et al.*, 1997; Udagawa *et al.*, 1997).

Já é sabido que a IL-18 é sintetizada como uma proteína precursora de 24-kDa que se acumula no citoplasma, sendo essa denominada pró-IL-18. Após ser clivada em uma proteína madura de 18-kDa, é que ela tem a capacidade de ser exportada da célula e de se ligar ao seu receptor (Dinarello *et al.*, 1998; Fantuzzi *et al.*, 1999). O gene que codifica a pró-IL-18 está localizado no cromossomo 11 em humanos e no cromossomo 9 em camundongos (Nakanishi *et al.*, 2001). O sinal para a transcrição do gene da pró-IL-18 pode ser induzido após a estimulação de receptores do tipo Toll (TLR) por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMP), com consequente ativação da via do NF- κ B (Fantuzzi *et al.*, 1999). O precursor da IL-18 é constitutivo nos monócitos, macrófagos e células dendríticas em indivíduos saudáveis, assim como é constitutivo, também, em células endoteliais, queratinócitos, condrócitos, células epiteliais no trato gastrointestinal e células mesenquimais (Dinarello, 2009).

A pró-IL-18 é processada e clivada pela caspase-1; porém, a caspase-1 também está presente na célula na sua forma inativa. A pró-caspase-1 pode ser clivada em sua forma ativa por várias vias canônicas do inflamassoma, como as dependentes dos receptores do tipo-NOD

(NLR), dos membros da família Ausentes no Melanoma 2 (AIM2/ALR) e das proteínas indutoras de IFN- γ (IFI), que são sensores intracelulares para diversos sinais, como a diminuição da concentração de K⁺ intracelular, a presença de cristais de colesterol, de dsDNA, de ATP e de ácido úrico (Chen e Nunez, 2010). Para a ativação do inflamassoma, há a necessidade de dois sinais: um sinal extracelular via receptores de reconhecimento padrão (PPR) como os receptores do tipo Toll (TLR) ou pela ligação do TNF em seu receptor, em uma via dependente de MyD88 (Schroder e Tschopp, 2010); e um segundo sinal, intracelular, que acontece pela ativação dos NLR ou ALR pelos sinais de dano citados anteriormente. Após a ativação do receptor NLR, por exemplo, há a oligomerização do domínio pirina (PYD) do sensor que interage com a proteína adaptadora do domínio de recrutamento da caspase (ASC), que possui, também, um domínio PYD, além de um domínio de ativação e recrutamento de caspases (CARD) (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007). Essa interação desencadeia a montagem de ASC em uma proteína grande capaz de usar seu CARD para o recrutamento de monômeros da pró-caspase-1 que inicia a auto-clivagem e a formação da caspase-1 ativa. A caspase, então, cliva a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 nas suas formas ativas por proteólise (Shao *et al.*, 2007; Mohamadi *et al.*, 2018).

Além da clivagem da IL-18 dependente da caspase-1, há mecanismos independentes de caspase-1. Por exemplo, a ativação pelo Fas-ligante das células de Kupffer que expressam Fas gera a forma ativa da IL-18 mediada pela caspase-8 (Bossaller *et al.*, 2012). Há descrito, também, que a caspase-3 pode clivar a pró-IL-18 em sua forma ativa (Akita *et al.*, 1997). Já sobre os mecanismos independentes de caspases, sabe-se que a granzima B das células citotóxicas (Omoto *et al.*, 2010), as quimases dos mastócitos (Omoto *et al.*, 2006) e a meprina β advinda das células epiteliais do intestino e dos rins (Banerjee e Bond, 2008) são capazes de clivarem o precursor da IL-18 em sua forma biologicamente ativa. De maneira muito interessante, quando há liberação da pró-IL-18 por células mortas, a protease-3 liberada por neutrófilos pode processar a pró-IL-18 em sua forma ativa no meio extracelular (Sugawara *et al.*, 2001).

1.2 O RECEPTOR DA IL-18 (IL-18R) E A PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DA IL-18 (IL-18BP)

O receptor da IL-18 é formado pela junção de duas cadeias: a IL-18R α (IL-1R5 ou CD-218a), que é a cadeia que se liga à IL-18, porém com baixa afinidade; e a IL-18R β (IL-R7 ou

CD-218b) (Torigoe *et al.*, 1997), um co-receptor que, juntamente com a cadeia α , forma um complexo de alta afinidade com a IL-18 (Hoshino *et al.*, 1999), como mostrado na **Figura 1**.

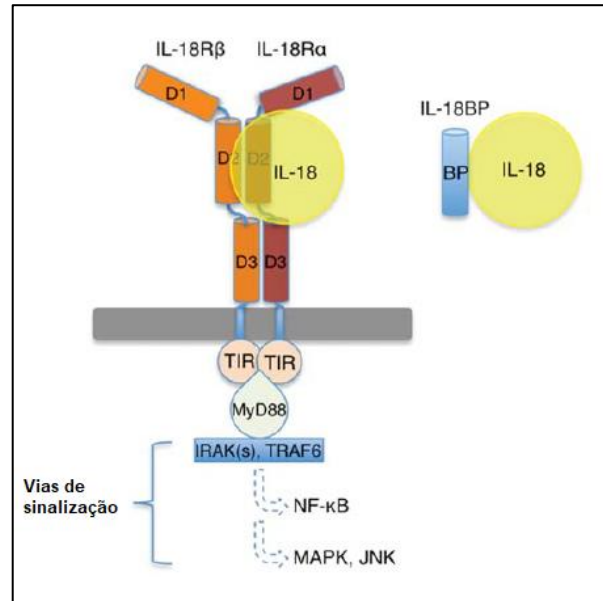


Figura 1: Estrutura do receptor da IL-18. Figura adaptada (Krumm *et al.*, 2014)

De maneira interessante, uma grande parte das células expressa a cadeia IL-18R α , que é capaz de transduzir o sinal; porém a cadeia IL-18R β é expressa apenas nas células T e nas células dendríticas, sendo que a expressão das cadeias α e β juntas potencializa o sinal (Kaplanski, 2018). Após a formação do complexo e da ligação da IL-18, há a aproximação dos domínios Toll-IL-1R (TIR) gerando a cascata de ativação com recrutamento do MyD88, de Quinases associadas a receptores de IL-1 (IRAK) e do Fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF-6), seguido pela degradação do I κ B e liberação do NF- κ B em um processo bastante similar ao da cascata de ativação gerado pela IL-1. Após esses eventos, há a expressão dos genes do IFN- γ (Dinarello, 1998). Além da via pelo NF- κ B, o complexo IL-18R α / IL-18R β /IL-18 induz, também, a fosforilação do STAT3 em células NK (Kalina *et al.*, 2000) e da via da quinase p38 MAPK em neutrófilos (Wyman *et al.*, 2002).

A inibição da cascata gerada pelo complexo IL-18R α / IL-18R β /IL-18 acontece pela citocina anti-inflamatória IL-37. A IL-37 é, também, membro da família da IL-1 e membro da subfamília IL-18, sendo que ela se liga, com baixa afinidade, à cadeia α do receptor da IL-18. Essa ligação inibe o recrutamento da cadeia β do receptor, impedindo a ligação da IL-18 (Nold-Petry *et al.*, 2015). Quando a IL-37 se liga à IL-18R α ocorre o recrutamento da cadeia IL-18R

(SIGRR), um receptor órfão da família da IL-1 (Li *et al.*, 2015). Esse complexo IL-18R α / IL-1R8/ IL-37 não recruta MyD88; ao invés disso, induz um sinal anti-inflamatório na célula, ativa STAT3 e reduz a via de ativação do NF- κ B, conseqüentemente diminuindo os níveis de IFN- γ (McNamee *et al.*, 2011).

Outra forma de controle da ação da IL-18 é a presença da proteína de ligação à IL-18 (IL-18BP). A IL-18BP foi descoberta por acaso, quando se pesquisava sobre a presença de receptores solúveis da IL-18 (Novick *et al.*, 1999). A IL-18BP é uma proteína constitutivamente secretada por células endoteliais e por esplenócitos, assim como por células inflamatórias, como macrófagos (Corbaz *et al.*, 2002). A IL-18BP contém apenas um domínio IgG, sendo bastante similar ao IL-1R8 (SIGRR), que também apresenta apenas um domínio IgG em sua estrutura. A IL-18BP tem como papel regular negativamente a resposta Th1, visto que se liga com alta afinidade à IL-18. Além disso, a IL-18BP também controla a resposta Th2, visto que a IL-18 também induz IgE, sendo associada à diferenciação de células T *naïve* em células Th2 (Yoshimoto *et al.*, 2000a). Como uma molécula de IL-18BP se liga a apenas uma IL-18, o cálculo de quantidade de IL-18 livre pela IL-18 ligada pode ser feito em uma mistura dessas moléculas (Novick *et al.*, 2001), possibilitando-se verificar se a quantidade de IL-18BP é suficientemente alta para neutralizar a IL-18. Como a IL-18BP tem similaridade com o IL-1R8, essa pode ligar-se, também, à IL-37 (Bufler *et al.*, 2002); assim, a IL-18BP pode diminuir a resposta anti-inflamatória. Por exemplo, se administrada uma pequena dose de IL-18BP, verifica-se a redução da inflamação em um modelo de artrite reumatoide; porém, se há aumento da quantidade de IL-18BP administrada, o efeito anti-inflamatório é perdido (Banda *et al.*, 2003).

A regulação da IL-18BP é feita, por exemplo, pelo IFN- γ . Altos níveis de IFN- γ levam a um aumento desse potente inibidor natural da IL-18, gerando um *loop* de *feedback* negativo (Ludwiczek *et al.*, 2002). O mesmo acontece com a IL-27 na pele: altos níveis dessa citocina, associados à resposta inflamatória, levam ao aumento da IL-18BP (Wittmann *et al.*, 2012). De maneira muito interessante, os vírus da família *Poxviridae* possuem genes que codificam uma proteína com alta homologia com o gene da IL-18BP, dando a eles a habilidade de reduzirem a atividade da IL-18 em mamíferos (Xiang e Moss, 2001).

1.3 AÇÃO BIOLÓGICA DA IL-18

A primeira função descrita da IL-18 foi a capacidade de induzir a produção de IFN- γ pelas células NK e pelas células T que expressam IL-18R (Okamura, Tsutsi, *et al.*, 1995; Nakanishi *et al.*, 2001). Essa indução acontece com ou sem participação do TCR. Porém, para a indução de um perfil Th1 pela IL-18, é necessária a presença do TCR (Yang *et al.*, 1999). A IL-18 também apresenta a capacidade de induzir a produção de IFN- γ por células T e NK na presença da IL-12, da IL-15 e da IL-21. Isso acontece porque essas três citocinas aumentam a expressão do IL-18R (Yoshimoto *et al.*, 1998; Strengell *et al.*, 2003; Verri *et al.*, 2007). Em sinergia com a IL-12, a IL-18 induz a produção de IFN- γ por células Th0, por células T CD8⁺, por células NKT e por células B, visto que a IL-12 induz a expressão do receptor da IL-18 nessas células (Tomura *et al.*, 1998; Carroll *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 2014). No caso das células B, a IL-18 com a IL-12 inibem a produção de IgG1 dependente de IL-4 e a produção de IgE, mas aumentam a produção da IgG2a e induzem a produção de IFN- γ (Yoshimoto *et al.*, 1997; Yoshimoto *et al.*, 1998).

Apesar de a IL-18 ter sido descrita primordialmente como indutora de uma resposta Th1, com o tempo foi-se percebendo que ela tem, também, a capacidade de induzir uma resposta Th2. Foi descrito que células T CD4⁺ *naïve* de camundongos BALB/c em cultura com IL-2 e IL-18, independente da ativação de TCR, foram capazes de produzir IL-13 e IL-4. A capacidade de produção dessas citocinas foi aumentada quando houve estímulo com anti-CD3, mas, ao utilizar anti-IL-4 nessas culturas, as células T CD4⁺ perderam a capacidade de produzir essas citocinas e se desenvolveram em um perfil Th1, demonstrando que a IL-18 guia as células T para o perfil Th2 em uma via dependente de IL-4 (Sasaki *et al.*, 2005). Já mastócitos e basófilos em cultura, também de camundongos BALB/c, derivados de medula óssea estimulados com IL-3 por 10 dias, expressavam a cadeia α do IL-18R e, após estímulo com IL-18, foram capazes de produzir IL-13 e IL-4. Essas células, mesmo estimuladas com IL-18 e IL-12, não produziram IFN- γ (Yoshimoto *et al.*, 1999). Posteriormente, foi mostrado que camundongos deficientes para IFN- γ e infectados com helmintos respondem ao tratamento com IL-18 e IL-12, aumentando a produção de IgE por células B, em um mecanismo dependente de células T CD4⁺ e dependente da IL-4 e do STAT6 (Yoshimoto *et al.*, 2000b). As células NKT que, caso sejam estimuladas com IL-2 e IL-18, aumentaram a produção de IL-4 e foram capazes de induzir

células B a produzirem IgG1 e IgE (Konishi *et al.*, 2002). Já camundongos C57BL/6 infectados com o nematóide *Strongyloides venezuelensis* e pré-tratados com IL-2 e IL-18 desenvolveram mastocitose da mucosa e foram capazes de expulsar o nematóide, demonstrando como a IL-18 pode mediar uma resposta Th2 dependendo do ambiente em que ela se encontra (Sasaki *et al.*, 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que a IL-18 pode induzir células linfoides inatas (ILC) do tipo 2 a produzirem citocinas relacionadas à resposta Th2 (Ricardo-Gonzalez *et al.*, 2018).

Além das respostas Th1 e Th2, já foi descrito, também, que a IL-18 tem a capacidade de induzir a produção de IL-17 pelas células T CD4⁺ e pelas células T γ δ (Lalor *et al.*, 2011). Em um trabalho mais recente, foi demonstrado que talvez a IL-18 consiga induzir células Th17 a produzirem IL-17 independentemente da IL-23 (Harrison *et al.*, 2018). Ou seja, a IL-18 apresenta uma série de ações que dependem do ambiente em que ela se encontra, seja pelas citocinas ou pelos tipos celulares, como demonstrado na **Figura 2**.

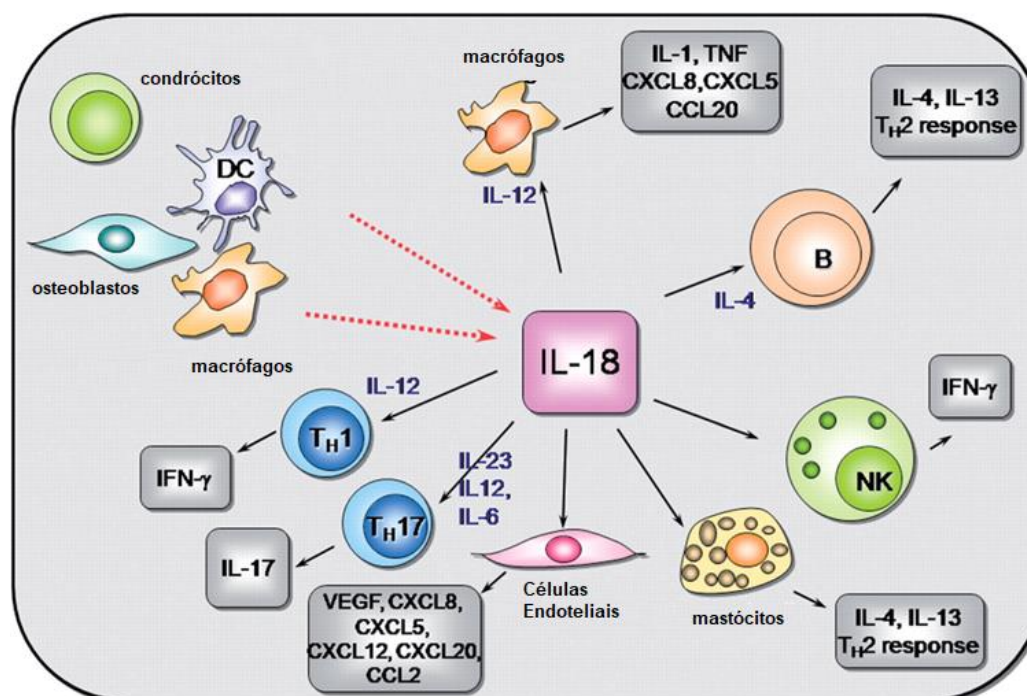


Figura 2: Esquema representativo das funcionalidades da IL-18. Figura adaptada (Carroll *et al.*, 2008).

1.4 IL-18 EM PROCESSOS PATOLÓGICOS

Animais deficientes para a IL-18, a partir da décima sexta semana, começam a ganhar mais peso do que os animais selvagens, apresentando acúmulo de gordura, desenvolvimento espontâneo de aterosclerose, resistência à insulina e diabetes mellitus (Netea *et al.*, 2006). O aumento de peso nos animais deficientes para a IL-18 foi atribuído ao aumento de ingestão de alimentos, cerca de 40% a mais do que os animais selvagens. O quadro de resistência à insulina parece desregular o controle do apetite desses animais, visto que eles se alimentam várias vezes ao longo do dia e os animais selvagens comem apenas uma vez no período noturno. De maneira muito interessante, a administração de IL-18 recombinante nesses animais reverte o quadro de resistência à insulina e regula os hábitos alimentares dos animais (Skurk *et al.*, 2005; Bruun *et al.*, 2007; Zorrilla *et al.*, 2007).

1.4.1 IL-18 em modelos de colite

Em um estudo de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) em camundongos C57BL/6 deficientes para a caspase 1, notou-se um quadro inflamatório aumentado quando comparados com o animal selvagem. Os animais nocautes recuperam a capacidade de cicatrização e apresentam melhora da mucosa ao ser administrada a IL-18 exógena. Além disso, a ausência da IL-18 parece ocasionar a disbiose intestinal, levando a um infiltrado de leucócitos no cólon, quadro que também é revertido ao administrar-se IL-18 (Dupaul-Chicoine *et al.*, 2010; Lopetuso *et al.*, 2013). Ainda em modelos de colite induzida por DSS, camundongos deficientes para o Receptor do tipo-NOD 3 (NLRP3) e NLRP6 também apresentaram piora do quadro de colite quando comparados com os animais selvagens, além de ter sido verificada uma menor quantidade de IL-18 nos animais deficientes para essas proteínas do inflamassoma (Chen *et al.*, 2007; Elinav *et al.*, 2011; Hirota *et al.*, 2011). Porém, animais deficientes para a IL-18 ou deficientes para a cadeia α do seu receptor nas células epiteliais do intestino apresentaram melhora do quadro de colite. Os animais WT apresentaram piora do quadro de colite quando houve depleção da IL-18BP, além de uma perda do amadurecimento das células caliciformes nesses animais.

Ou seja, o balanço da IL-18 livre ou ligada à IL-18BP é importante para a melhora do quadro de colite (Nowarski *et al.*, 2015). No intestino, a IL-18 parece ter um papel dicotômico:

em um contexto, a IL-18 aparece como indutora da maturação de células caliciformes, levando à produção de muco e de peptídeos antimicrobianos, auxiliando a manutenção da microbiota na luz do intestino e mantendo a barreira intestinal intacta. Além disso, a IL-18 pode modular a diferenciação das células Th17 e das células T reguladoras, visto que essas células expressam o receptor da IL-18 (Harrison *et al.*, 2015). Já em um contexto em que houve ruptura da barreira intestinal, a IL-18 parece estar envolvida no recrutamento de leucócitos e ativação desses leucócitos, aumentando a inflamação da mucosa intestinal (Siegmund, 2010; Hand, 2015).

1.4.2 IL-18 em modelos de aterosclerose e lesões do miocárdio

Como é sabido, cristais de colesterol, que tendem a se acumular nas lesões ateroscleróticas, são ativadores do inflamassoma via NLRP3 (Charmoy *et al.*, 2016). Além disso, macrófagos presentes na placa aterogênica expressam grandes quantidades da cadeia α do receptor da IL-18, além das células endoteliais vasculares também expressarem o receptor da IL-18 (Gerdes *et al.*, 2002). Em experimentos com camundongos ApoE nocaute propensos ao desenvolvimento de ateroma, a transfecção de plasmídeos capazes de codificarem a IL-18BP impediram a progressão do desenvolvimento das placas (Mallat *et al.*, 2001). Já o tratamento com IL-18 recombinante levou a um agravamento das lesões, fenômeno que não foi visto nos animais IFN- γ KO, levando a crer que a indução da produção de IFN- γ pela IL-18 promove a progressão do ateroma (Elhage *et al.*, 2003; Badimon, 2012). Entretanto, em animais ApoE^{-/-} IL-18^{-/-} com dieta rica em gorduras, a placa aterosclerótica se desenvolveu mais rapidamente do que nos animais WT, aparentemente por um mecanismo dependente de células Th17 em resposta à dieta rica em colesterol, demonstrando mais uma vez, que a IL-18 pode apresentar um papel dicotômico (Pejnovic *et al.*, 2009).

Já em modelos murinos de lesões no miocárdio e infarto, o tratamento desses animais antes da lesão isquêmica com anti-IL-18 ou com células mesenquimais produtoras da IL-18BP foi capaz de reduzir a área do infarto (Venkatachalam *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2015). A administração de IL-18 em camundongos C57BL/6 selvagens saudáveis induziu fibrose no tecido cardíaco após 7 dias; ademais, induziu a síntese de osteopontina por fibroblastos cardíacos. Além disso, a IL-18 parece estar envolvida no aumento do infiltrado inflamatório de macrófagos no miocárdio e no remodelamento patológico do tecido cardíaco (Woldbaek *et al.*, 2005; Platis *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2018).

1.4.3 IL-18 em modelos de patologias do sistema respiratório

Já em uma ação da IL-18 indutora de um perfil Th2, mostrou-se que camundongos BALB/c que superexpressam a IL-18 nos pulmões em um modelo de asma induzido por ovalbumina, apresentaram um infiltrado inflamatório aumentado de células T CD4⁺, células T CD8⁺, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos quando comparados com os animais selvagens. Além disso, os animais que superexpressam a IL-18 nos pulmões possuem um aumento significativo da quantidade de IFN- γ , IL-13 e eotaxina, além de uma maior quantidade de células T CD4⁺IL-13⁺. O tratamento com anti-CD4 ou a depleção da IL-13 foram capazes de reduzir o infiltrado inflamatório dos animais transgênicos, demonstrando que os efeitos da IL-18 neste modelo de asma são dependentes das células T CD4⁺ (Sawada *et al.*, 2013). Em um modelo da doença pulmonar obstrutiva crônica utilizando animais C57BL/6, encontrou-se no lavado broncoalveolar grande quantidade de macrófagos expressando altos níveis de caspase-1 e caspase-11. Utilizando o mesmo modelo, porém, em animais IL-18R α nocautes, verificou-se uma redução da inflamação pulmonar e diminuição do infiltrado inflamatório. Nos animais C57BL/6 que superexpressavam a IL-18 nos pulmões, encontrou-se uma grande quantidade de células T CD4⁺ no lavado broncoalveolar, tendo estas células perfis Th1, Th2 e Th17 (Hoshino *et al.*, 2007; Imaoka *et al.*, 2008).

Em um modelo de infecção pelo vírus influenza A em animais C57BL/6, demonstrou-se que o RNA viral foi capaz de ativar NLRP-3, o que acarreta aumento da produção da IL-18, que levou a maior indução da produção de IFN- γ pelas células NK, levando à proteção do animal. Em camundongos deficientes para caspase-1 e para a NLRP-3, a infecção por influenza A levou à maior dano nos pulmões, além de acarretar maior letalidade (Allen *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009).

1.4.4 IL-18 em modelos de artrite

Em modelos animais de artrite, a IL-18 aumenta a inflamação e a erosão da cartilagem, quadro que se reverte caso seja feito tratamento dos animais com a IL-18BP ou com anti-IL-

18, principalmente em modelos induzidos pela parede celular purificada do estreptococos (Joosten *et al.*, 2000; Haas *et al.*, 2006). A redução da inflamação ocorreu por mecanismos independentes do IFN- γ , visto que animais deficientes para o IFN- γ em um modelo de artrite induzida por colágeno responderam da mesma maneira ao tratamento com IL-18 recombinante. Além disso, verificou-se a presença da IL-18 nas articulações e a expressão do IL-18R e da IL-18 nas células epiteliais da articulação (Gracie *et al.*, 1999). Ao utilizarem animais deficientes para a IL-18 no mesmo modelo, houve diminuição da inflamação e do infiltrado inflamatório nas articulações dos animais (Wei *et al.*, 2001). Ao tratar os animais IL-18 KO com a IL-18 recombinante, aumenta-se os níveis de citocinas inflamatórias, a quantidade do infiltrado inflamatório e a destruição da cartilagem da articulação dos animais retorna. Além disso, aumenta-se a expressão de V-CAM-1 e ICAM-1 nos fibroblastos sinoviais (Morel *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2002). Verifica-se, também, o aumento da migração de neutrófilos para a lesão nos animais tratados com a IL-18, juntamente com o aumento da produção de TNF- α (Canetti *et al.*, 2003). Fibroblastos sinoviais presentes durante o quadro de artrite respondem ao TNF- α aumentando a produção da IL-18BP, da IL-18 e da caspase-1. Aparentemente a produção da IL-18 pelos fibroblastos sinoviais se dá pela ativação da via ERK1/2; porém, essa via não parece estar envolvida na produção da IL-18BP (Marotte *et al.*, 2010).

1.4.5 IL-18 em doenças de pele

A psoríase é uma patologia normalmente associada a exacerbação da resposta Th1 e Th17 na pele, com a participação da IL-22, e está também associada à proliferação de queratinócitos (Krueger, 2012; Lowes *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que queratinócitos humanos expressam o receptor da IL-18 e a IL-18 constitutivamente, além de ter sido encontrado níveis aumentados da IL-18 e da caspase-1 na pele de pacientes com lesões ativas de psoríase (Naik *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 2001; Companjen *et al.*, 2004b; a; Johansen *et al.*, 2007). Um dado interessante é que queratinócitos humanos estimulados com radiação UVB produzem IL-18 em um mecanismo que parece ser dependente de espécies reativas de oxigênio (Cho *et al.*, 2002). Já em modelos murinos, encontrou-se que a IL-18, juntamente com a IL-23, foi capaz de induzir a hiperplasia da epiderme e aumentar o *score* relacionado à lesão da psoríase. Além disso, a IL-18 com a IL-23 foram capazes de aumentar os níveis de IFN- γ e de CXCL-9. Além de induzir um perfil de células Th1, a IL-18 não inibe o eixo IL-23/IL-17,

contribuindo, então, para um ambiente mais inflamatório que parece agravar a lesão (Shimoura *et al.*, 2017). Outro trabalho mostrou que a presença das caspases-1/11 nas células do sistema imune tem um papel importante na manutenção da inflamação no modelo de psoríase animal. Em contrapartida, a ausência das caspases-1/11 nos fibroblastos e queratinócitos não causou quaisquer impactos no desenvolvimento da lesão (Aira *et al.*, 2018).

No caso da dermatite atópica, foram encontrados altos níveis da IL-18 em pacientes adultos, crianças e em camundongos (Tanaka *et al.*, 2001), sendo que aparentemente há uma relação do *score* das lesões com os níveis da IL-18 (Zedan *et al.*, 2015). Em experimentos utilizando camundongos que superexpressam a IL-18 e a caspase-1, estes desenvolveram espontaneamente dermatite atópica, demonstrando que a IL-18 parece ter um papel no desenvolvimento das lesões (Konishi *et al.*, 2002). Normalmente, a exposição a um alérgeno causa a piora das lesões de dermatite atópica (Bieber, 2008), sendo que, em modelos animais, a exposição a um alérgeno, como poeira, induziram o aumento da expressão da IL-18. Além disso, a IL-18 parece contribuir para o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* associada às lesões da dermatite atópica (Terada *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2011).

No lúpus eritematoso, o TNF tem um papel crucial no desenvolvimento da inflamação. O TNF é produzido pelos queratinócitos, fibroblastos e mastócitos na pele. A IL-18 aumenta a produção do TNF por essas células, levando à apoptose dos queratinócitos (Robinson e Werth, 2015). Sendo assim, ao que tudo indica, a IL-18 regula o desenvolvimento do lúpus eritematoso sistêmico (LES) via indução do TNF, além de a IL-18 induzir a ativação do MHC-II e aumentar a produção da CXCL10 durante a resposta inflamatória. Além disso, as redes extracelulares de neutrófilos (NETs) ativam o inflamassoma, aumentando a produção da IL-18 na sua forma ativa que, por sua vez, induz a formação de NETs, no lúpus eritematoso sistêmico (Kahlenberg e Kaplan, 2014). Em outros estudos, demonstrou-se que a IL-18 parece estar envolvida na disfunção de células endoteliais, apresentando um efeito deletério no reparo vascular nos modelos de LES (Yang e Chiang, 2015). Em um modelo murino de lúpus, utilizando o camundongo MRL/*lpr*, verificou-se altos níveis de IL-18 associado ao aparecimento de lesão renal. Os camundongos que foram tratados com a IL-18 tiveram aumento do dano renal e o aparecimento das lesões cutâneas do tipo asa de borboleta (Esfandiari *et al.*, 2001; Faust *et al.*, 2002). O animal MRL/*lpr* superexpressa a cadeia β do receptor da IL-18 nos linfócitos (Neumann *et al.*, 2001), o que parece ser a causa da suscetibilidade desses animais a desenvolverem espontaneamente essa doença que se parece com o lúpus.

Em amostras de tecido de pacientes com quelóide, encontraram-se altos níveis de IL-18 e do seu receptor quando comparadas com amostras de pele normal. Além dos altos níveis de IL-18, encontrou-se, também, um aumento na secreção de colágeno e matriz extracelular (ECM) (Do *et al.*, 2012). Fica claro, então, que a IL-18 desempenha um papel importante para a manutenção dos diversos ambientes inflamatórios na pele, seja na indução de inflamação, seja na regulação do reparo tecidual.

1.4.6 IL-18 nas infecções bacterianas

Em um modelo de infecção por *Mycobacterium avium* em camundongos BALB/c, que são suscetíveis, estes apresentaram diminuição da expressão de IL-12 e IL-18 e, conseqüentemente, a diminuição dos níveis de IFN- γ . Já os animais DBA/2, que são resistentes, apresentaram alta expressão de IL-12, IL-18 e IFN- γ (Kobayashi *et al.*, 1997). Animais C57BL/6 deficientes para a IL-18 apresentaram, também, baixos níveis de IFN- γ e um quadro de infecção grave, quadro este que foi revertido com o tratamento com a IL-18 recombinante. Encontra-se um padrão muito semelhante nas infecções por *Mycobacterium tuberculosis*, onde há grande produção de IL-18 via ativação de NLRP3, sendo que animais IL-18 deficientes mostraram-se mais suscetíveis à infecção do que os animais selvagens (Sugawara *et al.*, 1999).

Já nos modelos de pneumonia causada pela *Pseudomonas aeruginosa*, a IL-18 parece prejudicar a resposta do hospedeiro em eliminar a bactéria (Schultz *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 2003). O mesmo acontece nos modelos de infecção pela *Ixodes ovatus ehrlichia* (Ghose *et al.*, 2011). Nas infecções por *Listeria monocytogenes*, verificou-se que há uma grande ativação de NLRP3 e, conseqüentemente, grande produção da IL-18 ativa (Wu *et al.*, 2010), sendo que a IL-18 parece ajudar na eliminação da bactéria (Tsuji *et al.*, 2004). A IL-18 parece proteger o hospedeiro nas infecções por *Streptococcus pneumoniae* pela indução de IFN- γ (Lauw *et al.*, 2002).

Verificamos, então, que, em diversos modelos de infecção bacteriana, a IL-18 parece estar associada a um fenótipo de resistência causado pelo aumento da produção do IFN- γ . Porém, há exemplos, também, da IL-18 associada à piora do quadro inflamatório e aumentando a dificuldade do hospedeiro em eliminar o agente infeccioso. Ou seja, mais uma vez, a IL-18 aparece com papel dicotômico.

1.4.7 IL-18 nas infecções por protozoários

Com relação aos parasitos intracelulares, foi demonstrado que o inflamassoma NLRP3 é ativado durante a infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania* (Zamboni e Lima-Junior, 2015). Ao infectarem-se camundongos C57BL/6 deficientes para NLRP3, caspase-1 e MyD88 com *Leishmania amazonensis* verificou-se a piora do quadro inflamatório e da lesão nesses animais. Aparentemente a IL-1 β exerce papel protetor na infecção pela *L. amazonensis* (Lima-Junior *et al.*, 2013). Dados do nosso grupo demonstraram que os camundongos C57BL/6 deficientes para a IL-18 e infectados pela *L. amazonensis* apresentam menor lesão e menor carga parasitária quando comparados com os animais selvagens (Sousa *et al.*, 2015). Macrófagos de camundongos BALB/c infectados pela *L. amazonensis* e tratados com o extrato da planta *Calophyllum brasiliense* apresentaram maior ação leishmanicida, e também, uma diminuição da expressão do mRNA de TNF, IL-1 β , IL-10 e IL-18 (Domeneghetti *et al.*, 2018). Já na infecção pela *L. major* em camundongos BALB/c, o tratamento com a IL-12 sozinha é capaz de reduzir a lesão e a carga parasitária; porém, o tratamento somente com a IL-18 não resulta em melhora das lesões. Já a administração diária das duas citocinas juntas a partir da primeira semana de infecção preveniu o inchaço das patas dos animais infectados (Sypek *et al.*, 1993; Ohkusu *et al.*, 2000; Schopf *et al.*, 2001). Foi demonstrado, também, que a IL-18 pode estar envolvida no desenvolvimento de uma resposta Th1 e Th17 na infecção por *L. major* em camundongos BALB/c (Voronov *et al.*, 2010). De maneira interessante, os animais C57BL/6 deficientes para a IL-18 e infectados pela *L. major*, apesar de apresentarem uma lesão aumentada na pata nas duas primeiras semanas de infecção quando comparados com os animais selvagens, acabam se recuperando e desenvolvendo uma resposta Th1 capaz de controlar o parasito. Ao que parece, a IL-18 está associada a um perfil de resistência (Wei *et al.*, 1999; Monteforte *et al.*, 2000). Outro trabalho demonstrou que animais BALB/c deficientes para a IL-18 são mais resistentes à infecção pela *L. major* do que os animais selvagens; já os animais DBA/1 deficientes para a IL-18 são mais suscetíveis à infecção por *L. major* do que os animais selvagens, ou seja, o papel da IL-18 na infecção pela *L. major* é bastante alterado de acordo com o fundo genético do hospedeiro utilizado como modelo (Wei *et al.*, 2004).

Já na infecção por *L. mexicana* em camundongos BALB/c, os animais deficientes para a IL-18 são mais resistentes à infecção do que os animais selvagens, apresentando menor lesão

e menor carga parasitária. Esplenócitos isolados dos animais deficientes para a IL-18 e estimulados com antígeno da *L. mexicana* produziram mais IFN- γ e menos IL-4 do que os esplenócitos dos animais selvagens. Ou seja, aparentemente na infecção por *L. mexicana* a IL-18 está associada a um aumento da resposta do tipo Th2 e a um perfil de suscetibilidade (Bryson *et al.*, 2008).

Em um modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c, verificou-se que o mRNA para a IL-12p40 e para a IL-18 estão aumentados no baço desses animais, o que pode-se relacionar com os altos níveis de IFN- γ encontrados (Meyer Zum Buschenfelde *et al.*, 1997). Utilizando animais C57BL/6 deficientes para a IL-18, verificou-se que esses animais apresentavam maiores quantidades de IL-12 e IFN- γ , assim como aumento de células T CD4⁺ e CD8⁺ IFN- γ ⁺ no baço. Notou-se, também, uma menor quantidade de células T reguladoras e células IL-10⁺. Além disso, os animais IL-18 KO apresentavam uma redução no infiltrado de leucócitos e menor carga parasitária no miocárdio quando comparados com os animais selvagens (Esper *et al.*, 2014). Sabe-se, também, que a ativação de MyD88 nos cardiomiócitos leva à produção de IL-18 e IL-1 β , com consequente aumento da migração de leucócitos para o sítio inflamatório (Santana *et al.*, 2018). Mostrou-se, também, que a infecção de macrófagos por *T. cruzi* induz a ativação de caspase-1 e produção de IL-1 β e IL-18. Além disso, animais deficientes para NLRP3, ASC e caspase-1 ficam mais doentes e apresentam maior parasitemia, além de apresentarem maior taxa de sobrevivência do que os animais selvagens; entretanto, o papel da IL-18 não é claro (Goncalves *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013). Na infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos deficientes para a IL-18, estes se apresentam mais suscetíveis à infecção do que os animais selvagens, mas o papel da IL-18 na infecção por *T. gondii* ainda precisa ser elucidado (Gorfu *et al.*, 2014).

1.5 MODELOS DE ESTUDO DE INFLAMAÇÃO NA PELE

1.5.1 - Infecção por *Leishmania*

1.5.1.1 Epidemiologia e ciclo de vida

Leishmanioses são o conjunto de doenças causadas pelos parasitos do gênero *Leishmania*. As leishmanias são protozoários pertencentes à classe Kinetoplastea e à família

Trypanosomatidae, sendo parasitos heteroxênicos, ou seja, para completarem seu ciclo de vida necessitam passar por dois hospedeiros, alternando entre um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado (Akhoundi *et al.*, 2016). A transmissão da *Leishmania* acontece quando o vetor invertebrado infectado inocula o parasito no hospedeiro vertebrado. Os principais vetores estão classificados nos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo os vetores pertencentes ao gênero *Phlebotomus* responsáveis pelas transmissões no Velho Mundo, representado pelas regiões: Europa, África, Oriente Médio e Ásia; e os vetores pertencentes ao gênero *Lutzomyia* responsáveis pelas transmissões no Novo Mundo, representado pela região: América do Sul (Claborn, 2010).

As características clínicas incluem uma série de manifestações com diferentes graus de gravidade, sendo classificadas, a grosso modo, como formas cutânea, mucocutânea e visceral, sendo as formas cutânea e mucocutânea associadas à graus variados de morbidade e a forma visceral associada à morbidade e à mortalidade. As manifestações clínicas estão normalmente agrupadas de acordo com as espécies de *Leishmania*, como por exemplo: *Leishmania major* está associada à Leishmaniose Cutânea (LC) no Velho Mundo, a *Leishmania amazonensis* está associada à LC e Leishmaniose Cutânea Difusa no Novo Mundo e a *Leishmania brasiliensis* está associada à LC e à Leishmaniose mucocutânea no Novo Mundo. Já a Leishmaniose Visceral (LV) é causada pela *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*. Hoje, já são mais de 20 espécies de *Leishmania* identificadas no mundo (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

As leishmanioses estão distribuídas em cerca de 89 países nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do planeta, com mais de 350 milhões de pessoas em situações de risco de contraírem alguma das formas da doença. Há cerca de 12 a 15 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo que há uma estimativa de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LC por ano no mundo. A taxa de mortalidade está em 70 mil mortes por ano. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem nos países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul. Já a LC é mais distribuída pelo globo, sendo que 75% dos casos do mundo estão concentrados nos países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria (Global leishmaniasis update, 2006-2015: a turning point in leishmaniasis surveillance, 2017).

Durante o seu ciclo de vida, são observadas duas formas principais do parasito: a forma promastigota e a forma amastigota. A amastigota é caracterizada por ter uma forma ovoide, sem flagelo aparente, sendo encontrada principalmente dentro das células fagocitárias do hospedeiro

vertebrado. Já a promastigota é caracterizada por ter uma forma afilada e com flagelo funcional, sendo encontrada principalmente no trato digestório do hospedeiro invertebrado. A fêmea do flebotomíneo, ao fazer o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, acaba ingerindo formas amastigotas. Dentro do trato digestório do flebotomíneo o parasito irá passar por diversos estágios de diferenciação que culminará na formação de promastigotas metacíclicas, forma flagelada e altamente móvel e adaptada para sobreviver no hospedeiro vertebrado (Bates, 2007). Cerca de 7 a 14 dias após a infecção do flebotomíneo, o parasito já se encontra na forma promastigota metacíclica e produzindo um gel à base de proteofosfoglicanos no terço anterior do tubo digestório do inseto. A formação desse gel dificulta o repasto sanguíneo do vetor, o que faz com que o tempo do repasto seja maior e que o vetor faça mais de um repasto, acarretando em um maior sucesso na transmissão do parasito para o hospedeiro vertebrado (Rogers *et al.*, 2004). No primeiro repasto sanguíneo, poucos parasitos são passados para o hospedeiro vertebrado. Após subseqüentes repastos, os parasitos na forma promastigota metacíclica que permanecem no flebotomíneo se desdiferenciam para a forma retoleptomona, que é uma forma replicativa do parasito. Após replicar-se e produzir mais do gel, a forma retoleptomona se diferencia, mais uma vez, para a forma promastigota metacíclica. Assim, nos próximos repastos sanguíneos há um aumento das chances de o parasito infectar os hospedeiros vertebrados (Doehl *et al.*, 2017; Serafim *et al.*, 2018). Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por neutrófilos, macrófagos e outras células fagocitárias na pele. Uma vez dentro do fagolisossomo, as formas promastigotas se diferenciam na forma amastigota, sendo esta a forma replicativa no hospedeiro vertebrado (Murray *et al.*, 2005) e retornamos, então, ao início do ciclo.

1.5.1.2 Resposta imune

Assim que as promastigotas metacíclicas da *Leishmania* passam para o hospedeiro vertebrado, elas são fagocitadas pelos macrófagos residentes da pele. Além dos macrófagos, neutrófilos são rapidamente recrutados para o foco da infecção (Peters *et al.*, 2008). Uma vez fagocitadas, as promastigotas irão se diferenciar nas formas amastigotas, para então começarem a replicação, esse período inicial da infecção dura cerca de 8 dias (Seyed *et al.*, 2018).

Monócitos inflamatórios e células dendríticas também são recrutadas para o sítio da infecção, sendo bastante infectados pelos parasitos (Ribeiro-Gomes e Sacks, 2012).

Uma das características da infecção dos monócitos é que, ao contrário dos macrófagos, que precisam ser ativados pelo IFN- γ para produzirem espécies reativas de oxigênio (ROS), os monócitos já as produzem quando infectados (Goncalves *et al.*, 2011) e isso se torna mais evidente no caso de uma infecção secundária (Romano *et al.*, 2017). Os neutrófilos na lesão podem apresentar papéis antagônicos durante a infecção pela *Leishmania*. Na infecção pela *L. amazonensis*, os neutrófilos matam os parasitos ao liberarem as redes extracelulares (NET) (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009; Rochael *et al.*, 2015), assim como podem ativar os macrófagos a eliminar os parasitos *L. amazonensis* e *L. brasiliensis* (Novais *et al.*, 2009; De Souza Carmo *et al.*, 2010). Porém, na infecção por *Leishmania major*, os neutrófilos infectados iniciam o processo de apoptose e são, então, fagocitados por células dendríticas ou macrófagos. Assim, os parasitos entram nas células fagocitárias de maneira silenciosa, o que favorece a replicação do parasito, já que essas células fagocitárias não foram ativadas em um sentido inflamatório. Esse mecanismo é conhecido como “cavalo de Tróia” (Ribeiro-Gomes e Sacks, 2012). Entretanto, a função dos neutrófilos parece depender, também, do fundo genético dos animais nos diversos modelos de infecção para *Leishmania*. Animais C57BL/6 infectados por *Leishmania major* não sofrem alterações no desenvolvimento das lesões caso seja feita a depleção dos neutrófilos (Ordonez-Rueda *et al.*, 2012). Já animais BALB/c infectados por *Leishmania amazonensis* apresentam uma piora considerável no desenvolvimento da lesão caso seja feita a depleção dos neutrófilos nos tempos iniciais da infecção (Sousa *et al.*, 2014) mas, caso seja feita a depleção dos neutrófilos nos animais BALB/c infectados pela *L. major*, verifica-se a diminuição das lesões e a diminuição da carga parasitária, assim como uma diminuição da IL-4 e aumento do IFN- γ , indicando que, talvez, os neutrófilos estejam envolvidos na polarização para um perfil Th2 (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000).

Os macrófagos são uma população de células de suma importância para o controle das infecções por *Leishmania* (Mosser e Edwards, 2008); porém, podem agir no sentido de eliminar o parasito ou de propiciar um ambiente favorável ao parasito, dependendo da forma como foi ativado. Os macrófagos ativados por IFN- γ e por TNF produzem IL-12, IL-18 e TNF, que levam ao aumento da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ e células NK (Munder *et al.*, 1998; Dale *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014), o que leva à ativação de mais macrófagos. O macrófago infectado e ativado por IFN- γ e TNF desencadeia uma cascata que leva a um aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS). Essa enzima tem como

substrato a L-arginina, que quando metabolizada leva à produção de óxido nítrico (NO), que é altamente tóxico para parasitos como a *L. major* (Green *et al.*, 1990; Heinzl *et al.*, 1993; Lopes *et al.*, 2014), mas que não possui um efeito tóxico tão marcante nas infecções por *L. amazonensis* (Lemos De Souza *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2008; Soong, 2012). Esses macrófagos podem ser ativados, também, pela IL-4 e, diferentemente de quando ativados pelo IFN- γ e pelo TNF, aumentam a expressão da enzima arginase I. A arginase I possui o mesmo substrato que a iNOS, a L-arginina; porém, ao metabolizá-la, leva à formação da ornitina, que é um precursor de poliaminas, que são utilizadas pelo parasito para aumentarem a sua replicação (Mantovani *et al.*, 2004; Kreider *et al.*, 2007; Loke *et al.*, 2007). Além dos perfis de ativação dos macrófagos pelo IFN- γ e pela IL-4, caso os macrófagos sejam ativados pela IL-10, teremos um terceiro perfil de ativação. Primeiramente a IL-10 aumenta a produção do Supressor de Sinalização de Citocinas 3 (SOCS3), que inibe o sinal de ativação da IL-12 via o IL-12R (Yamamoto *et al.*, 2003; Chuang *et al.*, 2016), assim como diminui a produção da IL-12 (Aste-Amezaga *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2015). Assim, a IL-10 consegue diminuir a ativação dos macrófagos em um perfil inflamatório. Porém isso pode ser positivo para o desenvolvimento da infecção por *Leishmania* (Kane e Mosser, 2001).

A infecção experimental por *L. major* nos camundongos C57BL/6 e nos camundongos BALB/c iniciaram as discussões do papel da imunidade adaptativa nas infecções por *Leishmania*, assim como ampliou a discussão acerca do papel dos componentes celulares e humorais nos modelos de infecção pelo parasito (Locksley *et al.*, 1987; Locksley *et al.*, 1991). Identificou-se que o camundongo C57BL/6 infectado pela *L. major* consegue curar a lesão causada pelo parasito. Além disso, notou-se que esse animal produzia uma grande quantidade de IFN- γ e NO. Essa quantidade aumentada de IFN- γ e IL-12 em detrimento da quantidade da IL-4, por exemplo, leva ao desenvolvimento de um perfil de células T efectoras do tipo Th1. Esse modelo foi classificado como sendo um modelo de resistência à *L. major*. Em contrapartida, a infecção por *L. major* no animal BALB/c é caracterizada por uma lesão persistente e grande carga parasitária. Esse animal produz uma baixa quantidade de IFN- γ , mas uma grande quantidade de IL-4. Ou seja, nesse contexto há o desenvolvimento de um perfil de células T efectoras do tipo Th2. Esse modelo foi classificado como sendo um modelo de suscetibilidade à *L. major* (Holaday *et al.*, 1991; Chatelain *et al.*, 1992; Park *et al.*, 2000). A fonte principal de IL-12 são as células dendríticas, que, em sua maioria, são derivadas dos monócitos inflamatórios que foram recrutados para o foco da infecção. Essas células migram para os linfonodos drenantes e primam as células Th0, que agora entram em expansão clonal

seguindo um perfil Th1 (Leon *et al.*, 2007). Já a fonte principal de IL-4 na lesão ainda não é muito clara (Hurdal e Brombacher, 2014). Outros estudos demonstraram que uma população de células Th17 também tem um papel importante no desenvolvimento das lesões na infecção por *L. major*. Animais BALB/c deficientes para a IL-17 desenvolveram lesões menores e menor carga parasitária do que os animais selvagens (Lopez Kostka *et al.*, 2009). Camundongos C57BL/6 deficientes para IL-10 e infectados com *L. major* possuem lesões aumentadas, mas menor quantidade de parasitos na lesão quando comparados com os animais selvagens. Encontram-se nesses animais, níveis aumentados de IFN- γ e IL-17, assim como um aumento do infiltrado de monócitos e neutrófilos. Ao bloquear IFN- γ , há aumento dos níveis de IL-17 e do infiltrado de neutrófilos e, conseqüentemente, a piora da lesão. Ou seja, aparentemente o IFN- γ regula a quantidade da IL-17 produzida (Gonzalez-Lombana *et al.*, 2013).

Esse modelo da dicotomia Th1 e Th2 é bastante válido na infecção por *L. major* nos animais C57BL/6 e BALB/c, respectivamente; porém, não se aplica à infecção por todas as espécies de *Leishmania*. Na infecção por *L. amazonensis*, por exemplo, há baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias na lesão, tais como IL-1 β , IFN- γ , IL-12, CCL-5, MCP-1, TNF e uma maior produção de IL-4 e IL-10. Em modelos experimentais, as células dendríticas apresentam baixos níveis de expressão de CD40, o que acarreta um comprometimento da ativação de células T e, conseqüentemente, uma diminuição dos níveis de citocinas produzidas no local (Soong, 2008; 2012). Junto a isso, soma-se o fato de que, na infecção por *L. amazonensis*, as células dendríticas migram menos do sítio de infecção para o linfonodo drenante, local onde primam as células Th0 (Hermida *et al.*, 2014). Aparentemente, a *L. amazonensis* aumenta a produção de AMP cíclico em uma reação dependente do receptor A_{2b} nas células dendríticas. Com isso, verifica-se a diminuição da expressão do CD40 e da produção de IL-12 pelas células dendríticas (Figueiredo *et al.*, 2017). Juntamente com o comprometimento das células dendríticas, verifica-se que na infecção por *L. amazonensis* há um comprometimento na expressão da cadeia β 2 do receptor da IL-12, o que dificulta a formação de uma população mais robusta de células Th1. Os níveis aumentados de IL-10 no início da infecção auxiliam a manutenção de um ambiente pouco propício para o desenvolvimento de uma resposta Th1; porém, não é um efeito duradouro (Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002). Outro mecanismo interessante de evasão da *L. amazonensis* é que o parasito aumenta a expressão da histona deacetilase 1 (HDAC1) nos macrófagos infectados. A histona desacetilada regula negativamente a expressão gênica da iNOS através da formação de complexos contendo o fator de transcrição NF- κ B p50/50 e a HDAC1. O NF- κ B p50/50 carrega

a HDAC1 para o núcleo e, assim, há a deacetilação da histona H3K9, levando ao silenciamento do gene da iNOS. Dessa maneira, a *L. amazonensis* diminui a quantidade de NO produzida pelos macrófagos (Calegari-Silva *et al.*, 2018). Além disso, sabe-se que a *L. amazonensis* aumenta a expressão de proteínas envolvidas na resistência ao estresse oxidativo durante a sua diferenciação de promastigota para amastigota. Foram encontradas em promastigotas em cultura as proteínas arginase e ferro superóxido dismutase (Fe-SOD), ou seja, o parasito possui mecanismos para diminuir o estresse oxidativo e posteriormente inibir a produção de NO (Alcolea *et al.*, 2016).

1.6 λ -CARRAGENINA

Ainda em modelos de inflamação na pele, a Carragenina tem se mostrado como um eficiente indutor da inflamação estéril aguda. Carragenina é um nome genérico que vem da palavra irlandesa “*carraigín*”, que significa musgo irlandês, que se refere não apenas às algas vermelhas da classe Rhodophyceae, mas também aos polissacarídeos dela extraídos (Tobacman e Walters, 2001). A carragenina é um complexo polissacarídeo, formado por monômeros sulfatados da galactose, com massa molecular relativa de 100kDa. É classificada em vários tipos, tais como lambda (λ), kappa (κ), iota (ι), épsilon (ϵ), mu (μ). Essa classificação é feita baseada na solubilidade em cloreto de potássio. Cada uma das formas tem suas próprias características na formação de um gel de densidades diferentes quando em solução. Porém, esse estado é reversível termicamente em todas as formas da carragenina. A carragenina é bastante utilizada na indústria alimentícia, pois proporciona consistência gelatinosa e espessa aos alimentos (Van *et al.*, 2002). A forma lambda se apresenta como um fluido menos viscoso do que as formas kappa e iota em temperatura ambiente, sendo, então, facilmente inoculada para estudos de resposta inflamatória (Morris, 2003). Após a injeção subcutânea de uma solução de carragenina em salina 0,9% rapidamente aparecem os sinais cardinais da inflamação: edema, dor e eritema (Winter *et al.*, 1962; Mohr *et al.*, 1991; Lissner *et al.*, 2018).

A carragenina é bastante utilizada em modelos de edema de pata para avaliação de dor no local da inflamação (Fehrenbacher *et al.*, 2012). O desenvolvimento do edema na pata de ratos após a injeção de solução de carragenina acontece, primeiramente, devido à liberação de histamina, serotonina e bradicinina no local da inflamação, assim como prostaglandinas envolvidas no aumento da permeabilidade vascular no local do desafio. Além desses

mediadores químicos, verifica-se, também, o aumento nos níveis de IL-1, IL-6 e TNF no local do desafio e sistemicamente (Cuzzocrea *et al.*, 1999). O desafio com carragenina leva, também, ao aumento do infiltrado de neutrófilos no sítio da lesão (Posadas *et al.*, 2004), assim como o aumento dos níveis de iNOS e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o que proporciona produção de maiores níveis de óxido nítrico (NO) na lesão (Handy e Moore, 1998; Omote *et al.*, 2001). O desafio com a λ -carragenina em camundongos Swiss mostrou que há o recrutamento de monócitos e macrófagos para o local da inflamação e que essas células estão ativadas em um sentido pró-inflamatório, demonstrando que essa variedade da carragenina induz um perfil inflamatório. Houve aumento da produção de TNF pelos macrófagos, mais do que nos animais que foram desafiados com LPS, assim como um aumento da produção de NO nesses macrófagos ativados (Nacife *et al.*, 2004). A carragenina diminui a capacidade dos macrófagos de fagocitarem leveduras; porém, os macrófagos que foram desafiados com a carragenina conseguiram eliminá-las de forma mais eficiente (Tam e Hinsdill, 1984). O desafio com a carragenina, por se tratar de um modelo agudo de inflamação, está relacionada à geração de uma resposta com predominância de fatores relacionados com a imunidade inata (Annamalai e Thangam, 2016). Além dos macrófagos e neutrófilos, a carragenina parece induzir a maturação de células dendríticas via receptor do tipo Toll 4 (TLR4), aumentando a produção de IL-12 e TNF por essas células (Li *et al.*, 2017).

Em um modelo de indução de inflamação pela carragenina na pata de camundongos BALB/c, verificou-se que, ao tratar os animais com IL-18 recombinante, houve o acúmulo de neutrófilos na lesão e, conseqüentemente, a piora do quadro inflamatório. Ao neutralizar a IL-18, nota-se a diminuição da lesão na pata dos animais, assim como a diminuição da mieloperoxidase (MPO) nos tecidos e diminuição dos níveis de TNF no local da lesão, sendo que os neutrófilos desses animais expressam o receptor da IL-18 (Leung, B. P. *et al.*, 2001). Já em um modelo de pleurite induzida em camundongos CD1 pela carragenina, o bloqueio do inflamassoma NLRP3 levou à melhora do quadro inflamatório, como diminuição da MPO no tecido e diminuição dos níveis de TNF (Fusco *et al.*, 2017).

A IL-18 é uma citocina bastante versátil, que atua modulando a resposta inflamatória, seja no acúmulo e ativação de fagócitos no sítio inflamatório, seja induzindo populações de células T efetoras nos perfis Th1, Th2, Th17 e até T reguladoras. Em nossos experimentos, vimos que a IL-18 parece estar envolvida no desenvolvimento das lesões cutâneas na infecção por *L. amazonensis*. Então, como será que a IL-18 promove a manutenção das lesões nesse modelo de inflamação na pele? Será que o agente inflamatório tem a capacidade de modular os efeitos da IL-18 em prol da manutenção da lesão? E será que em um modelo diferente de inflamação na pele a IL-18 também atuaria reforçando um ambiente inflamatório? Para respondermos a essas questões, escolhemos estudar a influência da IL-18 e da sua ausência em um modelo de infecção pelo parasito *Leishmania amazonensis*. Assim, analisaríamos um quadro inflamatório crônico, com lesão de pele e recrutamento de células tanto da imunidade inata como da imunidade adaptativa. Outro modelo escolhido de indução de inflamação na pele foi o da lesão induzida pela carragenina, dessa vez, um modelo agudo, com intensa participação de células da imunidade inata. Como a IL-18 é a única das citocinas conhecidas que tem a capacidade de induzir cenários tão distintos (Dinarello, 2018), com nossos experimentos, esperamos discutir e explicitar as influências da IL-18 no desenvolvimento das lesões cutâneas nos modelos escolhidos.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: analisar o envolvimento da IL-18 na inflamação da pele em modelo de infecção por *L. amazonensis* e em um modelo de inflamação estéril induzida por carragenina.

Objetivos específicos:

- Analisar o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO na infecção por *L. amazonensis*.
- Avaliar a influência das células T CD4⁺ na infecção pela *L. amazonensis*, seja na presença ou ausência da IL-18.
- Caracterizar o perfil da ativação das células T CD4⁺ na infecção pela *L. amazonensis*.
- Analisar o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO na lesão induzida pela carragenina.
- Avaliar o perfil celular inflamatório nos camundongos selvagens e IL-18 KO no curso da lesão induzida por carragenina.
- Avaliar o perfil das células T no baço e intestino dos camundongos selvagens e IL-18 KO.
- Avaliar a morfologia dos órgãos linfoides periféricos entre os camundongos selvagens e IL-18 KO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OS ANIMAIS

Camundongos da linhagem C57BL/6 (selvagens) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas Biotério (CEBIO/UFMG). Os animais B6 ACTb-EGFP [C57BL/6 Tg (CAG-EGFP)^{10sb/J}] foram cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Batista Menezes. Os camundongos *knockout* (KO) (nos quais o gene de interesse foi deletado por recombinação homóloga) para o gene da citocina IL-18 [IL-18 ^{-/-}, B6.129P2-il18^{tm1Aki/J}] (Takeda *et al.*, 1998) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Alan Sher (NIH, Bethesda, MD, EUA) e as colônias de criação foram mantidas em micro isoladores dotados de filtro e ventilação no biotério de criação do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, UFMG.

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 e seis semanas.

Todos os procedimentos realizados com os camundongos estão em acordo e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob os protocolos: 050/09 e 150/2015.

3.2 OS 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 BRL Life Technologies). As culturas foram mantidas em estufa BOD 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 (GIBCO) completo. Posteriormente, foram transferidos 50 μL 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 intradérmica, foram utilizadas 10², 10³, 10⁴ e 10⁵ 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 e 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, 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 μl . A lesão induzida na orelha desses camundongos foi acompanhada semanalmente, com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett, Itu, SP, Brasil).

3.4 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR CARRAGENINA

Foi utilizada λ -carragenina (Sigma-Aldrich) a 1% p/v em salina 0,9% e aquecida a 90°C. adicionada lentamente para não haver formação de gel. Foi feita a injeção de 10 μL da solução por via intradérmica na orelha direita e PBS na orelha esquerda dos camundongos (Morris, 2003). A lesão foi acompanhada e medida diariamente por até 72 horas com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett). Os experimentos foram realizados nos tempos de quatro, vinte e quatro e setenta e duas horas após o desafio com carragenina.

3.5 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 de Grace (GIBCO). Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços e fundo chato (TPP), foram colocados 150 µL/poço de meio de Grace (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 ponteiras 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.

3.6 EXTRAÇÃO DE TECIDO PARA DOSAGEM DE CITOCINAS NA LESÃO

Nos tempos determinados para o estudo das lesões cutâneas, 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: uma cápsula do inibidor de proteases (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, ALE) 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.

3.7 DETECÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

As dosagens de TNF e IL-12p70 a partir do sobrenadante do homogenato das células 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 duas citocinas.

A detecção de IFN- γ foi feita a partir de kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Para a detecção de IL-18, foi utilizado o kit da Invitrogen, seguindo as especificações do fabricante. O limite de detecção foi de 25pg/ml (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA).

3.8 CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras de orelhas e intestino delgado de camundongos selvagens e IL-18 KO foram coletadas após infecção por *L. amazonensis* ou após desafio com carragenina. As amostras foram cortadas em pedaços menores e incubadas por 1h 30min em 1 ml de meio RPMI sem SFB contendo 62,5 μ g/ml de liberase TL (Roche) e 0,5 mg/ml de desoxiribonuclease I (Sigma Chemical). Após este período, foi adicionado mais 1 ml de RPMI 10% SFB por amostra. As amostras de linfonodos drenantes e do baço não passaram pelo processo de digestão dos tecidos. As amostras foram então maceradas e o homogenato centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 4°C. Para as marcações de IL-10 e IL-17, as amostras foram estimuladas com PMA a 25ng/ml e ionomicina a 1 μ g/ml. Adicionou-se a Brefeldina A a 1 μ g/ml juntamente com os outros estímulos e as amostras foram incubadas a 37 C° em uma placa de 96 poços de fundo redondo (Costar - Sigma-Aldrich) por no máximo 4 horas. 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, San Diego, CA, EUA); anti-CD11c (clone HL3); anti-MHC II (clone M5/114,15,2); anti-CD11b (clone M1/70); anti-CD4 (clone GK1.5); anti-TCR- β (clone H57-497); anti-IL-18R(CD-218 α) (clone P3TUNYA) (eBioscience) e anti-NK1.1 (clone PK-136). Para as marcações intracelulares, fixamos as células com Fix Buffer e permeabilizamos com Perm Wash (BD Biosciences Pharmingen, São José, CA, EUA). Foram utilizados os seguintes marcadores intracelulares: anti-Foxp3 (clone MF23); anti-IL-10 (clone JES5-16E3); anti-RoryT (clone 600380) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA); anti-T-bet

(clone 4B10); anti-Gata3 (clone 16E10A23); e anti-IL-17A (clone TC11 18H 10.1) (BioLegend CNS, Inc., San Diego, CA, EUA). 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). 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 células foram adquiridas para cada amostra de orelha, usando o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Bioscience Pharmingen). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). Para a determinação do número absoluto de células, foi feita a contagem das células de cada amostra na câmara de Neubauer. Após o cálculo para acertar a quantidade de células contadas ao volume utilizado na leitura, aplicou-se ao número total das células de cada amostra, a sequência de porcentagens encontradas durante a leitura no citômetro, seguindo as porcentagens dos *gates* específicos.

3.9 DEPLEÇÃO EXPERIMENTAL DE LINFÓCITOS T CD4+

A depleção de linfócitos T CD4⁺ foi feita com a utilização do anticorpo anti-CD4 clone GK1.5, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso (UFOP, MG, Brasil). Administramos 100µl do anticorpo a 1 mg/ml na cavidade peritoneal dos camundongos. Iniciamos o protocolo de depleção na terceira semana após a infecção. Neste momento, três doses dos anticorpos foram administradas a cada dois dias no intervalo de uma semana nos animais. Após esse período, uma depleção semanal foi realizada até a sexta semana de infecção. O grupo controle recebeu tratamento similar com 1 mg/ml de IgG de rato purificado, como controle de isotipo (Sigma-Aldrich). Seguimos este protocolo de acordo com trabalho anteriormente publicado (Kruisbeek, 2001), com algumas modificações para nosso modelo experimental.

3.10 BLOQUEIO EXPERIMENTAL DO RECEPTOR DA IL-10

O bloqueio do receptor da IL-10 foi feito com a utilização do anticorpo anti-IL10R clone 1B1.3A, gentilmente cedido pelo Dr. David Sacks (NIH). Administramos 100µl do anticorpo a 5mg/ml na cavidade peritoneal dos camundongos. Iniciamos o protocolo de depleção na terceira semana após a

infecção. Neste momento, uma dose dos anticorpos foi administrada a cada três dias no intervalo de uma semana nos animais. Após esse período, uma depleção semanal foi realizada até a quinta semana. O grupo controle recebeu tratamento similar com 100µl do anticorpo a 5mg/ml de IgG de rato purificado (Sigma-Aldrich). Seguimos este protocolo de acordo com trabalho anteriormente publicado (Belkaid *et al.*, 2001).

3.11 TRATAMENTO COM CÉLULAS DO LINFONODO DRENANTE

Para o tratamento dos animais com células do linfonodo drenante, os animais doadores, tanto animais IL-18 KO como animais selvagens GFP⁺, foram infectados nas duas orelhas com 10⁴ formas metacíclicas da *Leishmania amazonensis*. Após quatro semanas de infecção, os linfonodos submandibulares foram coletados e macerados. O homogenato foi, então, centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 4°C. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a quantidade foi acertada para que cada animal recebesse 2 x 10⁵ células em um volume de 100µl. Os animais receptores do tratamento foram infectados em uma orelha com 10⁴ formas metacíclicas da *Leishmania amazonensis*, na segunda semana de infecção, as células T CD4⁺ foram depletadas como explicado anteriormente; porém, o tratamento foi referente apenas ao protocolo da primeira semana. Na terceira semana de infecção, os animais receberam o tratamento com as células dos linfonodos drenantes dos animais doadores. O tratamento foi feito pela via endovenosa pela veia lateral da cauda dos camundongos (Oliveira *et al.*, 2017).

3.12 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

As orelhas dos animais C57BL/6 WT e IL-18 KO 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 µm de espessura em micrótomo de rotação SPENCER (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, ALE). Para análise de imunohistoquímica, visando marcar a *Leishmania* nas lesões, as lâminas ficaram por uma hora na estufa a 57°C para que o excesso de parafina fosse removido antes do ensaio. No primeiro dia do ensaio as lâminas foram passadas em Xilol I, II e III (Labsynth, Diadema, SP, BRA), 20 minutos em cada, para garantir remoção completa da parafina. Em seguida passaram por um processo de desidratação: álcool absoluto (I, II e III) e álcool 90%, 80% e 70%. As lâminas ficaram por cinco minutos em cada solução. Em seguida, foram lavadas por

três vezes em PBS para a retirada do álcool; cada lavagem foi feita em imersão por cinco minutos. Em seguida, foram realizados os três bloqueios da reação. O primeiro deles realizado em imersão, com solução de PBS 10% de peroxidase, por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada em PBS. O segundo bloqueio foi feito com solução de soro albumina 2% (Sigma-Aldrich), por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas, uma vez, em PBS por cinco minutos. Por fim, foi realizado o bloqueio com solução de PBS a 0,2% de soro albumina, 5% de soro normal de cabra, por 30 minutos. Após este bloqueio, as lâminas não foram lavadas, apenas enxugamos o excesso de solução ao redor dos cortes. Em seguida pingamos o soro de coelho previamente infectado com *L. infantum* 1:800. As lâminas foram deixadas em câmara úmida escura por 12 horas a 4°C. No dia seguinte lavamos as lâminas por três vezes em PBS, cinco minutos cada lavagem, para a retirada do anticorpo não ligado. Em seguida pingamos sobre o corte os reagentes do kit DAKO (DAKO North America, Inc, Carpinteria, CA, EUA). Primeiro foi acrescentada a estreptoavidina-HRP, que permaneceu sobre o corte por 30 minutos, seguida de lavagem com PBS por três vezes, e por fim o anticorpo biotilado, incubado por 30 minutos em câmara escura e úmida. Em seguida as lâminas passaram por outro processo de lavagem. Fizemos a revelação com PBS contendo 50 mg de DAB e 0,25% de H₂O₂. Após cinco minutos mergulhamos rapidamente as lâminas em solução de hematoxilina e lavamos em água corrente. Nova lavagem em PBS foi realizada para remoção de excesso de corante. Em seguida, as lâminas foram desidratadas na sequência de álcool: 70, 80, 90%; e três banhos em álcool absoluto; por cinco minutos nos primeiros e 10 minutos em cada. Em seguida, foram passadas em três banhos de xilol, por 10 minutos em cada. Por fim, montamos as lâminas com entelan (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha). A quantificação de células infectadas e do número de parasitos foi feita a partir de, pelo menos, 20 imagens obtidas de três animais por grupo para cada tempo analisado. As imagens foram obtidas com magnitude de 40x através do microscópio Optical Olympus Research (Center Valley, PA, EUA) acoplado a um sistema de captura de imagem digital (MegaCybernetics, Center Valley, PA, EUA). As imagens foram analisadas com o software KS300 (Kontron Elektronik/Carl Zeiss, NY, EUA).

3.13 A 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 PARTE I

4.1.1 Análise do desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*

Para o estudo do papel da IL-18 no desenvolvimento de lesões cutâneas, escolhemos como um dos modelos de estudo a infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6. Esses animais são suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* e apresentam uma lesão cutânea crônica com manutenção da carga parasitária. Gostaríamos, então, de verificarmos se a ausência da IL-18 afetaria o tamanho das lesões nos animais infectados. Para isso, infectamos camundongos selvagens (WT) e IL-18 KO, ambos no fundo C57BL/6, na orelha (via intradérmica) com 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 formas promastigotas metacíclicas da cepa PH8 de *L. amazonensis* e avaliamos o desenvolvimento das lesões por até oito semanas. Nossos dados mostram que o camundongo selvagem apresenta maior lesão já desde o início do curso de infecção, quando as infecções foram feitas utilizando-se as quantidades de parasito de 10^4 (**Figura 3 C**) e de 10^5 (**Figura 3 D**) e a partir da quarta semana de infecção nas infecções feitas utilizando-se as quantidades de 10^2 (**Figura 3 A**) e 10^3 (**Figura 3 B**) parasitos. As lesões nos camundongos selvagens se mantiveram maiores do que as lesões dos camundongos IL-18 KO até a oitava semana em todas as quantidades de parasitos analisadas. Sendo assim, independentemente da quantidade de parasitos utilizadas para a infecção, os animais IL-18 KO apresentaram menor lesão, quando comparadas com as lesões dos animais selvagens.

Em diversos modelos, a IL-18 apresenta um papel importante na manutenção de um ambiente inflamatório e na progressão de doenças (Fantuzzi *et al.*, 1999; Dinarello, 2009). Em estudos utilizando o camundongo MRL/*lpr*, que desenvolve espontaneamente uma doença autoimune que mimetiza o Lúpus eritematoso em humanos, verificou-se altos níveis de IL-18 nos camundongos que desenvolveram nefrite. Camundongos tratados com IL-18, além de aumentarem o dano renal, desenvolveram lesões do tipo asa de borboleta na pele (Esfandiari *et al.*, 2001; Faust *et al.*, 2002). Uma das características do animal MRL/*lpr* é a superexpressão da cadeia β do receptor da IL-18 nos linfócitos (Neumann *et al.*, 2001). Em um modelo de artrite em camundongos DBA/1, a IL-18, em sinergia com a IL-12 ou sozinha, induz aumento das lesões e da inflamação na artrite induzida por colágeno (Leung *et al.*, 2000). Considerando

dados prévios do nosso grupo, a IL-18 parece ter um papel no desenvolvimento das lesões na infecção por *L. amazonensis*, já que os animais WT apresentam lesão aumentada em relação aos IL-18 KO.

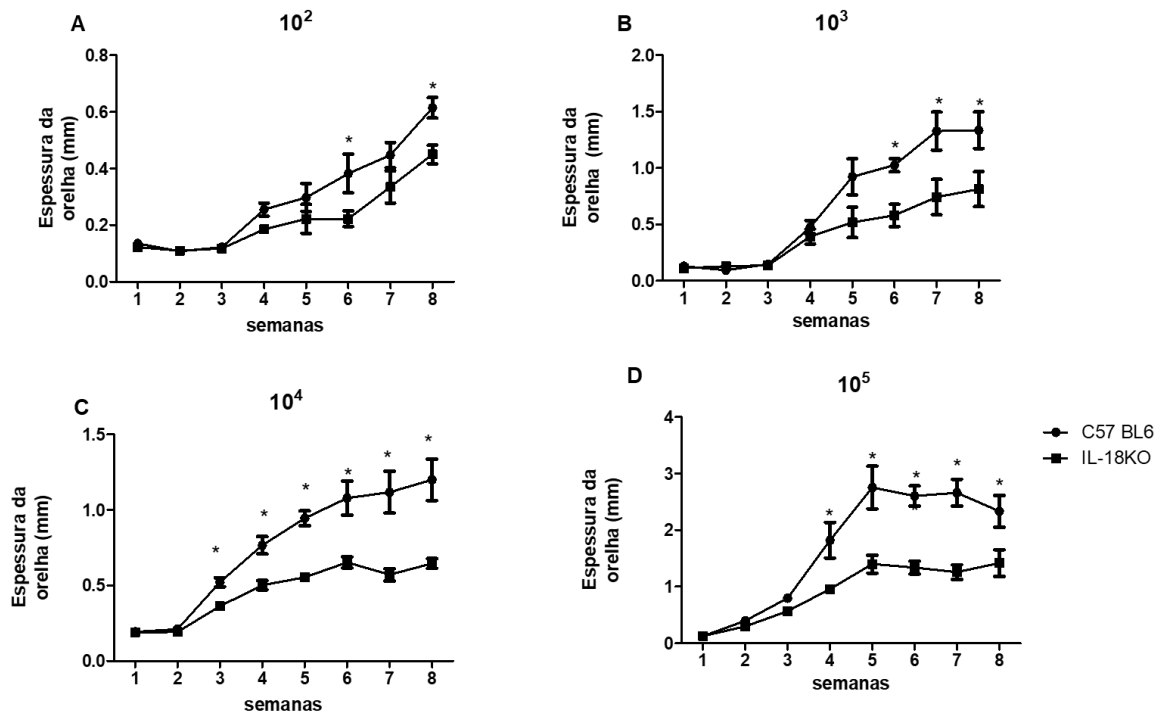


Figura 3. Desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*. Os camundongos foram infectados na orelha com formas promastigotas de *L. amazonensis* e as lesões foram medidas semanalmente até a oitava semana de infecção. Os gráficos representam as medidas da espessura das orelhas dos camundongos C57BL/6 selvagens e IL-18 KO infectados com (A) 1×10^2 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. (B) 1×10^3 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. (C) 1×10^4 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. (D) 1×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos (n=5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística foi feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (*p<0,05).

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

Os camundongos selvagens apresentaram maiores lesões quando comparadas com as lesões nos animais IL-18 KO, independentemente do número de parasitos utilizados para a infecção. Esperávamos, então, que os animais selvagens apresentassem uma maior carga parasitária. Porém, os resultados mostraram que esse fenômeno aconteceu apenas na infecção feita com 10^3 formas promastigotas metacíclicas do parasito, tanto na lesão, como no linfonodo drenante na oitava semana de infecção (**Figura 4 A e B**). Já nas infecções feitas com 10^2 , 10^4 e 10^5 parasitos, a carga parasitária foi a mesma entre as linhagens, tanto na lesão (**Figura 4 A**), quanto no linfonodo drenante (**Figura 4 B**). Notamos, também, uma tendência da carga parasitária dos animais IL-18 KO ser menor do que a quantidade de parasitos do animal selvagem no tempo de doze semanas na infecção com 10^4 (**Figura 4 C e D**). Na infecção com 10^2 parasitos, não foi possível detectar a quantidade de parasitos no linfonodo drenante por diluição limitante.

Experimentos realizados com camundongos KO para caspase-1, MyD88 e IL-1 β infectados com 10^4 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* demonstrou que esses animais apresentaram lesões aumentadas e maior carga de parasitos quando comparados com animais selvagens (Lima-Junior *et al.*, 2013). Como o foco desse trabalho é a análise da influência da IL-18 no desenvolvimento de lesões cutâneas na infecção por *L. amazonensis*, decidimos, então, seguir os próximos experimentos com a quantidade de 10^4 parasitos para as infecções, visto que nessa quantidade de parasitos não encontramos diferenças na carga parasitária (**4 C e D**). Quantidades menores de parasitos como 10^2 e 10^3 aumentam, também, as chances de que a infecção experimental não ocorra, ou que ocorra de maneira diferente nos animais, já que são uma pequena quantidade de parasitos em suspensão no PBS para serem inoculadas. A quantidade de 10^4 é mais segura de ser manipulada e tem a capacidade de gerar uma resposta inflamatória robusta no local do desafio (Seyed *et al.*, 2018), o que pode facilitar o entendimento de como a resposta inflamatória acontece nesse modelo de infecção.

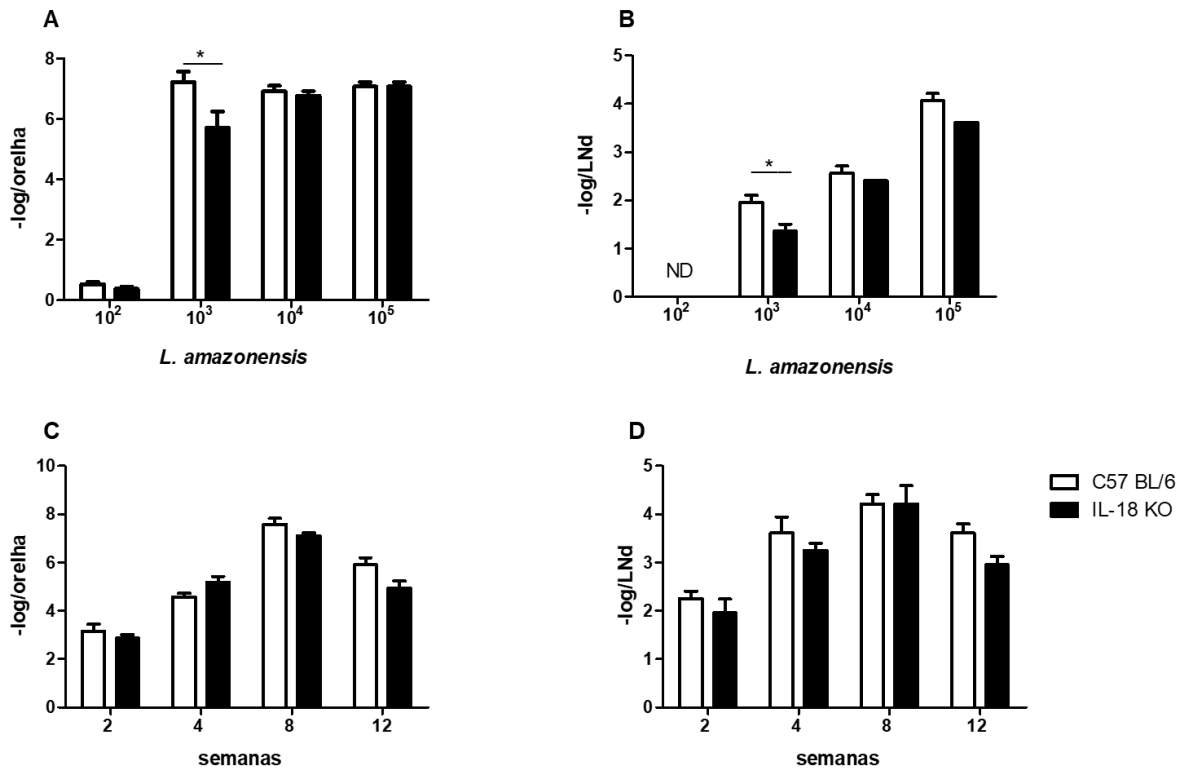


Figura 4. Carga parasitária nas lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *L. amazonensis*. Após oito semanas de infecção, os camundongos foram mortos e as lesões foram removidas para determinação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante. A carga dos parasitos 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) nas 4 quantidades de parasitos. Na quantidade de 10^4 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*, foi feita a quantificação de parasitos por diluição limitante (C) na orelha e (D) nos linfonodos drenantes nos tempos de duas, quatro, oito e doze semanas após a infecção. A ausência de asteriscos indica ausência de diferença significativa entre os grupos. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos (n=5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* $p < 0,01$).

4.1.3 Análise imuno-histoquímica das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*

Além da carga de parasitos por diluição limitante, decidimos determinar a quantidade de amastigotas por campo em cortes histológicos. Os resultados da análise microscópica das lesões dos camundongos infectados por *L. amazonensis* mostraram que na segunda semana de infecção há poucas amastigotas imunomarcadas (marrom) tanto nos animais selvagens (**Figura 5 A**) quanto em animais IL-18 KO (**Figura 5 B**). Já na quarta semana de infecção, houve aumento da quantidade de amastigotas imunomarcadas nas duas linhagens de camundongos (**Figura 1.3 C e D**), assim como na oitava semana de infecção (**Figura 5 E e F**). Ao plotarmos a quantidade de amastigotas por campo, encontramos a mesma quantidade entre os camundongos selvagens e IL-18 KO em todos os tempos analisados, com uma tendência a mais amastigotas por campo nos animais IL-18 KO. Além disso, encontramos um aumento progressivo da quantidade de amastigotas imunomarcadas da segunda até a oitava semana de infecção.

A lesão do animal IL-18 KO é menor do que a lesão do animal selvagem; porém, o animal KO apresenta uma tendência a ter mais amastigotas por campo. Assim, esse dado corrobora os dados da quantidade de parasitos por diluição limitante na lesão, pois uma lesão com menor área e mais amastigotas por campo apresenta a mesma quantidade de parasitos quando comparada com uma lesão com maior área e menos amastigotas por campo.

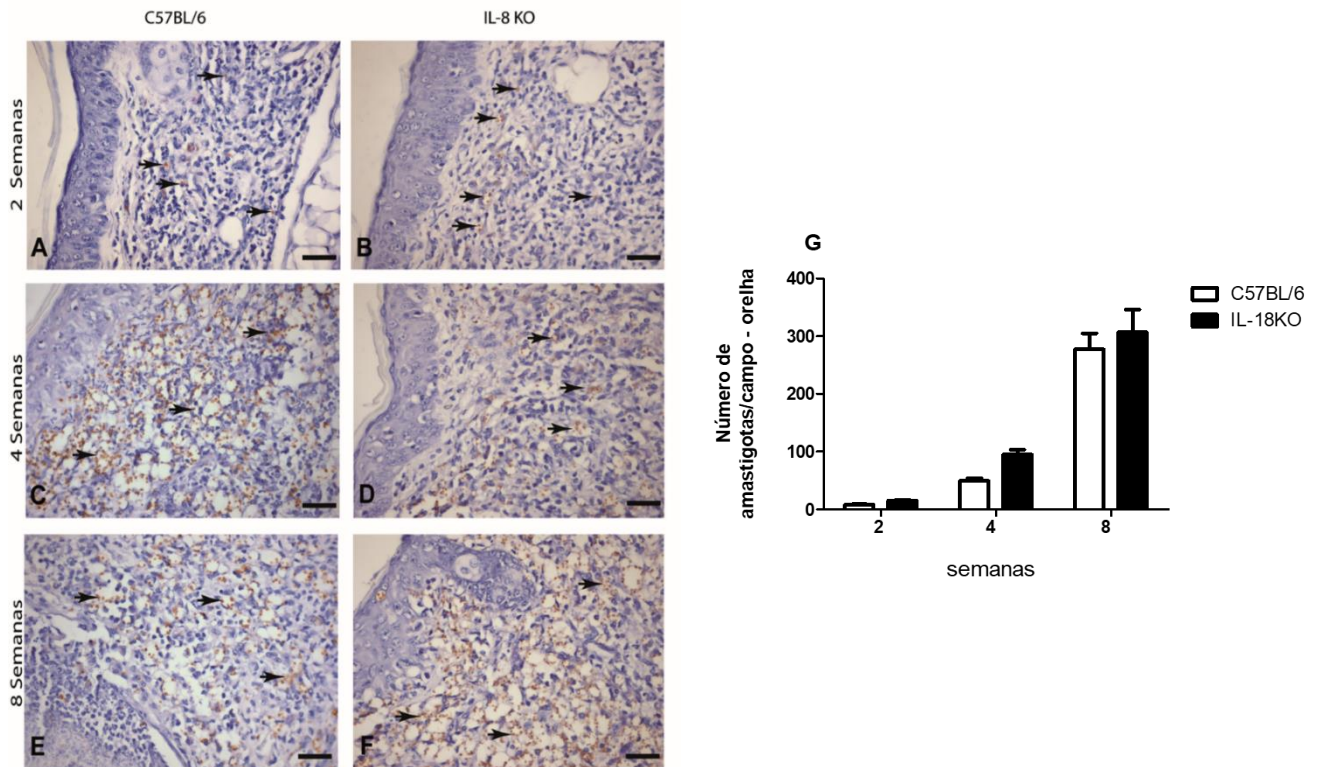


Figura 5. Imuno-histoquímica das lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados pela *L. amazonensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. Figuras A e B representam as lesões dos camundongos com duas semanas de infecção. E (A) orelha de animal selvagem com poucas amastigotas imunomarcadas (marrom) (setas pretas). Em (B) observar as lesões na orelha de IL-18 também com poucas amastigotas imunomarcadas. Já em camundongos com quatro semanas de infecção, observar em (C) WT e (D) IL-18 KO amastigotas imunomarcadas em maior número. Nas lesões de camundongos após oito semanas de infecção, observar em (E) WT e (F) presença intensa de amastigotas imunomarcadas. Barras em A - F representam 16 μm (400 x). Em (G) foi feita a contagem das amastigotas por campo. Os resultados são representativos de dois experimentos (n=5) desenvolvidos independentemente.

4.1.4 Análise da citocina IL-18 nas lesões de camundongos selvagens infectados com *Leishmania amazonensis*

Analisamos a concentração de IL-18 nos camundongos selvagens infectados por *L. amazonensis* após duas, quatro e oito semanas de infecção. Encontramos um aumento significativo dessa citocina ao longo do tempo analisado de infecção, com seu pico de produção na quarta semana de infecção (**Figura 6**). De maneira interessante, o pico da produção de IL-18 ocorre na quarta semana, o que coincide com a exacerbação da diferença entre a lesão do camundongo selvagem e do camundongo IL-18 KO (**Figura 3 C**). Ou seja, temos o aumento da lesão nos animais selvagens juntamente com o aumento dos níveis da IL-18. O aumento de IL-18 está associado a diversas condições patológicas, apresentando níveis aumentados em pacientes com depressão (Zhao *et al.*, 2017), com adenocarcinoma de pâncreas (Usul *et al.*, 2017), com a síndrome de Goujerot-Sjögren (Liuqing *et al.*, 2017), com a fibrose renal após lesão aguda causada por reperfusão isquêmica (Liang *et al.*, 2018), assim como a detecção de seus níveis aumentados é um sinal de miocardite viral e dano renal em crianças (Lipiec *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Ou seja, a IL-18 está associada a diversas condições patológicas, eventualmente com o agravamento dos processos inflamatórios, inclusive em doenças de pele como psoríase, dermatite atópica, dermatite de contato (Ohta *et al.*, 2001; Do *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015).

Fizemos, também, a análise de outras citocinas, como IL-4, IFN- γ , TNF, IL-12 e IL-10 (**APÊNDICE – Figura 3**) e encontramos níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-12 nos animais IL-18 KO, também nos animais IL-18 KO, encontramos maior quantidade de IL-10.

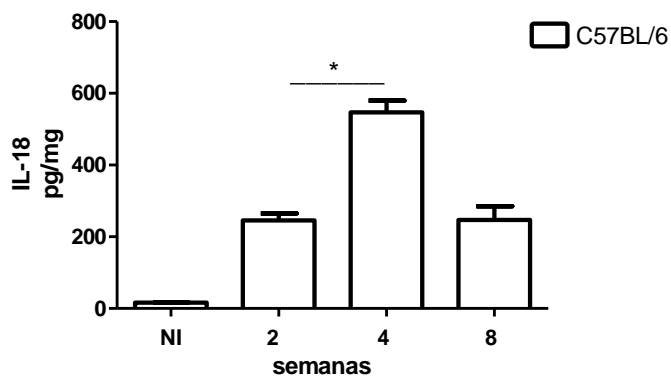


Figura 6. A análise da concentração de IL-18 nas lesões cutâneas dos camundongos infectados por *Leishmania amazonensis*. Camundongos selvagens foram infectados com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis* na orelha direita e nos tempos indicados os camundongos foram mortos e as orelhas foram coletadas, maceradas em solução com inibidores de proteases e os níveis de IL-18 foram determinados por ELISA. Os resultados são representativos de dois experimentos (n=4) desenvolvidos independentemente. NI – Não infectado. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* = $p < 0,01$).

4.1.5 Avaliação da lesão, carga parasitária e produção de TNF, IL-12p70 e IFN- γ nos tempos iniciais da infecção por *Leishmania amazonensis*

Resolvemos analisar o desenvolvimento da lesão nos animais selvagens e KO em tempos mais agudos. Como a IL-18 é conhecida pela indução da produção de IFN- γ (Udagawa *et al.*, 1997) e o IFN- γ apresenta um papel crucial para a replicação da *Leishmania amazonensis* nos tempos iniciais da infecção (Carneiro, M. B. *et al.*, 2015), analisamos o desenvolvimento da lesão dos animais IL-18 KO e dos animais selvagens até o sétimo dia de infecção (**Figura 7 A**). Porém, não encontramos diferenças na espessura das orelhas dos animais. Também não encontramos diferença na quantidade de parasitos na lesão dos animais (**Figura 7 B**) e nem diferenças nos níveis das citocinas TNF (**Figura 7 C**), IL-12p70 (**Figura 7 D**) e INF- γ (**Figura 7 E**) nos tempos analisados. Encontramos níveis aumentados de TNF no animal selvagem no tempo de 24 horas após a infecção, mas os níveis da citocina se igualaram em 24 horas. Ou seja, aparentemente, a IL-18 está influenciando o desenvolvimento da lesão em tempos mais tardios, em torno da quarta semana de infecção, como sugerem nossos dados.

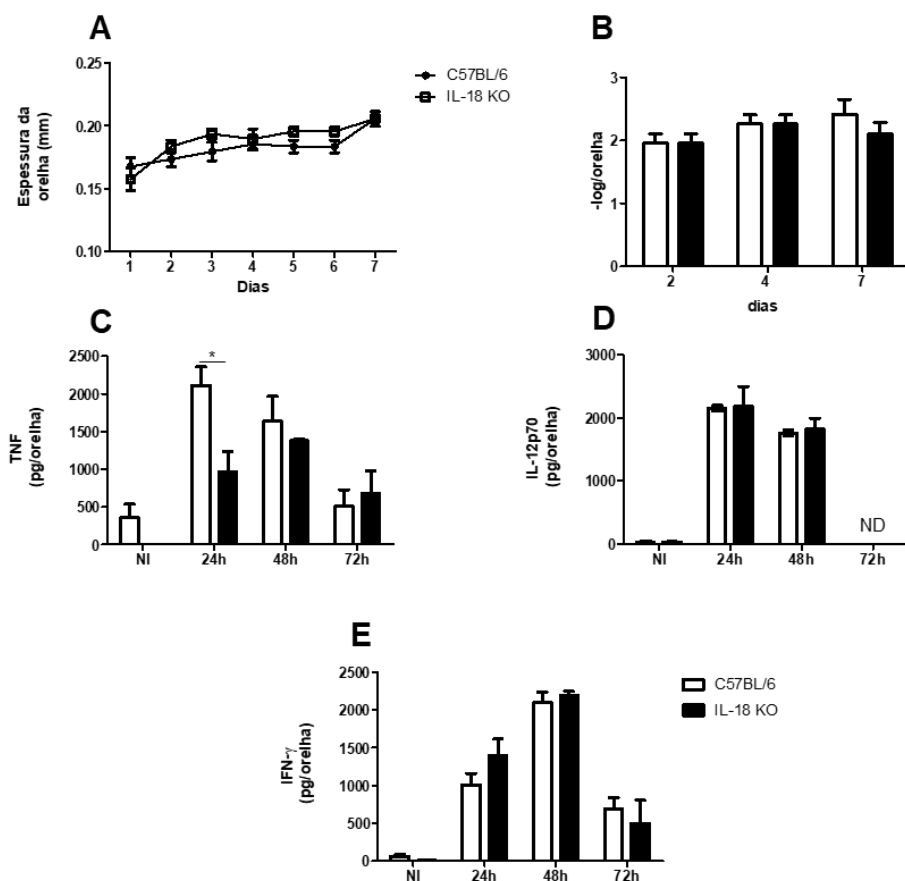


Figura 7. Desenvolvimento da lesão cutânea, carga parasitária e dosagem das citocinas TNF, IL-12p70 e IFN- γ nas lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *L. amazonensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. A espessura da orelha dos animais foi medida diariamente por sete dias após a infecção (A). Após dois, quatro e sete dias de infecção, os camundongos foram mortos e as lesões foram removidas para determinação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante. A carga dos parasitos nos animais infectados (B) na orelha foi determinada individualmente e as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição positiva). Para a dosagem das citocinas as orelhas dos animais infectados foram coletadas, maceradas com inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas e a dosagem das citocinas foram feitas a partir do sobrenadante das amostras. Dosamos os níveis de TNF (C), IL-12p70 (D) e IFN- γ (E). Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos (n=4) desenvolvidos independentemente. NI – Não infectado. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* $p < 0,005$).

4.1.6 A avaliação da presença de células T CD4⁺IL-18R⁺ no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis* e o seu perfil da expressão do receptor de IL-18

Avaliamos a presença de células TCD4⁺ IL-18R⁺ no infiltrado inflamatório das lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO na segunda, quarta e oitava semanas de infecção (**Figura 8 A**). Verificamos, então, que na segunda semana de infecção há uma baixa frequência de células T CD4⁺IL-18R⁺ na orelha dos animais infectados. Já na quarta semana de infecção, mais de 50% das células T CD4⁺ presentes na lesão dos animais são também positivas para o receptor da IL-18. A alta frequência de células T CD4⁺IL-18R⁺ se mantém até a oitava semana de infecção.

A análise da expressão do receptor de IL-18 nos linfócitos T CD4⁺ foi feita pela análise da média de intensidade de fluorescência do anticorpo anti-IL-18R no fluorocromo PE (**Figura 8 B**). Notamos que não há expressão significativa do receptor de IL-18 no tempo de duas semanas após a infecção, expressão que aparece significativamente na quarta semana de infecção e de maneira mais robusta na oitava semana de infecção. Dessa maneira, observamos que a expressão do receptor ocorre de maneira significativa após a quarta semana de infecção, o que coincide mais uma vez com o aumento da diferença entre as lesões dos animais selvagens e IL-18 na quarta semana (**Figura 3 C**) e com o pico de produção de IL-18 (**6**). Já é sabido que as células T CD4⁺ expressam receptor de IL-18 e que a ativação de alguns perfis das células T dependem da ativação pela IL-18 (Oliveira *et al.*, 2017; Pham *et al.*, 2017) e que as células T, CD4⁺ e CD8⁺ agem na manutenção do processo de inflamação na infecção por *Leishmania* em humanos, contribuindo para a manutenção da lesão (Da Silva e Brodskyn, 2014).

Segundo dados anteriores do nosso grupo, ao analisarmos o perfil de outras células do infiltrado inflamatório das lesões dos animais selvagens e IL-18 KO infectados por *L. amazonensis*. Ao analisarmos o número absoluto, encontramos quantidades similares, entre as linhagens, em todos os tempos analisados, de células F4/80⁺CD11c⁻ que chamamos de macrófagos e células T CD8⁺. Entretanto, há uma maior quantidade de células Ly6G⁻Ly6C^{Hi/int}, que chamamos de monócitos inflamatórios, maior quantidade de células MHCII⁺CD11c⁺, que chamamos de células dendríticas, maior quantidade de células Ly6G⁺Ly6C^{int}, que chamamos de neutrófilos e maior quantidade de células NK1.1⁺CD3⁻, que chamamos de células NK, nos animais selvagens quando comparados com os animais IL-18 KO (**Dados não mostrados**). Além disso, analisamos a expressão do receptor de IL-18 em todos os tipos celulares supracitados. Descrevemos, por exemplo, que os macrófagos murinos não expressam IL-18R

(Sousa *et al.*, 2015). Com relação aos padrões de expressão, o único dado significativo foi da expressão do receptor da IL-18 nas células T CD4⁺.

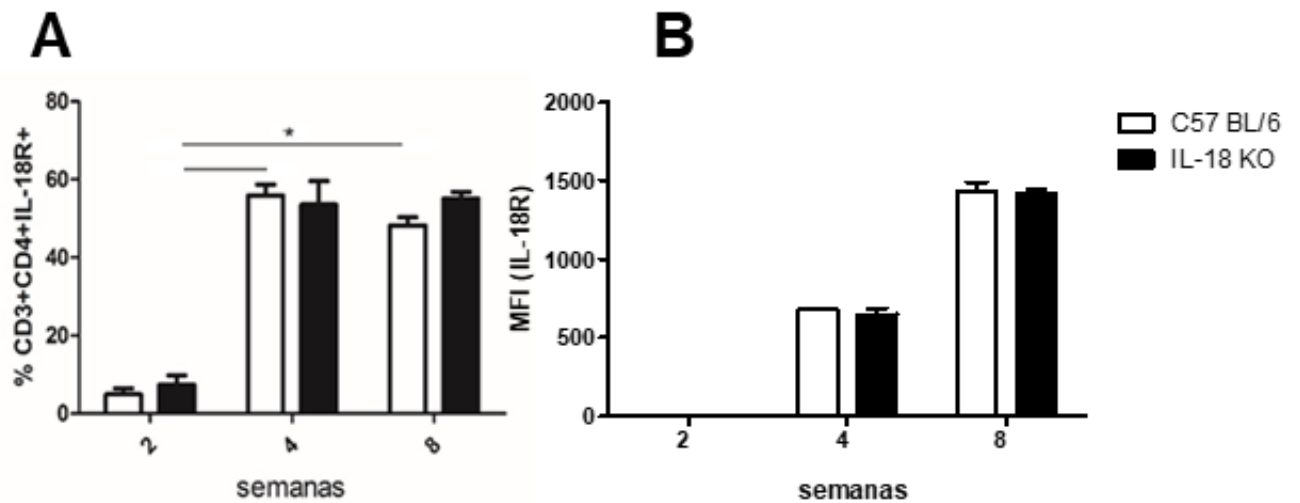


Figura 8. A expressão do receptor de IL-18 nas células T CD4⁺ presentes no infiltrado inflamatório das lesões cutâneas dos camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^4 *L. amazonensis* na orelha. Após duas, quatro e oito semanas de infecção os animais foram mortos e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. **(A)** Porcentagem das células CD4⁺ IL18R⁺ (CD3⁺). **(B)** Média da intensidade de fluorescência do anticorpo anti-IL-18R nas células T CD4⁺. Os resultados são representativos de dois experimentos (n=4 a 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *Two-Way* Anova seguido de Bonferroni (* p<0,001).

4.1.7 A avaliação do efeito da depleção de linfócitos T CD4⁺ em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados com *Leishmania amazonensis*

As células T CD4⁺ apresentam uma grande quantidade de receptores de IL-18 (**Figura 8 A e B**) justamente no tempo em que ocorre o pico de produção desta citocina na lesão (**6**) e no momento em que há exacerbação da lesão dos camundongos selvagens infectados por *L. amazonensis* (**Figura 3 C**), devido a isso, decidimos depletar as células T CD4⁺. O tratamento com o anticorpo anti-CD4 clone GK1.5, amplamente utilizado em modelos de depleção de células T CD4⁺ (Ghosh *et al.*, 2016; Ravichandran *et al.*, 2016), foi feito no início da terceira semana de infecção. Primeiramente, encontramos menores lesões nos animais selvagens tratados com anti-CD4 quando comparadas com as lesões dos camundongos selvagens tratados com IgG de rato, desde a quarta até a oitava semanas de infecção (**Figura 9 A**). Já os animais IL-18 KO tratados com anti-CD4 apresentaram uma discreta diminuição da lesão apenas durante o tratamento, ou seja, entre as terceira e sexta semanas de infecção (**Figura 9 B**). Ou seja, provavelmente a diferença da lesão no início do tratamento com anti-CD4, tanto nos animais selvagens como nos animais IL-18 com as lesões dos animais tratados com IgG, foi em decorrência da diminuição do número total de células na lesão. Já nos animais selvagens tratados com anti-CD4⁺, a lesão se manteve menor que a do animal selvagem tratado com IgG de rato até a oitava semana de infecção. Ao analisarmos a carga parasitária, não encontramos diferenças no número de parasitos entre as linhagens de animais, nem entre os grupos tratados com anti-CD4 ou IgG de rato tanto na lesão (**Figura 9 D**), nem no linfonodo drenante (**Figura 9 E**). De maneira interessante, o animal selvagem tratado com anti-CD4 apresentou um perfil de lesão muito parecido com o animal IL-18 KO tratado com IgG de rato (**Figura 9 C**), quando comparado com o selvagem tratado com IgG. Ou seja, ao depletarmos do animal selvagem um tipo celular que possui alta expressão de IL-18R (**Figura 8 B**) que acompanha a cinética de produção da citocina IL-18 (**Figura 6**), nós aproximamos o seu perfil de lesão ao do animal IL-18 KO. Dados do nosso grupo de pesquisa já haviam demonstrado que a depleção de células T CD8 não altera o perfil de desenvolvimento das lesões de camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* (dados não publicados).

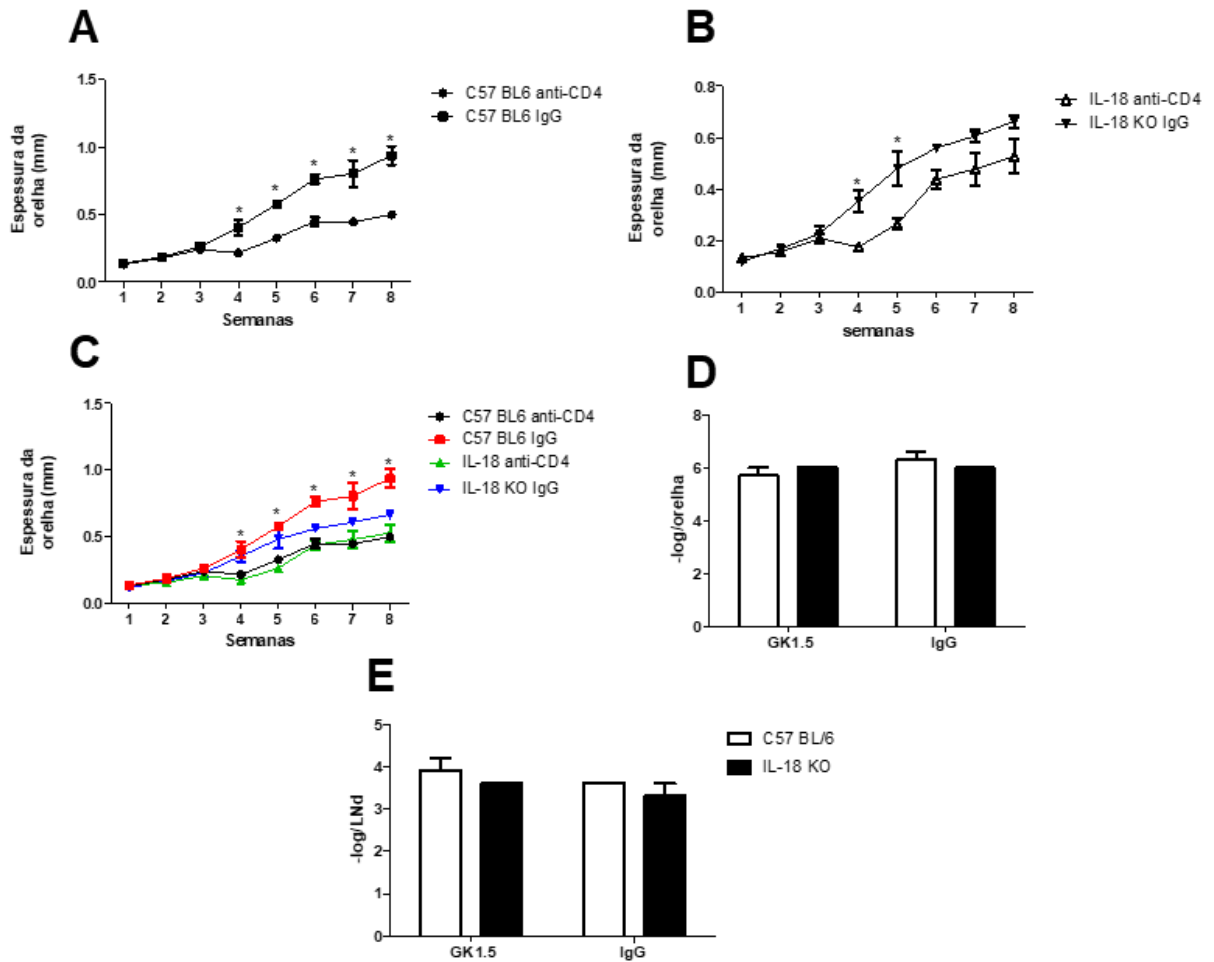


Figura 9. Curso de infecção e a carga parasitária em camundongos selvagens e IL-18 KO infectados por *L. amazonensis* e tratados com GK1.5 (anti-CD4). Camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. (A) e (B), respectivamente, representam as medidas das lesões nos camundongos tratados com IgG de rato (quadrado e triângulo invertido) e anti-CD4/GK1.5 (círculo e triângulo aberto) (C). O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente até 8 semanas após a infecção. A quantificação de parasitos foi realizada por diluição limitante do macerado da orelha dos camundongos infectados (D) e dos linfonodos drenantes (E). Os camundongos foram tratados via i.p com 1mg/ml de IgG de rato ou anti-CD4 (clone GK1.5) semanalmente a partir da terceira semana de infecção Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,01$).

4.1.8 Estratégia de *gate* para a seleção das células T CD4⁺ quanto ao perfil de ativação nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*

Posto que a depleção das células T CD4⁺ durante a infecção por *L. amazonensis* alterou o padrão da lesão dos animais selvagens e IL-18 KO, decidimos, então, esclarecer o ambiente de ativação das células T CD4⁺ na lesão e linfonodos drenantes desses animais. Avaliamos a presença dos fatores de transcrição T-bet, Gata3, Ror γ T e FoxP3; associados aos perfis de ativação Th1, Th2, Th17 e T reg, respectivamente (Lu *et al.*, 2011). Efetuamos a marcação das amostras, como previamente descrito, e, a partir daí, fizemos a seleção dos *gates* nas amostras de controle de isotipo dos marcadores intracelulares. Primeiramente, fizemos a separação dos *singlets*, ou seja, dos eventos associados à passagem de apenas uma célula pelo leitor do citômetro, feito para o perfil de amostras da orelha (**Figura 10 A**) e do linfonodo drenante (**Figura 10 B**). Após esse passo, efetuamos a seleção da população TCR β ⁺CD4⁺ (**10 C**). Dentro dessa população fizemos uma série de outras separações, tais como: *gates* de células CD4⁺IL-18R⁺ (**Figura 10 D**), quadrante de células CD4⁺T-bet⁺ (**Figura 10 E**), quadrante de células CD4⁺Gata3⁺ (**Figura 10 F**), quadrante de células CD4⁺Ror γ T⁺ (**Figura 10 G**) e quadrante de células CD4⁺FoxP3⁺ (**Figura 10 H**). Além disso, verificamos, também, dentro do *gate* de células CD4⁺IL-18R⁺, a seleção dos quadrantes: T-bet⁺IL-18R⁺ (**Figura 10 I**), Gata3⁺IL-18R⁺ (**Figura 10 J**), Ror γ T⁺IL-18R⁺ (**Figura 10 K**) e FoxP3⁺IL-18R⁺ (**Figura 10 L**). Após a determinação das populações, os *gates* e quadrantes foram conferidos em todas as amostras a fim de verificarmos se havia alguma população mal selecionada.

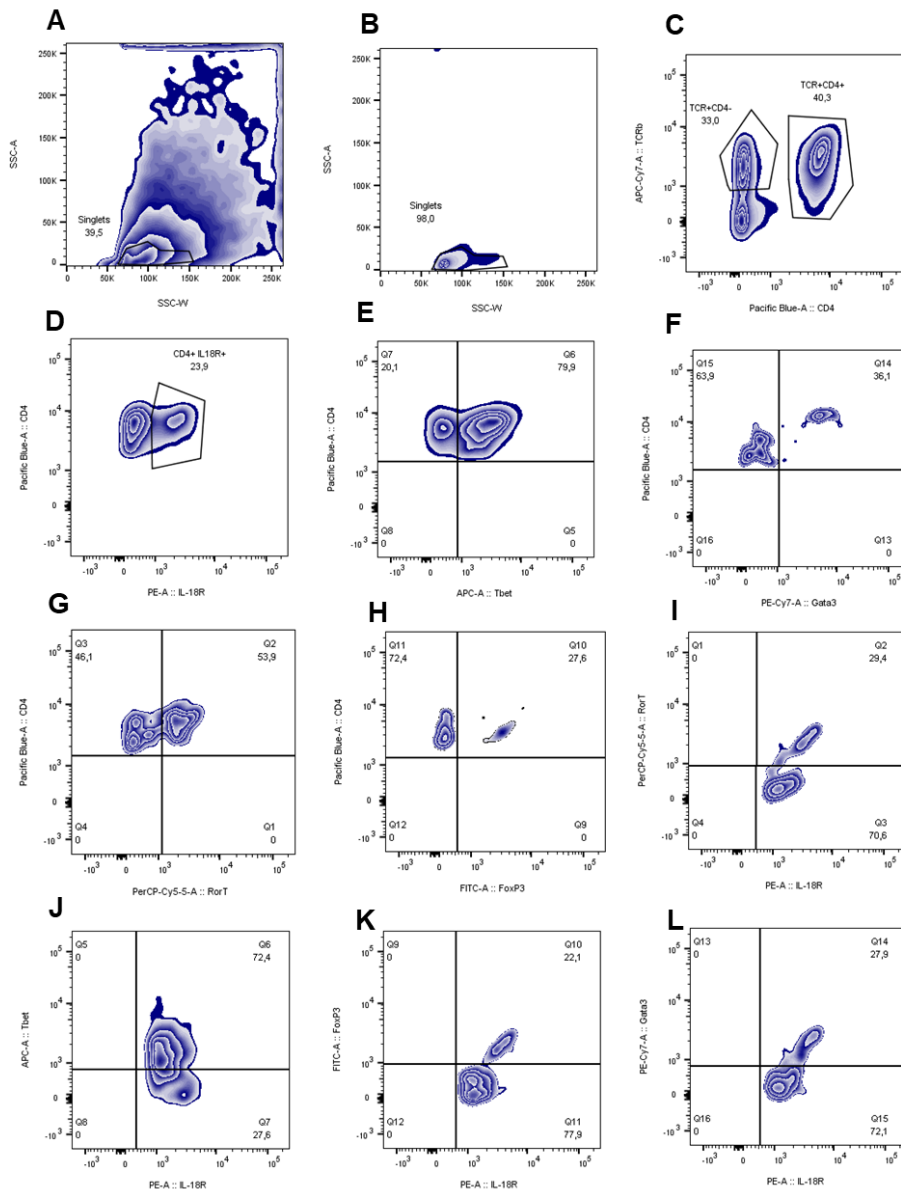


Figura 10. Estratégia de *gating* para seleção do perfil de ativação das células T CD4⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. A orelha e o linfonodo drenante foram coletados e fez-se um pool das amostras, recebendo o mix de anticorpos com os mesmos fluorocromos dos anticorpos utilizados para as marcações intracelulares e extracelulares. Os controles de isotipo foram lidos e os *gates* foram selecionados. Selecionamos os *singlets* no perfil de amostras da orelha (A) e do linfonodo drenante (B). Efetuamos a seleção da população TCR β^+ CD4⁺ (C) e, dentro dessa população, selecionamos: *gates* de células CD4⁺IL-18R⁺ (D), quadrante de células CD4⁺Tbet⁺ (E), quadrante de células CD4⁺Gata3⁺ (F), quadrante de células CD4⁺RoryT⁺ (G) e quadrante de células CD4⁺FoxP3⁺ (H). Verificamos dentro do *gate* de células CD4⁺IL-18R⁺ a seleção dos quadrantes: Tbet⁺IL-18R⁺ (I), Gata3⁺IL-18R⁺ (J), RoryT⁺IL-18R⁺ (K) e FoxP3⁺IL-18R⁺ (L). Os *gates* e quadrantes foram aplicados para todas as amostras. Para o pool dos controles de isotipo, foram utilizados 25 μ l de 4 amostras de linfonodo drenante e 4 amostras de orelha, tanto de camundongos selvagens quanto IL-18 KO.

4.1.9 Análise da cinética das células T CD4⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5

Como visto anteriormente, a depleção das células T CD4⁺ altera o perfil da lesão dos animais (**Figura 9 C**). Uma das questões levantadas por este experimento foi se o perfil de ativação das células T na lesão e no linfonodo drenante era diferente entre os animais selvagens e IL-18 KO; além disso, nos perguntamos se o perfil dessas células era alterado pela depleção na terceira semana de infecção e se o perfil das células T CD4⁺ que retornavam após o tratamento eram diferentes entre os animais selvagens e IL-18 KO. Ou seja, será que retirar as células T CD4⁺ do animal WT antes do pico de produção da IL-18 e do aumento da expressão do receptor alteraria o perfil das células T na lesão e no linfonodo drenante? Para isso, fizemos, primeiramente, a análise do número absoluto das células T CD4⁺ nos animais tratados com IgG de rato nos tempos concordantes com os tempos do tratamento com o anticorpo anti-CD4, ou seja, no início da terceira semana de infecção, no início da quarta semana de infecção e no início da sétima semana de infecção. Ao analisarmos os gráficos, notamos que os animais selvagens apresentam uma tendência a um maior número e frequência de células T CD4⁺ na orelha em comparação com os camundongos IL-18 KO nos grupos tratados com IgG (**Figura 11 A e B**). Além disso, nota-se que há um maior número de células T CD4⁺ nos animais selvagens tratados com Gk1.5 do que nos animais selvagens tratados com IgG na sétima semana de infecção (**Figura 11 A**). A diferença da quantidade de células entre os animais vai aumentando gradativamente, porém, no geral, vemos um decréscimo do número total de células T CD4⁺ nos dois grupos de animais (**Figura 11 A**). Já no linfonodo drenante encontramos uma tendência a haver mais células T CD4⁺ nos animais IL-18 KO quando comparados com os animais selvagens (**Figura 11 C**); porém, as frequências são as mesmas, exceto sete semanas após a infecção, onde há maior frequência de células T CD4⁺ nos animais IL-18 KO (**Figura 11 D**). Diferentemente da orelha, no linfonodo drenante em ambos os grupos de animais verificou-se uma maior quantidade de células na quarta semana de infecção, ou seja, no período referido no gráfico como “durante” (**Figura 11 C**).

Nos grupos tratados com anti-CD4, verificamos a depleção das células T CD4⁺ durante o tratamento e verificamos o retorno dessas células na sétima semana de infecção, tanto na orelha quanto no linfonodo drenante em ambos os grupos de animais (**Figura 11 A e C**). Após o tratamento verificamos que o perfil da quantidade de células não se alterou significativamente; porém, aumentou-se o número de células T CD4⁺ na lesão quando comparada com os animais tratados com IgG. Já com relação à frequência perdeu-se a diferença

da frequência de células T CD4⁺ entre os animais selvagens e IL-18 KO no linfonodo e na orelha na sétima semana de infecção (**Figura 11 B e D**). Ou seja, a retirada das células T CD4⁺ na terceira semana de infecção parece alterar o balanço da quantidade e frequência dessas células durante o desenvolvimento das lesões, visto que as células T CD4⁺ têm papel crucial na patogênese na infecção por *L. amazonensis* (Soong *et al.*, 1997).

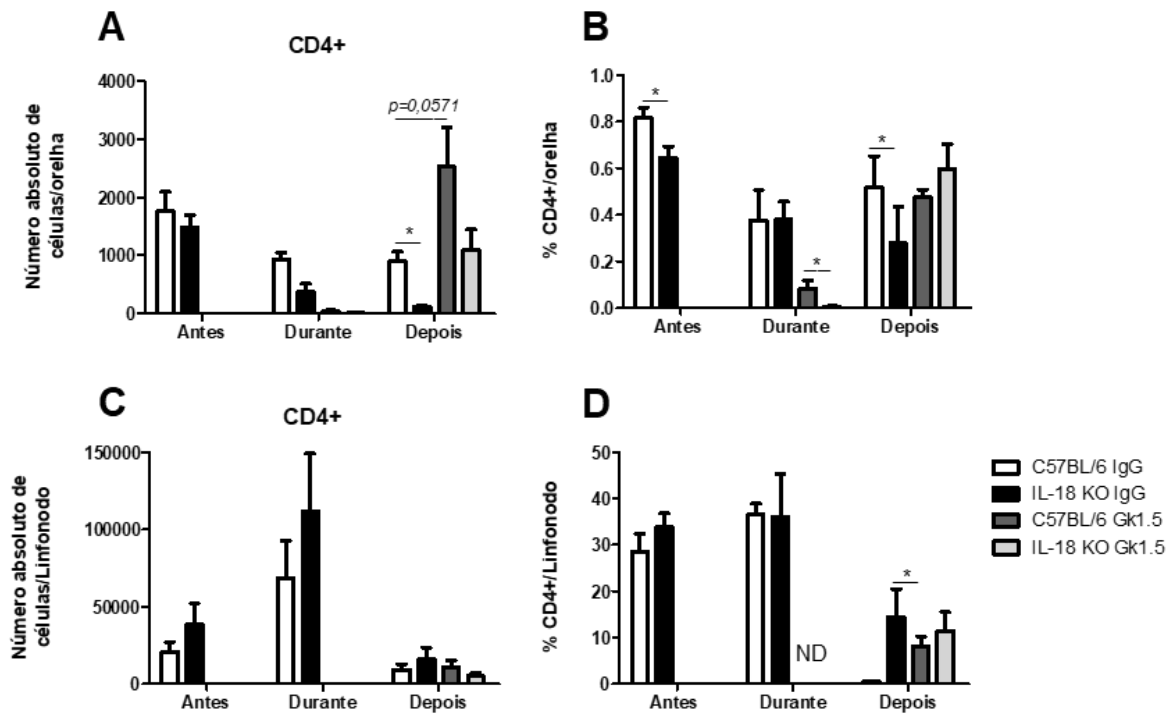


Figura 11. Cinética das células T CD4⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* tratados com IgG ou Gk1.5. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. A orelha e o linfonodo drenante foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Verifica-se, então, o número absoluto das células TCR β^+ CD4⁺ e a frequência dessas células na orelha (**A e B**), assim como no linfonodo drenante (**C e D**) nos animais tratados com IgG e Gk1.5. Todos nos tempos de três, quatro e sete semanas após a infecção. Este é o resultado representativo de dois experimentos (n= 4 a 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.1.10 Análise da cinética das células T CD4⁺IL-18R⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* e tratados com IgG ou Gk 1.5

Já foi descrita a presença do receptor da IL-18 nas células T CD4⁺, que pode ser induzido nessas células pela citocina IL-12 (Yoshimoto *et al.*, 1998); além disso, a presença do receptor da IL-18 ativado via MyD88 nos linfócitos parece ser crucial para a formação de uma população de células Th1 em resposta ao *Trypanosoma cruzi* (Oliveira *et al.*, 2017). Decidimos, então, verificar a presença do receptor da IL-18 nas células T CD4⁺ nos animais tratados com a IgG de rato três, quatro e sete semanas após a infecção. Além dos animais tratados com a IgG, verificamos, também, a presença do receptor nas células T CD4⁺ nos animais tratados com Gk1.5, a fim de verificarmos se houve alterações do padrão da frequência, expressão e número dessas células CD4⁺IL-18R⁺.

Verificamos que, já na terceira semana de infecção, encontramos u células CD4⁺IL-18R⁺ na orelha dos animais tratados com IgG (**Figura 12 A**), que se mantem até a sétima semana de infecção. Além disso, há mais células T CD4⁺IL-18R⁺ nos animais selvagens tratados com Gk1.5 do que nos animais selvagens tratados com IgG na sétima semana de infecção; porém, essa quantidade maior de células aparece em um ambiente com, provavelmente, menos IL-18 disponível do que na quarta semana de infecção (**Figura 6**), na qual foi feita a depleção. Entretanto, na terceira semana de infecção, há uma baixa frequência de células T CD4⁺ IL-18R⁺, tanto na orelha como no linfonodo drenante dos animais tratados com IgG (**Figura 12 B e D**), além de uma quantidade pequena de células nesse perfil nos linfonodos na terceira e sétima semana de infecção. Mas, no caso da sétima semana, há mais células do que na orelha no mesmo tempo de infecção (**Figura 12 C**). Já nos animais depletados, notamos que, após a retirada do anticorpo do sistema, as células T CD4⁺IL-18R⁺ estão em maior quantidade e maior frequência na orelha quando comparado com o mesmo período nos animais tratados com IgG (**Figura 12 A e B**). Nos linfonodos, não houve alteração significativa do perfil (**Figura 12 C e D**).

Analisamos a expressão do receptor da IL-18 nas células T CD4⁺ nos animais tratados com IgG e notamos uma maior expressão do receptor nas células T CD4⁺ do linfonodo quando comparadas com a orelha em todos os tempos analisados (**Figura 12 E e F**). Já nos animais tratados com Gk1.5, percebemos que as poucas células CD4⁺ que restaram na orelha e no linfonodo apresentavam uma alta expressão do receptor, expressão que se manteve alta após o tratamento nas células que retornaram para a lesão após a saída do anticorpo do sistema (**Figura**

12 E e F). Aparentemente, o aumento da frequência de células T CD4⁺IL-18R⁺ dá-se somente após a quarta semana de infecção, corroborando nossos dados anteriores (**Figura 8 A**) e que a depleção dessas células gerou uma onda de linfócitos T CD4⁺ com alta expressão do receptor da IL-18.

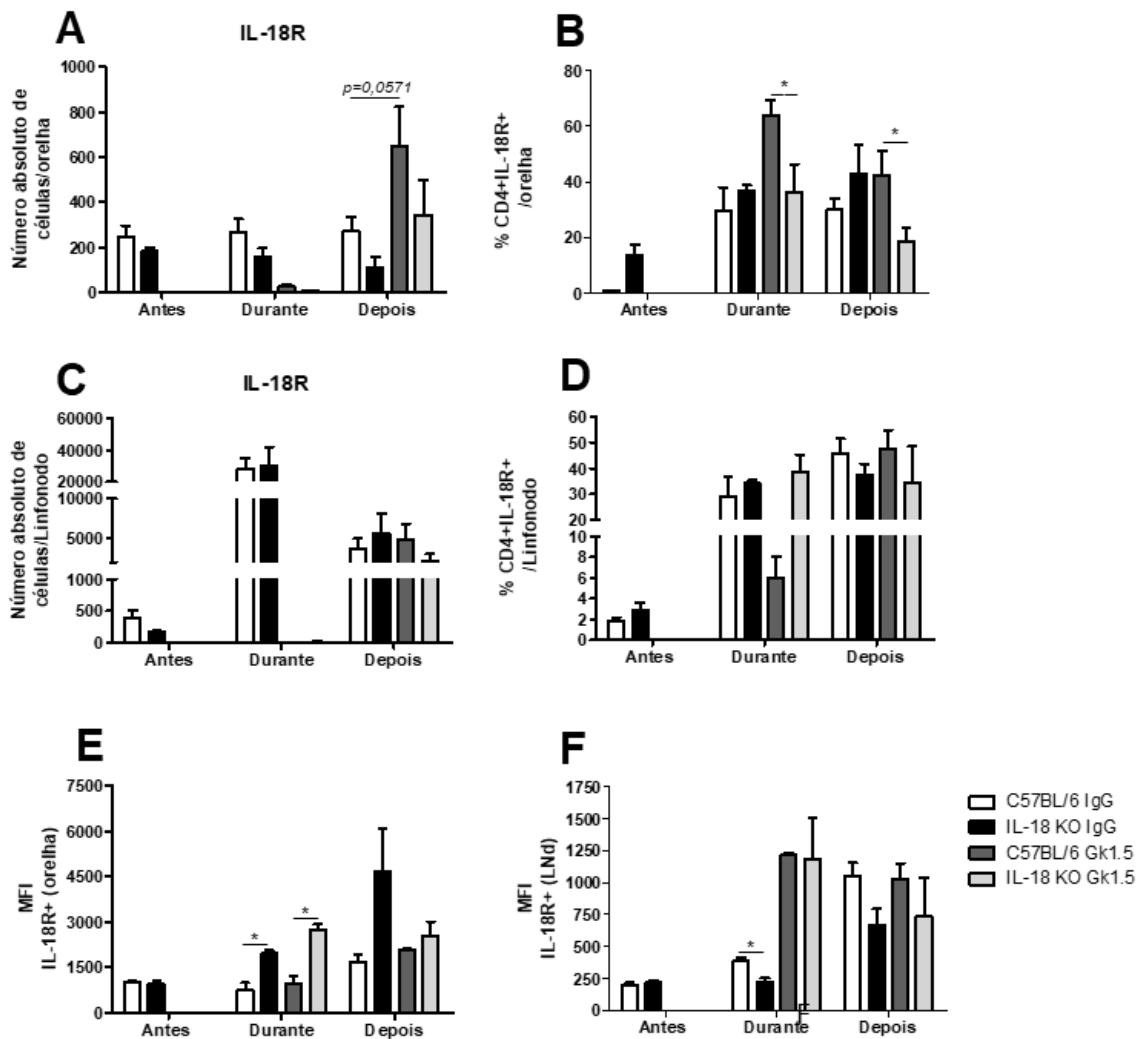


Figura 12. Cinética células T CD4⁺IL-18R⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk1.5. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. A orelha e o linfonodo drenante foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Verifica-se, então, o número absoluto das células TCR β ⁺CD4⁺IL-18R⁺ e a frequência dessas células na orelha (**A e B**), assim como no linfonodo drenante (**C e D**) nos animais tratados com IgG e Gk1.5. Para a avaliação da expressão do receptor da IL-18R, aplicou-se a fórmula de cálculo da média de intensidade de fluorescência (MFI) do anticorpo anti-IL-18R PE no painel do FlowJo 10. Assim, mostramos os dados de MFI na orelha nos animais tratados com IgG e com Gk1.5 (**E**). E nos linfonodos dos animais tratados com IgG e com Gk1.5 (**F**). Todos nos tempos de três, quatro e sete semanas após a infecção. Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.1.11 Análise da cinética das células T CD4⁺T-bet⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5

O fator de transcrição T-bet está bem descrito como sendo associado à diferenciação de células T *naïve* para um perfil efetor do tipo Th1, assim como associado à diferenciação e ativação de células T CD8⁺, células B (Kallies e Good-Jacobson, 2017). Analisamos, então, a cinética da quantidade e frequência de células T CD4⁺T-bet⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO tratados com IgG ou Gk1.5 durante a infecção por *L. amazonensis*. Nota-se que há mais células T-bet⁺ nas orelhas dos animais WT na terceira e sétima semana de infecção nos animais tratados com IgG. Além disso, encontra-se uma maior frequência de células T CD4⁺T-bet⁺ nas orelhas dos animais IL-18 KO tratados com IgG na quarta semana de infecção, mas mesma quantidade com relação aos animais selvagens no mesmo período (**Figura 13 A e B**). Já nos linfonodos drenantes, há uma maior quantidade e frequência de células T CD4⁺T-bet⁺ nos animais selvagens na quarta semana de infecção (**Figura 13 C e D**). Nos animais WT tratados com Gk1.5, não houve mudança no perfil de células T CD4⁺T-bet⁺; porém, nos animais IL-18 KO, houve um aumento significativo dessa população de células na orelha após o tratamento (**Figura 13 A e B**). Esse achado talvez explique o porquê de as lesões desses animais terem aumentado e se igualado às lesões dos animais tratados com IgG após o tratamento com Gk1.5 (**Figura 9 B**). Com relação à presença do receptor da IL-18 nessas células, notou-se que há uma quantidade relativamente baixa de células IL-18R⁺ nas terceira e quarta semanas de infecção no sítio inflamatório; porém, há um aumento considerável da frequência dessas células na sétima semana de infecção em todos os grupos analisados (**Figura 13 E**), sendo que esse aumento da frequência de células T CD4⁺T-bet⁺IL-18R⁺ acontece mais precocemente no linfonodo, já na quarta semana de infecção (**Figura 13 F**). Ou seja, aparentemente, nos tempos iniciais, não há uma grande quantidade de células T CD⁺ associadas a um perfil Th1 que expressam receptores para a IL-18. Essas células estão lá, mas em maior frequência em tempos mais tardios da infecção.

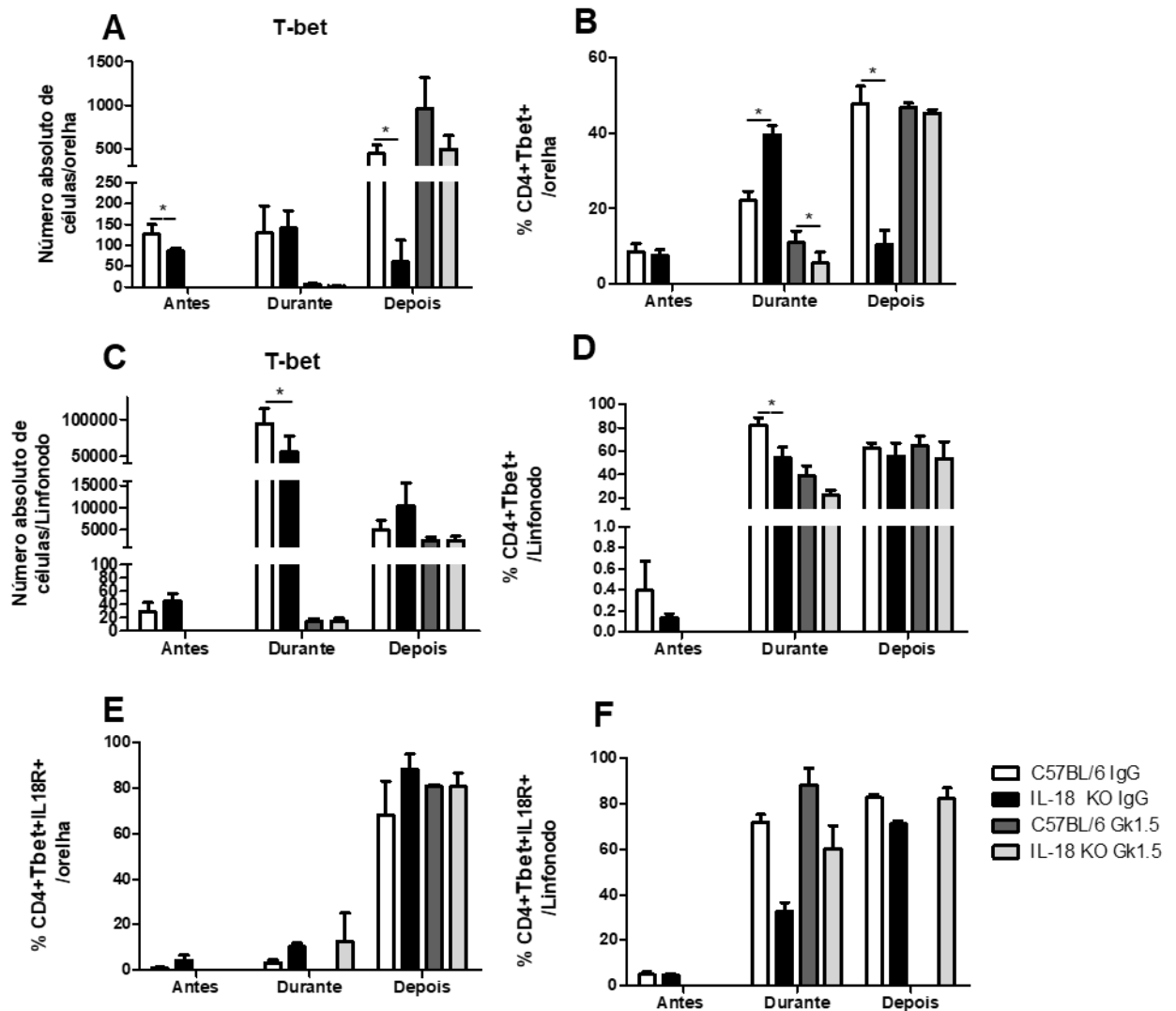


Figura 13. Cinética células T CD4⁺Tbet⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk1.5. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. A orelha e o linfonodo drenante foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Verifica-se, então, o número absoluto das células TCR β^+ CD4⁺Tbet⁺ e a frequência dessas células na orelha (A e B), assim como no linfonodo drenante (C e D) nos animais tratados com IgG e Gk1.5. Há, também, a frequência de células T CD4⁺Tbet⁺IL-18R⁺ na orelha (E) e no linfonodo drenante (F) dos animais. Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=4 a 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.1.12 Análise da cinética das células T CD4⁺Gata3⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5

Outro fator de transcrição importante para o desenvolvimento das células T efectoras é o Gata3. O Gata3 está comumente associado ao desenvolvimento de um perfil de células T do tipo Th2 (Nakayama *et al.*, 2017). Em nossos experimentos, há uma pequena quantidade e frequência de células T CD4⁺Gata3⁺ na orelha dos animais tratados com IgG; porém, há um aumento da quantidade dessa população de células na orelha dos animais selvagens tratados com Gk1.3 sete semanas após a infecção. Além disso, no grupo tratado com IgG, encontra-se mais células T CD4⁺Gata3⁺ nos animais WT, mas mesma frequência (**Figura 14 A e B**). Na análise dessa população celular nos linfonodos drenantes, percebe-se uma grande quantidade de células T CD4⁺Gata3⁺, apesar de menor frequência, na quarta semana de infecção nos animais selvagens tratados com IgG em relação aos animais IL-18 KO (**Figura 14 C e D**), células essas que apresentam receptores da IL-18 (**Figura 14 F**). Na orelha, há uma frequência maior de células T CD4⁺Gata3⁺ nos animais selvagens tratados com IgG em relação aos animais IL-18 KO na sétima semana de infecção (**Figura 14 E**); porém, não foram encontradas diferenças significativas da frequência dessas células entre os outros grupos. Com isso, fica claro que há uma quantidade maior de células associadas a um perfil Th2 e IL-18R⁺ na lesão dos animais WT na quarta semana de infecção, diferença que se mantém na sétima semana de infecção. Talvez a maior lesão desses animais na quarta semana de infecção esteja associada a essa diferença da quantidade dessas células no sítio inflamatório.

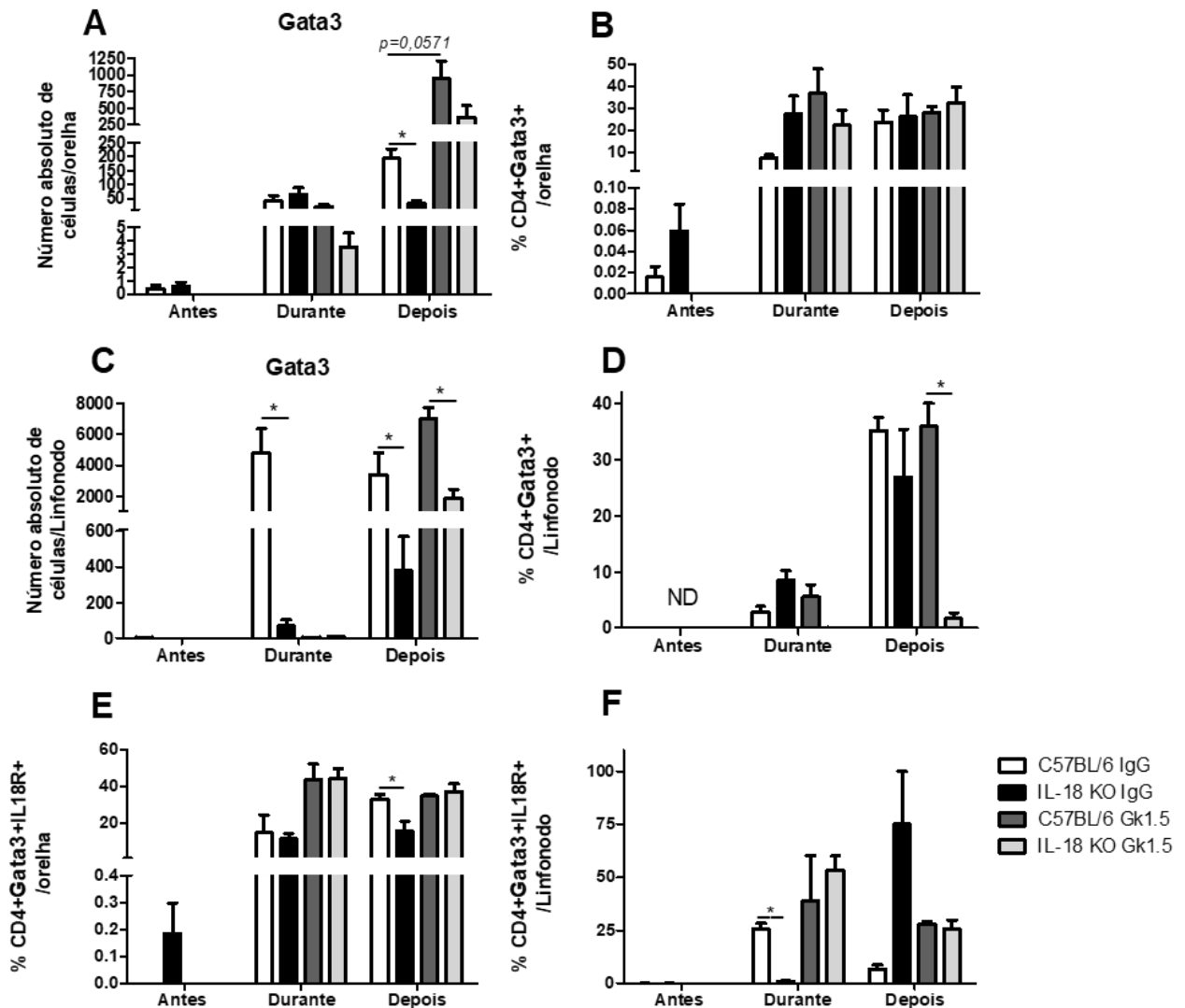


Figura 14. Cinética células T CD4⁺Gata3⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. A orelha e o linfonodo drenante foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Verifica-se, então, o número absoluto das células TCR β^+ CD4⁺Gata3⁺ e a frequência dessas células na orelha (**A e B**), assim como no linfonodo drenante (**C e D**) nos animais tratados com IgG e Gk1.5. Há, também, a frequência de células T CD4⁺Gata3⁺IL-18R⁺ na orelha (**E**) e no linfonodo drenante (**F**) dos animais. Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=4 a 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.1.13 Análise da cinética das células T CD4⁺roryt⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5

Uma outra população importante de células T CD4⁺ efetoras são as células do perfil Th17. Essas células expressam o fator de transcrição RoryT e produzem as citocinas da família da IL-17, importantes nos processos inflamatórios da pele (Tang *et al.*, 2018). Em nosso modelo de estudo, verificamos que há uma grande quantidade de células T CD4⁺ RoryT⁺ na orelha dos animais primordialmente na terceira semana de infecção. Nas quarta e sétima semanas de infecção, há um decréscimo da quantidade dessas células, sendo que na sétima semana de infecção há mais células do perfil Th17 no camundongo WT. Após o tratamento com anti-CD4, nota-se uma queda de células RoryT⁺ (**Figura 15 A**), assim como um aumento da frequência dessas células (**Figura 15 B**), ou seja, a depleção influenciou a mudança da cinética desse tipo celular no curso da infecção. Já nos linfonodos drenantes, há uma maior quantidade de células RoryT⁺ nos animais selvagens nas terceira e quarta semanas de infecção (**Figura 15 C**), mas a frequência dessa população, em geral, é bem baixa (**Figura 15 D**). Das populações analisadas, as células T CD4⁺ RoryT⁺ apresentam uma alta frequência de células IL-18R⁺, tanto na orelha quanto no linfonodo drenante, chegando a ter 100% das células expressando o receptor para a IL-18 (**Figura 15 E e F**). Dessa maneira, nota-se que a retirada das células T CD4 altera o balanço das populações de células T efetoras, tanto na orelha quanto no linfonodo drenante, mas, principalmente, na orelha.

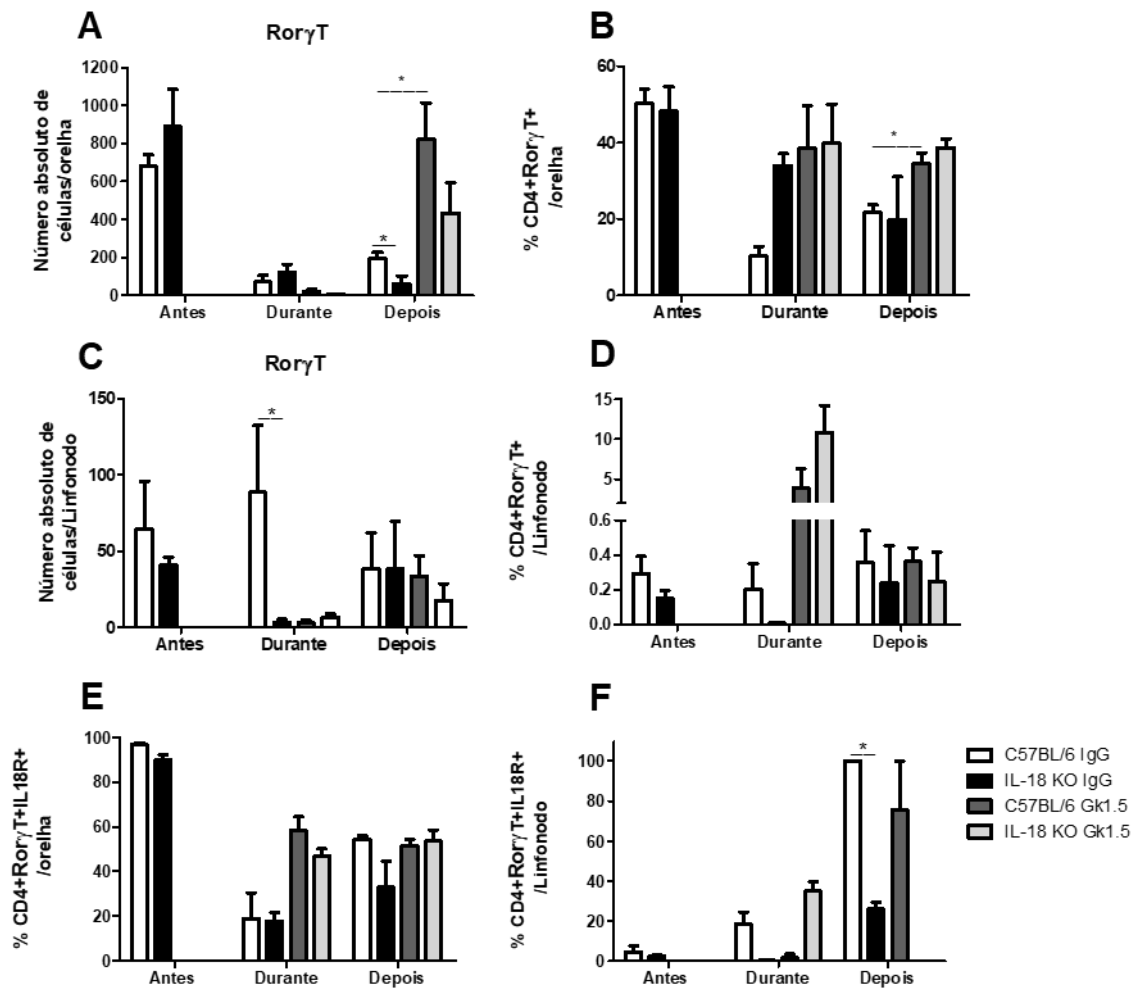


Figura 15. Cinética células T CD4⁺RoryT⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1x10⁴ promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. A orelha e o linfonodo drenante foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Verifica-se, então, o número absoluto das células TCRβ⁺CD4⁺ RoryT⁺ e a frequência dessas células na orelha (A e B), assim como no linfonodo drenante (C e D) nos animais tratados com IgG e Gk1.5. Há, também, a frequência de células T CD4⁺RoryT⁺IL-18R⁺ na orelha (E) e no linfonodo drenante (F) dos animais. Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=4 a 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.1.14 Análise da cinética das células T CD4⁺Foxp3⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk 1.5

Após a caracterização das células T efetoras no sítio inflamatório e linfonodo drenante, caracterizamos, também, a cinética das células T reguladoras. As células T reguladoras expressam o fator de transcrição Foxp3 e estão associadas a funções imunomoduladoras e à manutenção da homeostase em processos inflamatórios (Qiu *et al.*, 2018). Nota-se que há uma maior quantidade de células T reguladoras na orelha dos animais selvagens e IL-18 KO na terceira semana de infecção, havendo um decréscimo da quantidade dessas células. Já após o tratamento com Gk1.5 há, assim como com as células Ror γ T, um aumento da quantidade de células Foxp3⁺ após o término do tratamento para a depleção das células T CD4⁺ (**Figura 16 A**). Encontramos uma maior frequência de células Foxp3⁺ no animal deficiente para IL-18 (**Figura 16 B**), o que pode indicar que este animal tenha um balanço mais voltado para um perfil regulador na lesão. Já no linfonodo drenante, vemos um grande acúmulo de células T reguladoras na quarta semana de infecção nos animais tratados com IgG (**Figura 16 C**). Já com relação a frequência, temos uma frequência mais baixa do que na orelha, com uma tendência a uma maior frequência nos animais selvagens; porém, ainda assim muito baixa (**Figura 16 D**). Assim como os outros tipos celulares, as células T CD4⁺Foxp3⁺ também expressam o receptor da IL-18, havendo uma maior frequência de células IL-18R⁺ na terceira semana de infecção na orelha (**Figura 16 E**) e uma menor frequência no mesmo período no linfonodo drenante (**Figura 16 F**), com um aumento da frequência de células do animal WT na quarta semana de infecção e do animal IL-18 KO na sétima semana de infecção. Analisando, então, as quatro populações, fica claro que há mudança no balanço T-bet, Gata3, Ror γ T e Foxp3 feita a depleção das células T CD4⁺ entre as terceira e sexta semanas de infecção. Essa mudança das proporções e da distribuição desses tipos celulares na lesão e no linfonodo drenante pode nos ajudar a compreender a razão da lesão dos animais IL-18 KO serem menores do que a lesão dos animais IL-18 KO (**Figura 1**), assim como nos ajudar a compreender o porquê de a depleção gerar um ambiente de manutenção de uma lesão menor no animal selvagem e não no animal KO, mas ainda incapaz de alterar as quantidades de parasito.

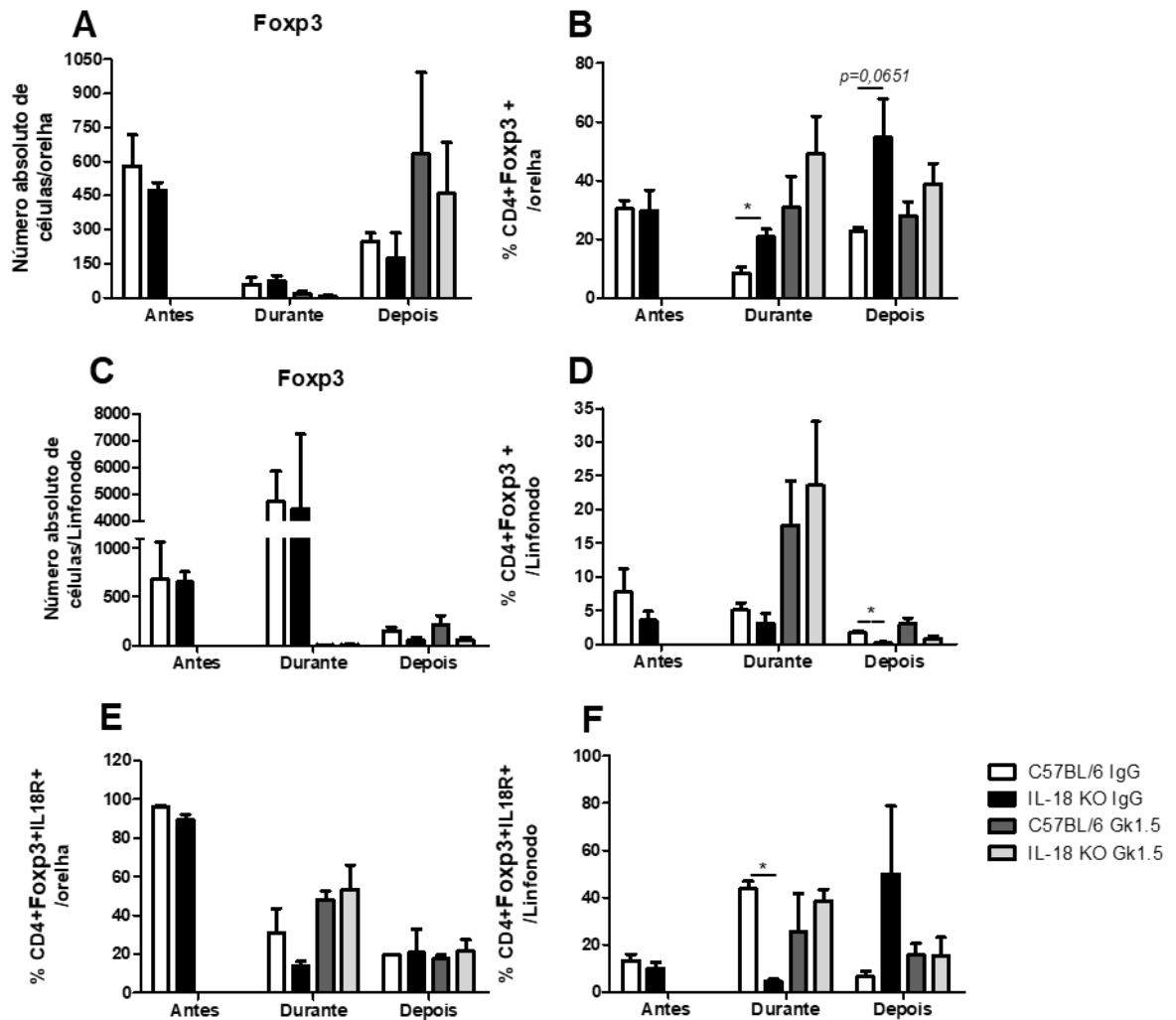


Figura 16. Cinética células T CD4⁺Foxp3⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis* nos animais tratados com IgG ou Gk1.5. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. A orelha e o linfonodo drenante foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Verifica-se, então, o número absoluto das células TCR β ⁺CD4⁺Foxp3⁺ e a frequência dessas células na orelha (**A e B**), assim como no linfonodo drenante (**C e D**) nos animais tratados com IgG e Gk1.5. Há, também, a frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺IL-18R⁺ na orelha (**E**) e no linfonodo drenante (**F**) dos animais. Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=4 a 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* $p < 0,05$).

4.1.15 Estratégia de *gate* para a seleção das células quanto à presença da IL-4, IL-10, IL-17 e do IFN- γ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*

Após verificarmos o perfil de ativação das células T CD4⁺ nas lesões e linfonodos drenantes dos animais, decidimos, então, olhar a presença de células IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ e IFN- γ ⁺ nas lesões e nos linfonodos drenantes dos animais selvagens e dos animais deficientes para a IL-18 na quarta semana de infecção. A marcação das amostras foi feita como previamente descrito e os *gates* da separação dos *singlets* nas amostras da orelha e do linfonodo drenante seguiram o mesmo padrão dos *gates* representados nas figuras **10 A** e **10 B**. Fizemos a seleção da população TCR β ⁺CD4⁺ como feito na figura **10 C**, selecionamos, também, a população TCR β ⁻CD4⁻. Dentro dessa população fizemos as outras separações: quadrante de células CD4⁺IL-14⁺ (**Figura 17 A**), quadrante de células CD4⁺IL-10⁺ (**Figura 17 B**), quadrante de células CD4⁺IL-17⁺ (**Figura 17 C**) e quadrante de células CD4⁺IFN- γ ⁺ (**Figura 17 D**). A separação desses quadrantes foi feita da mesma maneira dentro as populações TCR β ⁻CD4⁻; porém, foram selecionados os quadrantes negativos para CD4. Após a determinação das populações, os *gates* e quadrantes foram conferidos em todas as amostras, a fim de verificarmos se havia alguma população mal selecionada.

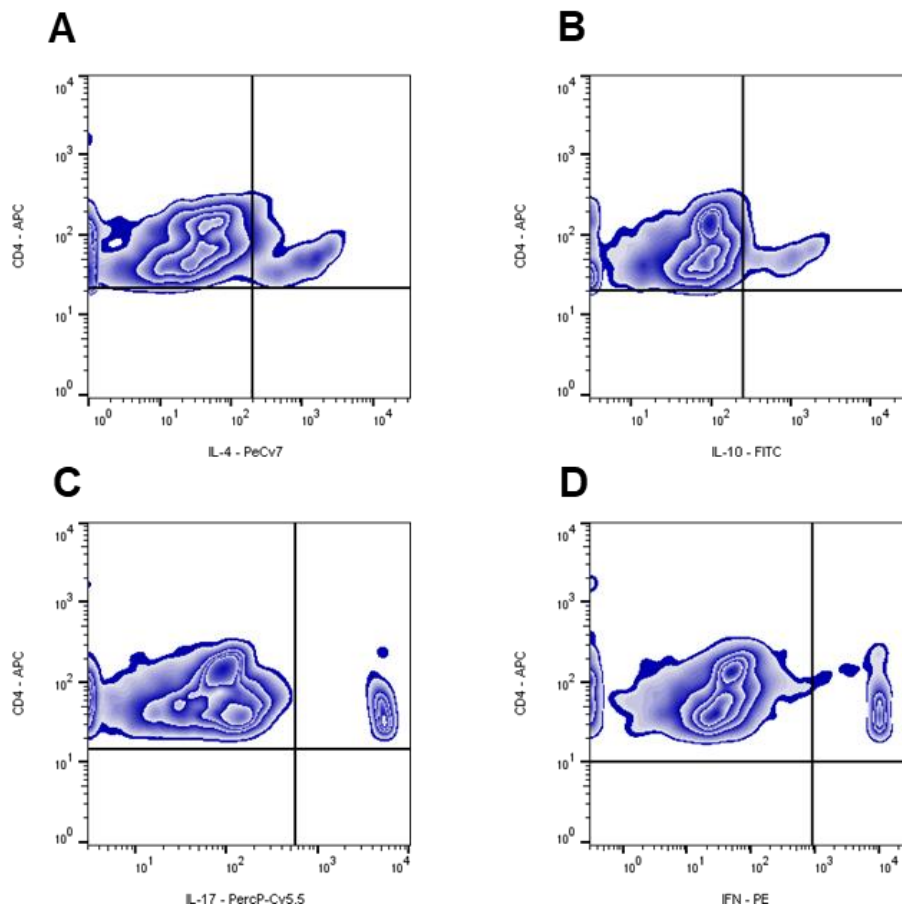


Figura 17. Estratégia de *gating* para seleção do perfil de células IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ e do IFN- γ ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. A orelha e o linfonodo drenante foram coletados após quatro semanas de infecção e fez-se um pool das amostras, recebendo o mix de anticorpos com os mesmos fluorocromos dos anticorpos utilizados para as marcações intracelulares e extracelulares. Os controles de isotipo foram lidos e os *gates* foram selecionados. Selecionamos os quadrantes de células CD4⁺IL-4⁺ (A), quadrante de células CD4⁺IL-10⁺ (B), quadrante de células CD4⁺IL-17⁺ (C) e quadrante de células CD4⁺ IFN- γ ⁺ (D). Os *gates* e quadrantes foram aplicados para todas as amostras, sendo ainda feito um refinamento da posição nas amostras de orelha e linfonodo drenante. Para o pool dos controles de isotipo, foram utilizados 25 μ l de 4 amostras de linfonodo drenante e 4 amostras de orelha, tanto de camundongos selvagens quanto IL-18 KO.

4.1.16 Análise das células T CD4⁺ quanto à presença da IL-4, IL-10, IL-17 e do IFN- γ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*

Como já havíamos verificado o perfil de ativação das células T no local da infecção e no linfonodo drenante dos animais, resolvemos verificar, também, a presença de células IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ e IFN- γ ⁺, já que estas citocinas estão diretamente relacionadas aos fatores de transcrição GATA-3, Foxp3, Ror γ T e T-bet, respectivamente (Zhu *et al.*, 2010). Ao analisarmos a frequência e número absoluto, verificamos que, na orelha dos animais infectados, há um predomínio de células T CD4⁺IL-4⁺ nos animais selvagens, quando comparados com os animais IL-18 KO (**Figura 18 A e 18 B**). De maneira muito interessante, ao analisarmos os linfonodos drenantes desses animais, encontramos uma maior quantidade e frequência de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ nos animais selvagens, quando comparados com os animais deficientes para a IL-18 (**Figura 18 C e 18 D**). Ou seja, nesse momento da infecção a lesão apresenta um perfil de citocinas ligado ao perfil de resposta do tipo Th2, mas nos linfonodos encontramos um perfil de citocinas mais próximo da resposta do tipo Th1. Já os animais deficientes para a IL-18 apresentam um balanço de citocinas mais equilibrado, apresentando quantidades similares de células IL-4⁺, IL-17⁺ e IFN- γ ⁺.

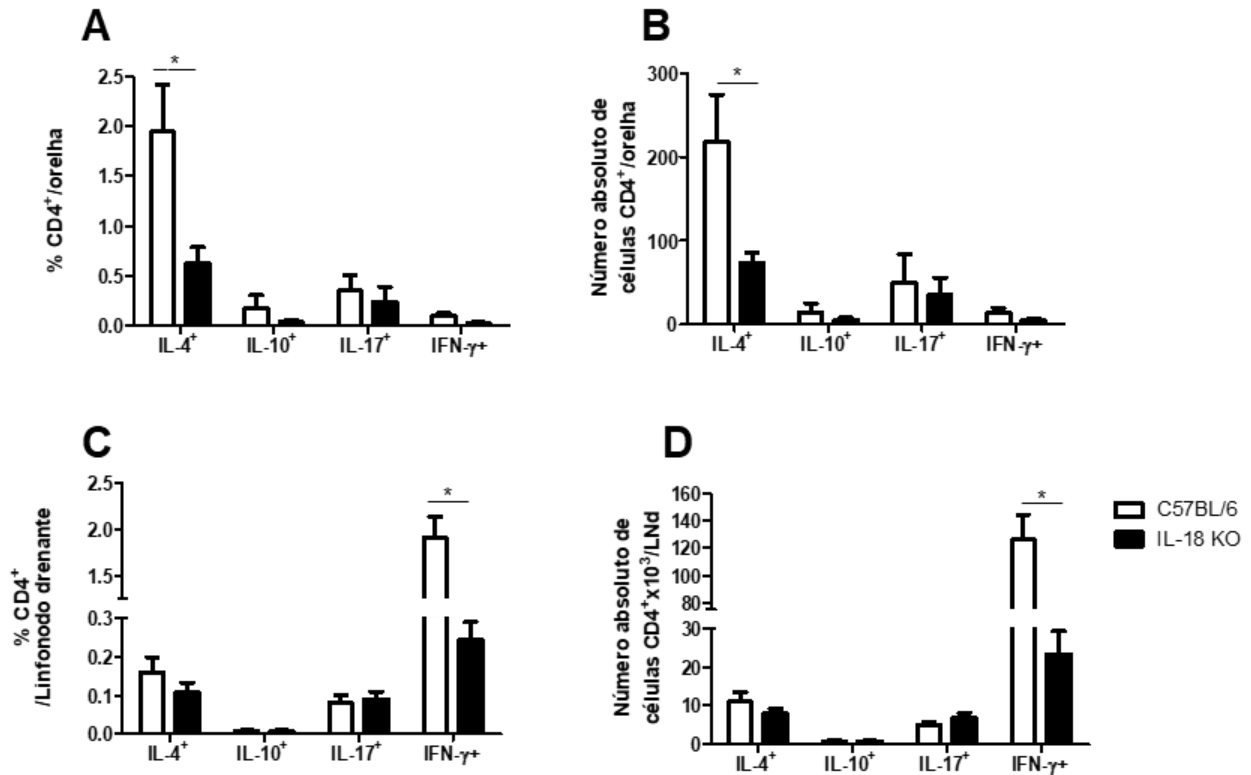


Figura 18. Células T CD4⁺ IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ e do IFN- γ ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1x10⁴ promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Após 4 semanas de infecção, a orelha e o linfonodo drenante foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Verifica-se, então, o número absoluto das células TCR β ⁺CD4⁺ IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ ou IFN- γ ⁺, assim como a frequência dessas células na orelha (**A e B**), bem como no linfonodo drenante (**C e D**) nos animais selvagens e deficientes para a IL-18. Este é o resultado de dois experimentos (n= 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.1.17 Análise das células TCR β ⁻CD4⁻ quanto à presença da IL-4, IL-10, IL-17 e do IFN- γ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*

Analisamos, também, a presença de células IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ e IFN- γ ⁺ na população de células TCR β ⁻CD4⁻. Encontramos um perfil parecido das células T CD4⁺, ou seja, uma maior quantidade e frequência de células IL-4⁺ na orelha dos animais selvagens em comparação com os animais IL-18 KO (**Figura 19 A e 19 B**). Nos linfonodos drenantes, encontramos uma grande quantidade e frequência aumentada de células IFN- γ ⁺ nos animais selvagens quando comparado com os animais deficientes para a IL-18 (**Figura 19 C e 19 D**). Notamos, também, que há uma maior quantidade de células TCR β ⁻CD4⁻IL-4⁺ nos linfonodos de ambos os animais quando comparados com as células TCR β ⁺CD4⁺IL-4⁺. Com esses dados e os dados do perfil de ativação das células T, fica claro que o animal WT possui um balanço do perfil de ativação de células T e um balanço de citocinas, tanto nas células T como em outros tipos celulares, diferente dos animais IL-18 KO. Além disso, é interessante notar que, nos animais WT, há o predomínio de uma citocina ligada a um perfil Th2 na orelha e um predomínio de uma citocina ligada a um perfil Th1 no linfonodo drenante, o que pode indicar a capacidade da IL-18 de simultaneamente influenciar esses dois perfis (Nakanishi *et al.*, 2001).

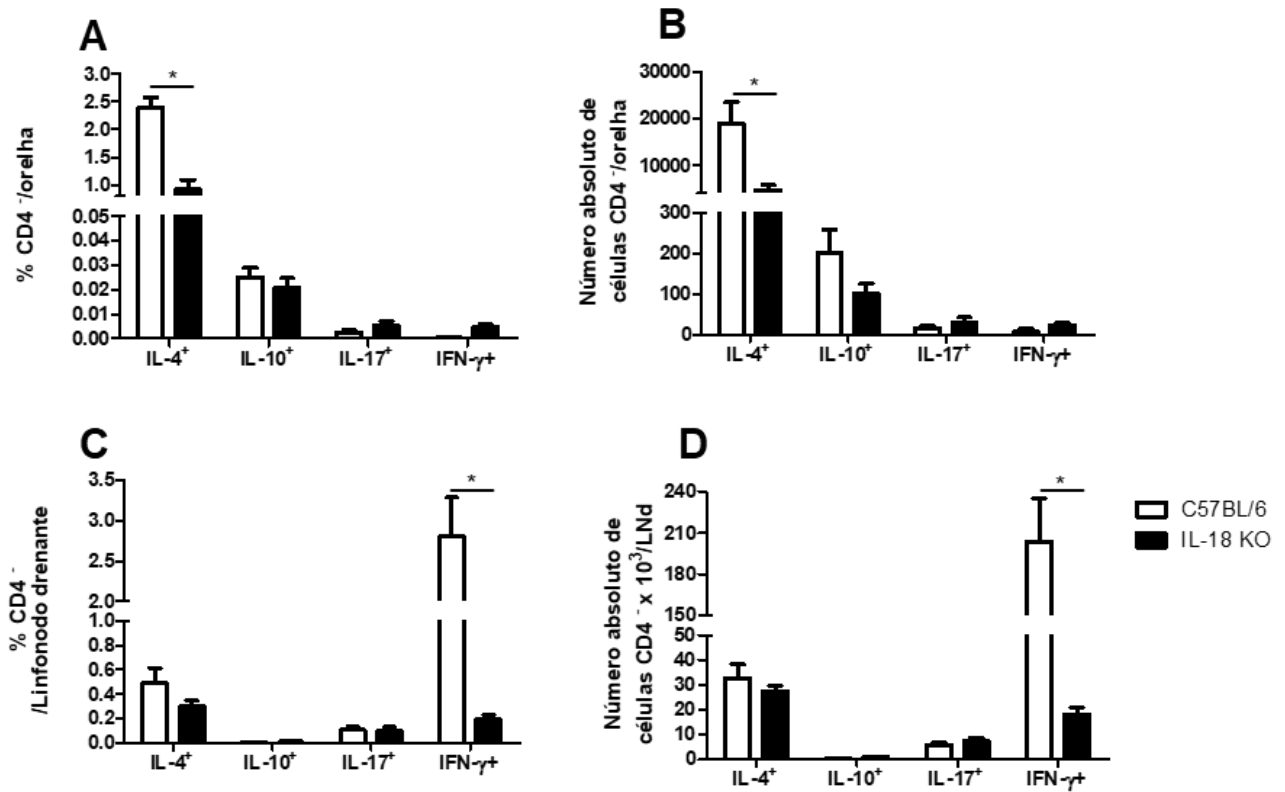


Figura 19. Células TCRβ⁺CD4⁺ IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ e do IFN-γ⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram infectados com 1x10⁴ promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Após 4 semanas de infecção, a orelha e o linfonodo drenante foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Verificase, então, o número absoluto das células TCRβ⁺CD4⁺ IL-4⁺, IL-10⁺, IL-17⁺ ou IFN-γ⁺, assim como a frequência dessas células na orelha (**A e B**), bem como no linfonodo drenante (**C e D**) nos animais selvagens e deficientes para a IL-18. Este é o resultado de dois experimentos (n= 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.1.18 Análise da transferência de células dos animais IL-18 KO e C57BL/6 para os animais IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*

Para verificarmos a influência do ambiente de ativação das células em um animal WT ou IL-18 KO, nós infectamos animais IL-18 KO, depletamos as células T CD4⁺ utilizando o anticorpo GK1.5 e, após uma semana do início da depleção, tratamos os animais com 2x10⁵ células dos linfonodos drenantes dos animais IL-18 KO e C57BL/6 com 4 semanas de infecção. Como dados anteriores de nosso grupo demonstraram, por ELISA, que os animais IL-18 KO produzem mais IL-10 do que os animais WT na quarta e oitava semanas de infecção, um grupo de camundongos foi tratado, também, com IgG de rato e outro grupo de camundongos foi tratado com anticorpo anti-IL-10R. Verificamos que todos os animais tiveram aumento da espessura das orelhas na quarta semana. Já a partir da quinta semana, a lesão dos animais IL-18 KO tratados com células dos animais KO e IgG apresentaram menor lesão do que os animais tratados com células dos animais C57BL/6 e dos animais IL-18 KO com anti-IL10R (**Figura 20 A**). Esse perfil se manteve até a oitava semana de infecção. Quando analisamos as lesões dos camundongos tratados com células com as lesões dos camundongos sem tratamento e sem depleção de células, nota-se que os animais que receberam células dos animais WT e que receberam células dos animais deficientes para a IL-18 com anti-IL-10R possuem mesma espessura da orelha do que o animal selvagem sem tratamento (**Figura 20 B**). Ou seja, se o animal IL-18 KO recebe células oriundas de um animal WT, ele apresenta uma lesão maior do que a do animal IL-18 KO sem tratamento. Ao tratarmos os animais com anti-IL-10R, obtivemos o mesmo perfil de lesão do que os animais tratados com células dos camundongos selvagens.

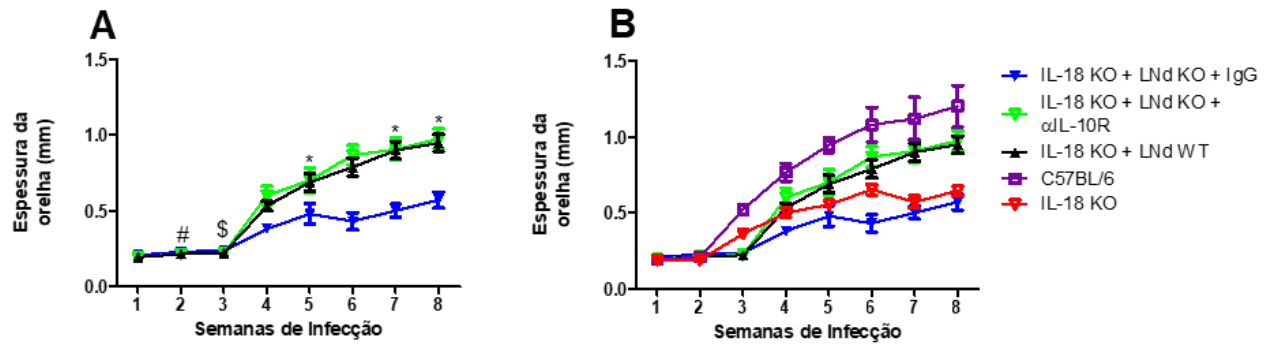


Figura 20. Transferência de células dos animais IL-18 KO e C57BL/6 para os animais IL-18 KO infectados pela *Leishmania amazonensis*. Primeiramente, os camundongos C57BL/6 e IL-18 KO foram infectados com 1×10^4 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda e direita. Os camundongos foram mortos na quarta semana de infecção. Os linfonodos drenantes foram retirados, macerados e a quantidade de células foi acertada para 2×10^5 células por animal. Os animais IL-18 KO que receberam o tratamento foram infectados com 1×10^4 promastigotas, metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Após duas semanas de infecção os animais foram tratados com 1mg/ml do anticorpo anti-CD4 (clone GK1.5) por três vezes ao dia, de dois em dois dias por uma semana (#). Na terceira semana de infecção os animais receberam 2×10^5 células dos camundongos IL-18 KO ou dos animais C57BL/6 (\$). Um dos grupos recebeu tratamento com 1mg/ml de IgG de rato, uma vez ao dia de três em três dias por uma semana. Outro grupo recebeu tratamento com 5mg/ml de anti-IL-10R, uma vez ao dia de três em três dias por uma semana. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente até 8 semanas após a infecção (A) e para facilitar a comparação, colocamos as medidas dos camundongos que receberam o tratamento com células juntamente com a medida da espessura dos camundongos não tratados (B). Este é o resultado de dois experimentos (n= 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* p<0,001).

]

4.2 PARTE II

4.2.1 Análise do perfil das células T CD4⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO *naïve*

Com a finalidade de avaliarmos diferença intrínseca entre os animais WT e os animais IL-18 KO, fizemos uma análise do perfil das células T no baço e no intestino desses animais. Escolhemos analisar o perfil das células T no intestino, pois, como descrito, a IL-18 está associada a mudanças na microbiota intestinal, além de parecer ter um papel importante na patogênese da colite (Levy *et al.*, 2015; Nowarski *et al.*, 2015).

Ao analisarmos, pudemos perceber mais células viáveis no baço do que no intestino (**Figura 21 A e B**), sendo que a maior parte dessas células T CD4⁺ encontradas nesses órgãos dos WT e IL-18 KO são células efetoras, ou seja, Foxp3⁻, tendo cerca de 10 vezes mais células FoxP3⁻ do que FoxP3⁺. Com relação aos órgãos, encontramos uma maior quantidade de células no baço do que no intestino desses animais, tanto para células T CD4⁺ efetoras, como para reguladoras (**Figura 21 C e D**). Já com relação à frequência, nota-se que quase a totalidade de células T CD4⁺ são efetoras; enquanto isso, no perfil de células Foxp3⁺, nota-se a mesma proporção no baço da frequência dessas células entre os animais selvagens e os animais IL-18 KO, mas no intestino há uma maior frequência de células T reguladoras nos animais IL18 KO (**Figura 21 E e F**). Sendo assim, no balanço de células do animal IL-18 KO, aparentemente há uma parcela maior de células comprometidas com um perfil regulador no intestino.

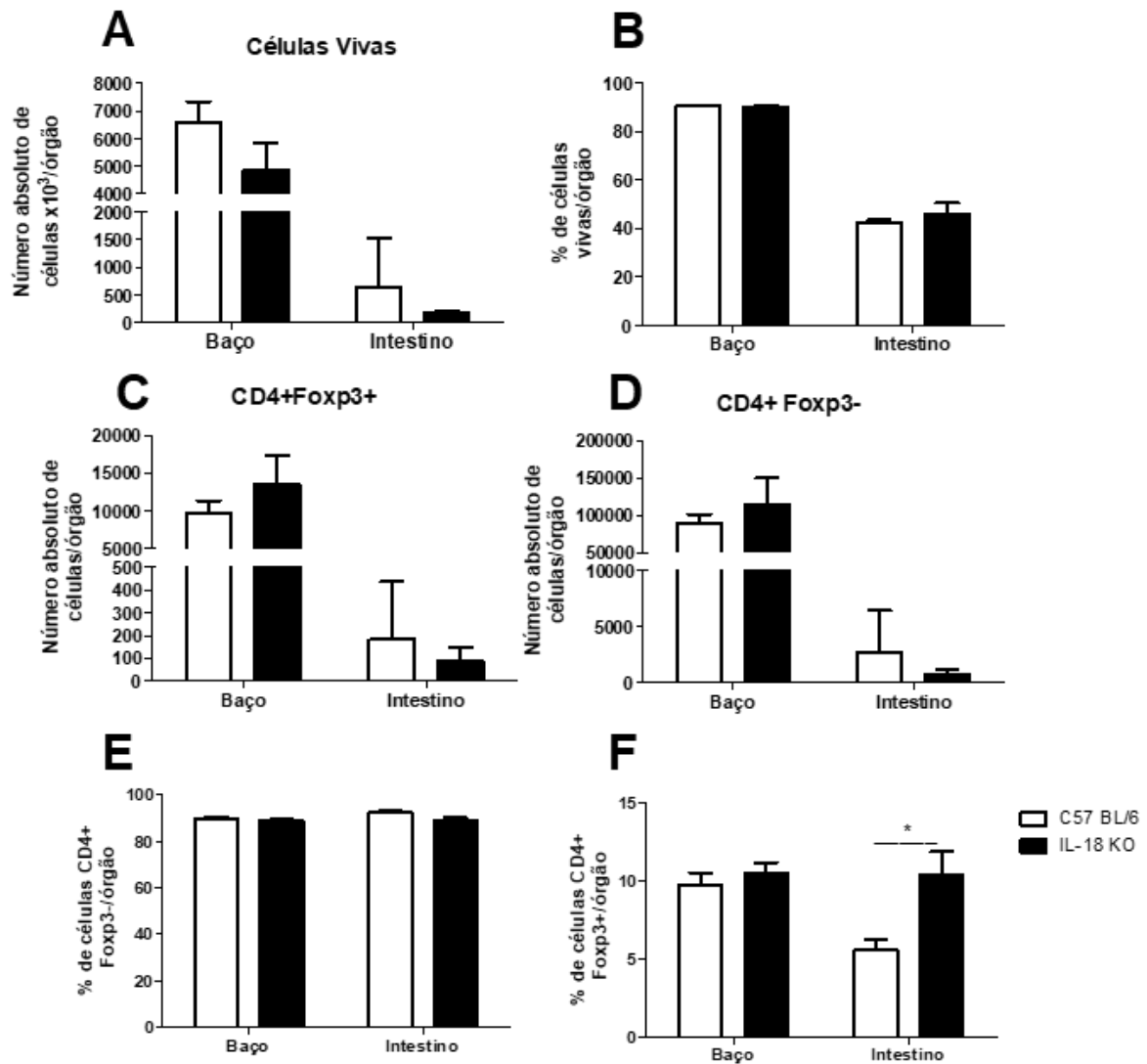


Figura 21. Perfil das células T CD4⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO *naïve*. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram mortos e o baço e o intestino delgado foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Os *gates* utilizados foram os mesmos da figura 1.8. Verifica-se, então, o número absoluto das células vivas e a frequência dessas células (A e B), assim como o número absoluto das células TCRβ⁺CD4⁺Foxp3⁻ e Foxp3⁺ (C e D). Analisamos, também, a frequência dessas células Foxp3⁻ (E) e Foxp3⁺ (F). Este é o resultado representativo de dois experimentos (n= 4 a 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.2.2 Análise do perfil das células T CD4⁺ e das células IL-18R⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO *naïve*

Já foi demonstrado que a IL-18 regula a ativação e expansão de subpopulações de células T CD4⁺ no intestino, principalmente células Foxp3⁺ e RorγT, tanto em situações fisiológicas como em situações inflamatórias em camundongos C57BL/6 (Harrison *et al.*, 2015). Pensando nisso avaliamos, primeiramente, a presença do receptor da IL-18 nas células CD4⁺Foxp3⁻ e encontramos que uma parcela dessa população no baço expressa o receptor da IL-18. Já no intestino, quase 60% das células são IL-18R⁺. Além da grande frequência dessa população no intestino, essas células apresentam uma alta expressão do receptor da IL-18 (**Figura 22 A e B**). Já com relação às células Foxp3⁺ também encontramos uma maior frequência dessas células IL-18R⁺ no intestino dos animais WT, sendo que essas apresentam maior MFI quase duas vezes maior do que o MFI das células CD4⁺Foxp3⁻ no intestino (**Figura 22 C e D**). Esses dados demonstram que as células T desses animais sem infecção já são responsivas à IL-18.

Analisamos, também, as subpopulações de células T efetoras. Com relação às células T-bet⁺ encontramos uma tendência a mais células nesse perfil no baço dos animais IL-18 KO. Já no intestino, houve uma inversão do perfil, onde encontramos, então, uma tendência a haver mais células comprometidas com esse perfil nos animais WT; porém, encontramos menos células do que no baço (**Figura 22 E**). Já com relação à frequência dessas células, encontramos uma maior frequência, cerca de três vezes mais, dessa população no intestino dos animais selvagens quando comparada com a frequência dessa população nos animais IL-18 KO, tanto para a população geral como para a IL-18R⁺ (**Figura 22 F e G**). Já no baço, nas duas linhagens, encontramos uma alta expressão do IL-18R nas células T-bet⁺; já no intestino, somente as células dos animais WT é que expressam o receptor para IL-18 (**Figura 22 H**). Analisando os outros perfis, encontramos uma quantidade pequena de células RorγT⁺ no baço e quase insignificante no intestino dos animais; porém, não apresentaram receptor da IL-18 (**Figura 22 I**). Não encontramos células Gata3⁺ nas amostras.

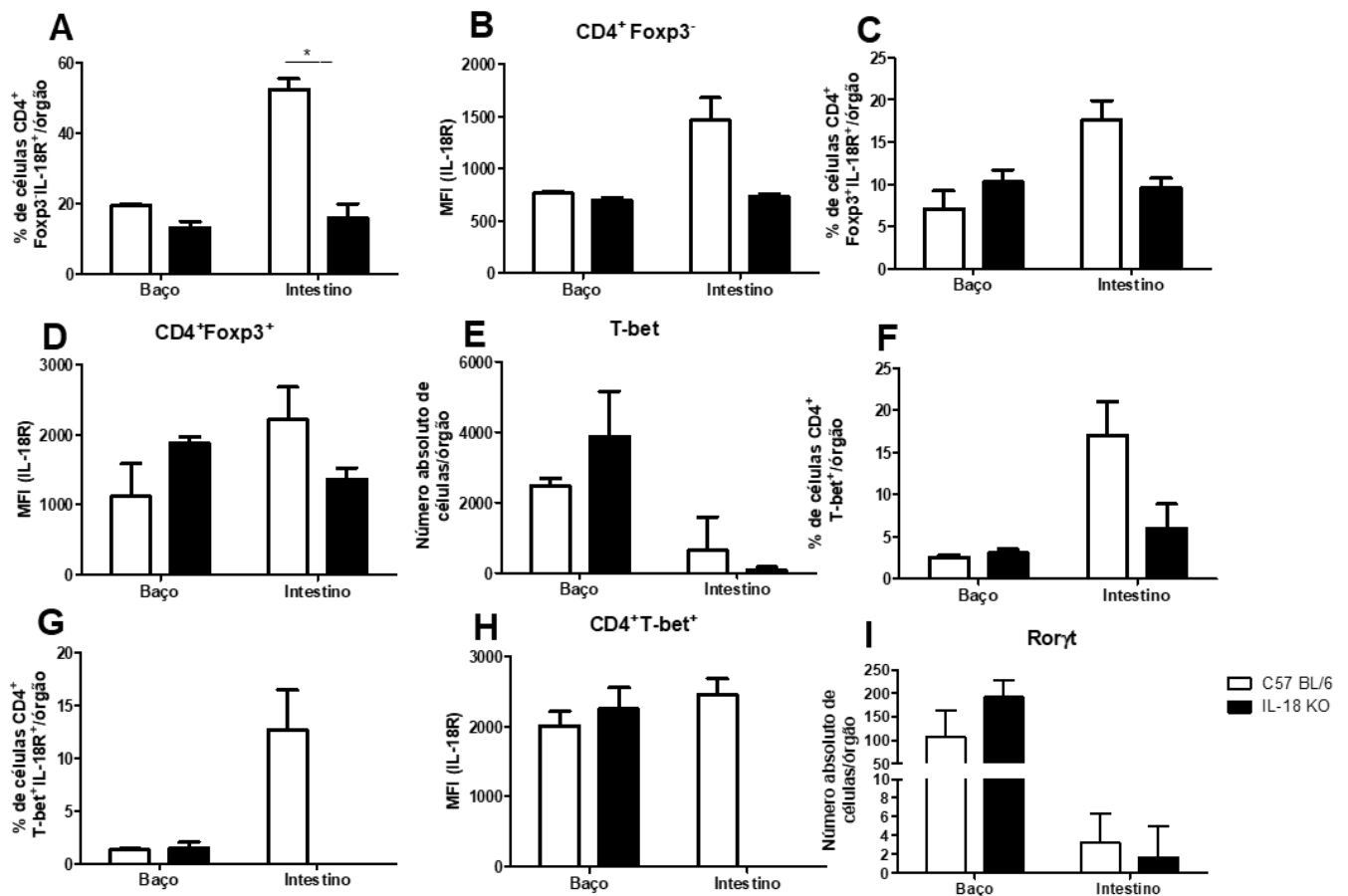


Figura 22. Perfil das células T CD4⁺ e das células IL-18R⁺ nos animais selvagens e IL-18 KO naïve. Os camundongos selvagens e IL-18 KO foram mortos e o baço e o intestino delgado foram coletados e receberam o mix de anticorpos para as marcações intracelulares e extracelulares. Para o número absoluto das células, as amostras foram contadas em câmara de Neubauer. Os *gates* utilizados foram os mesmos da figura 1.8. Verifica-se, então, o a frequência das células TCRβ⁺CD4⁺Foxp3⁻IL-18R⁺ (A) e a média da intensidade de fluorescência do IL-18R nessas células (B). Depois a frequência das células TCRβ⁺CD4⁺Foxp3⁺IL-18R⁺ (C) e o MFI do IL-18R nessas células (D). Mostramos, também, o número absoluto das células CD4⁺T-bet⁺ (E) e a frequência dessas células (F). Em G a frequência de células T-bet⁺ IL-18R⁺ (G) e o MFI do IL-18R (H). Finalizamos com o número absoluto das células RorγT⁺ (I). Este é o resultado representativo de dois experimentos (n= 4 a 5) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.2.3 Análise histopatológica dos órgãos linfoides e orelha dos camundongos C57BL/6 *naïve* e infectados com *Leishmania amazonensis*

Sabe-se que a deleção dos genes de certas citocinas, como é o caso do TNF, pode alterar a estrutura de alguns dos órgãos linfoides (Oliveira *et al.*, 2012) e, por isso, resolvemos analisar o baço, linfonodo e orelha dos animais sem infecção e infectados com *L. amazonensis*. Ao analisarmos os cortes nos animais selvagens, verificamos que não há alterações na epiderme e derme dos animais sem infecção (**Figura 23 A**); já nos animais IL-18 KO, após 4 semanas de infecção, verificamos a presença de infiltrado inflamatório na derme (**Figura 23 D**). Com relação aos linfonodos drenantes, verificamos a hiperplasia e reatividade com a presença de centros germinativos e folículos linfoides nos animais infectados (**Figura 23 E**) e um linfonodo sem reatividade nos animais não infectados (**Figura 23 B**). Já no baço, não encontramos alterações na cápsula e na polpa vermelha, tanto nos animais não infectados (**Figura 23 C**) como nos animais infectados (**Figura 23 F**); porém, encontramos polpa branca em confluência e presença de centros germinativos indicativos de reatividade no baço dos animais infectados (**Figura 23 F**).

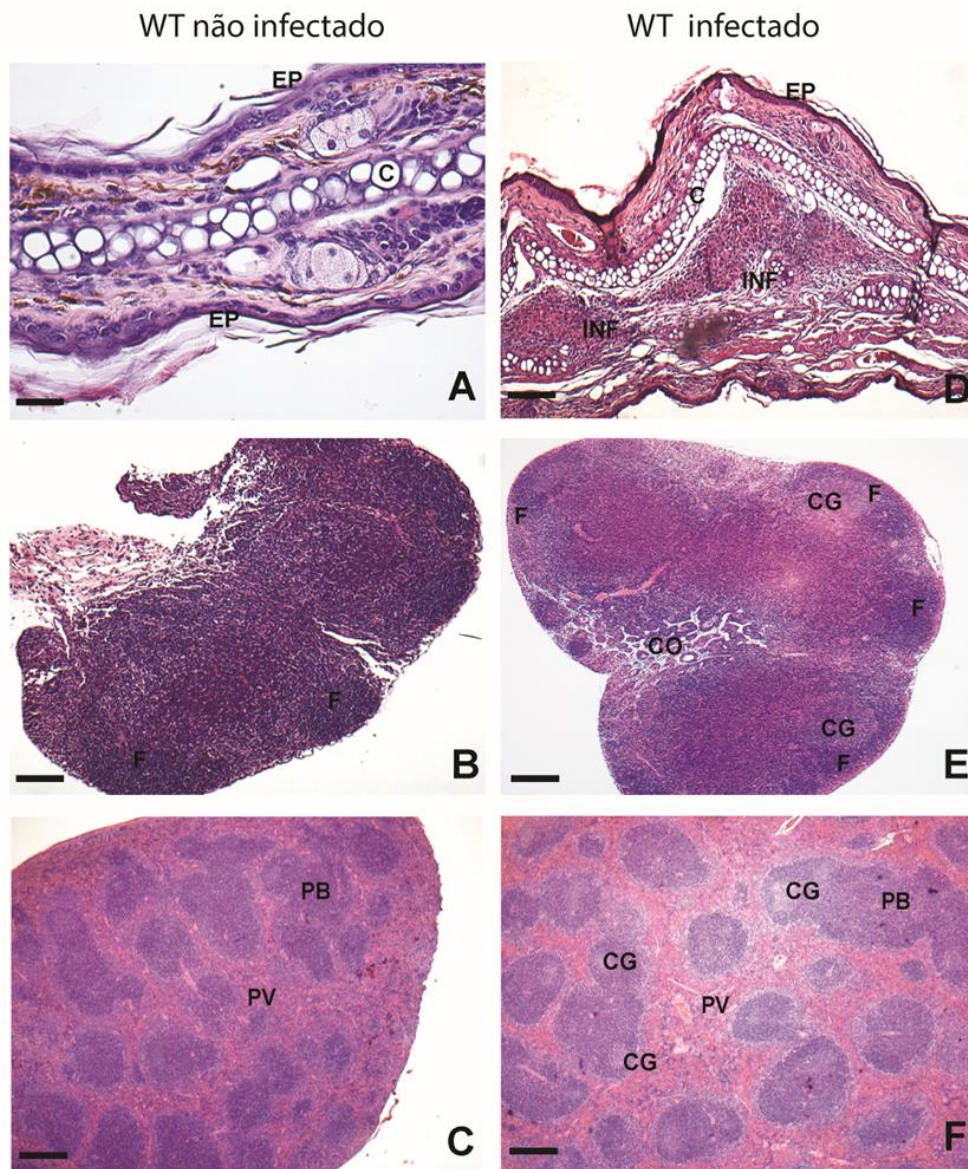


Figura 23. Cortes diversos de órgãos de camundongos C57BL/6 sem infecção e camundongos C57BL/6 infectados por *Leishmania amazonensis*. Os camundongos não infectados, após quatro semanas de infecção, foram mortos, os órgãos foram coletados e, após a preparação e inclusão em bloco de parafina, os cortes foram feitos e corados por H&E. Evidenciar corte de pele sem alterações na epiderme e derme em **A** e inflamação na derme em **D**. O linfonodo em **E** apresenta-se hiperplásico e reativo com presença de folículos linfóides e centros germinativos. Ao contrário, em **B** vemos um corte de linfonodo sem reatividade. Em **C** e **F**, observar cortes de baço sem alterações de cápsula e da polpa vermelha. Em **F**, polpa branca em confluência e presença de centros germinativos indicativos de reatividade. **EP** – Epiderme; **C** – cartilagem; **INF** – inflamação, **CG** centro germinativo, **F** folículo Linfóide, **PV** polpa vermelha, **PB** polpa branca. **A - F** coloração pela H&E. Barra em **A - D** representa 32 μ m (100 x). Barra em **B, C, E** e **F** representa 62 μ m (50x).

4.2.4 Análise histopatológica dos órgãos linfoides e orelha dos camundongos C57BL/6 IL-18 KO *naïve* e infectados com *Leishmania amazonensis*

Ao analisarmos os cortes histopatológicos nos animais IL-18 KO, não encontramos alterações na epiderme e na derme dos animais IL-18 KO sem infecção (**Figura 24 A**) e sem diferenças com o mesmo corte nos animais WT (**Figura 23 A**). Já com relação ao corte dos animais infectados (**Figura 24 D**), verificamos a presença de infiltrado inflamatório na derme, porém, de forma mais difusa do que o infiltrado inflamatório nos animais selvagens (**Figura 23 D**). Com relação aos linfonodos drenantes foram encontrados folículos nos animais sem infecção (**Figura 24 B**), mas apenas nos animais infectados é que se verificou a presença de centros germinativos reativos (**Figura 24 E**). Não foram encontradas diferenças com relação à polpa vermelha e à cápsula no baço dos animais sem infecção (**Figura 24 C**) e animais infectados (**Figura 24 F**), sendo encontrado centros germinativos indicativos de reatividade na polpa branca do baço dos animais infectados (**Figura 24F**). Entre os linfonodos e baços dos animais não infectados selvagens e deficientes para IL-18 não foram encontradas diferenças estruturais. A única diferença microscópica detectada foi na distribuição do infiltrado inflamatório na orelha dos animais infectados. Foram feitas, também, análises dos cortes de intestino desses animais, mas não foram detectadas diferenças ou alterações morfológicas nas camadas mucosa, submucosa e muscular pela coloração de H&E entre os animais. Na coloração por PAS⁺ alcian blue também não foram observadas diferenças nos padrões de distribuição ou números de células caliciformes (dados não mostrados).

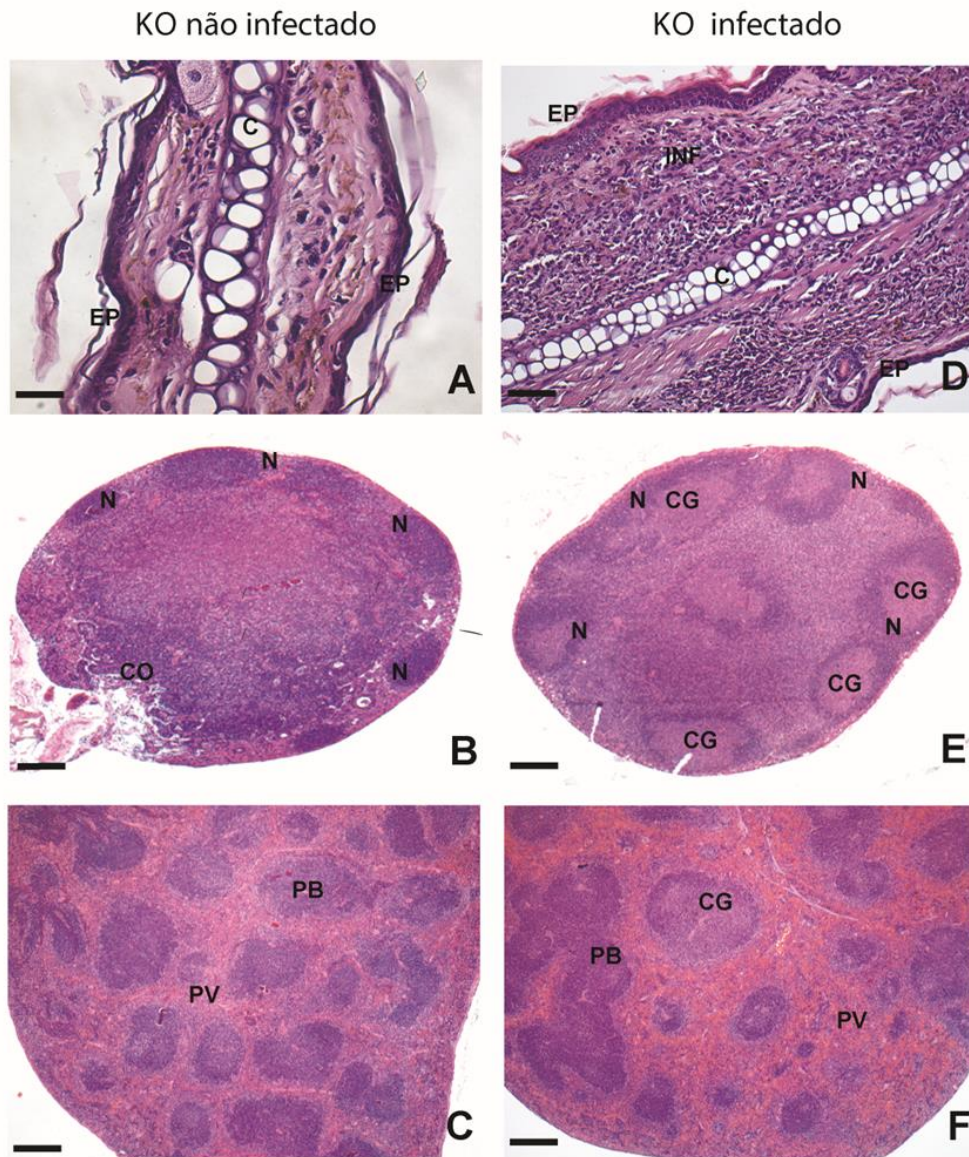


Figura 24. Cortes diversos de órgãos de camundongos IL-18 KO sem infecção e camundongos IL-18 KO infectados por *Leishmania amazonensis*. Os camundongos não infectados, após quatro semanas de infecção, foram mortos e os órgãos foram coletados e, após a preparação e inclusão em bloco de parafina, os cortes foram feitos e corados por H&E. Evidenciar corte de pele sem alterações na epiderme e derme em **A** e inflamação intensa e difusa na derme em **D**. O linfonodo em **B** apresenta inúmeros folículos, mas somente em **E** os folículos apresentam centros germinativos reativos. Em **C** e **F**, observar cortes de baço sem alterações de cápsula e da polpa vermelha (PV). Em **F**, polpa branca em confluência e presença de centros germinativos indicativos de reatividade. EP – epiderme; C – cartilagem; INF – inflamação, CG centro germinativo, F folículo Linfoide, PV polpa vermelha, PB polpa branca. A - F coloração pela H&E. Barra em A - D representa 32 μ m (100 x). Barra em B, C, E e F representa 62 μ m (50x).

4.3 PARTE III

4.3.1 Análise do desenvolvimento da lesão induzida por λ -carragenina em camundongos selvagens e IL-18 KO

Notamos, em nosso primeiro modelo com animais C57BL/6 selvagens infectados por *L. amazonensis*, que talvez as células T CD4⁺IL-18R⁺ tenham um papel crucial na manutenção da lesão. Como em processos inflamatórios de pele mais agudos não haveria uma grande população desse tipo celular (Nestle *et al.*, 2009), decidimos, então, verificar como se comportariam as lesões desses animais em um modelo agudo de inflamação. Desafiámos os animais com a carragenina (Duarte *et al.*, 2016) e acompanhamos as lesões até setenta e duas horas após o desafio. Encontramos uma lesão maior nos camundongos selvagens a partir da sexta hora após o desafio quando comparada com a lesão nos camundongos IL-18 KO, tendo o seu pico de lesão na quinquagésima sexta hora (**Figura 25 A**). Após o pico, as lesões nas duas linhagens de camundongos diminuem. Ou seja, mesmo em um modelo agudo, o animal WT apresenta uma lesão maior. Ao analisarmos as orelhas dos animais desafiados, a fim de sabermos se a lesão seria formada por uma maior quantidade de células ou por edema, nota-se que há uma maior quantidade de células vivas na lesão na quinquagésima sexta hora, ou seja, no momento em que as lesões dos animais estão maiores; porém, não há diferença entre a quantidade de células entre as amostras dos animais selvagens e IL-18 KO (**Figura 25 B**). Analisamos, também, a produção da IL-18 nos camundongos selvagens e encontramos um aumento progressivo da produção de IL-18 da quarta até a septuagésima segunda hora. Sendo assim, a diferença das lesões não estaria sendo causada por uma maior ou menor quantidade de células na lesão, mas, provavelmente, por um edema em um ambiente com IL-18. É sabido que, em modelos de inflamação na pata por Carragenina, há a formação de edema pronunciável nos animais desafiados (Coura *et al.*, 2015).

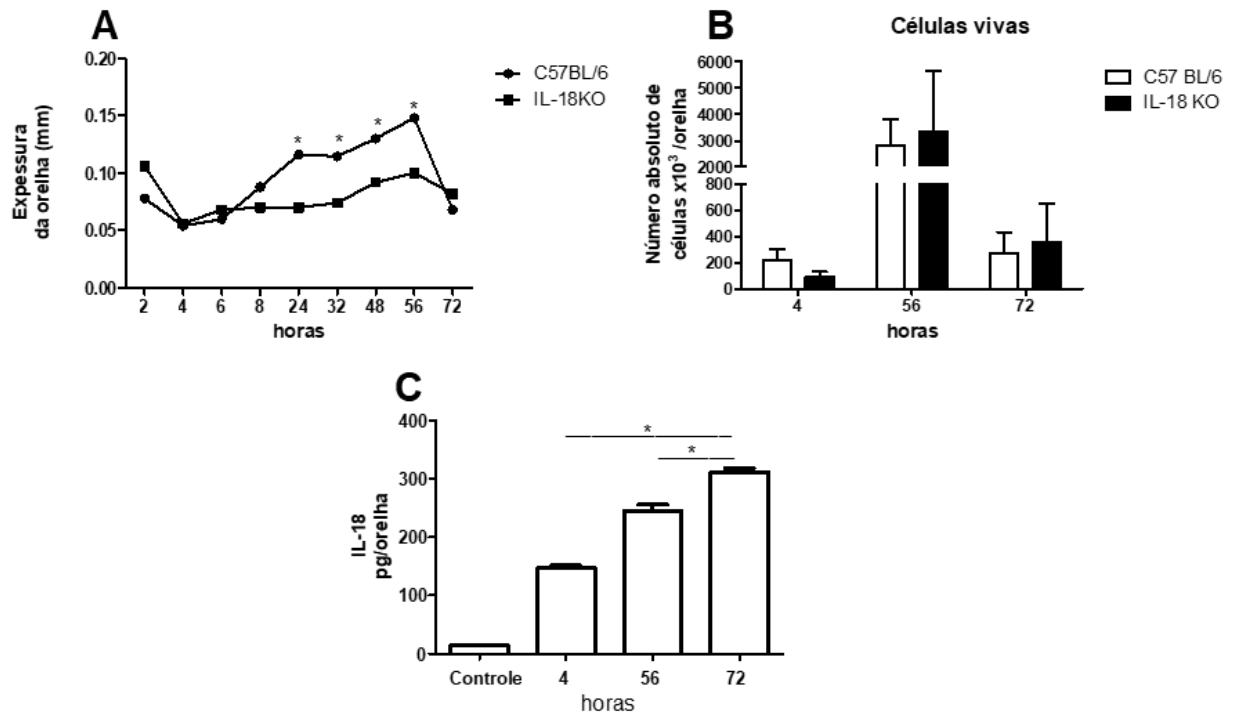


Figura 25. Desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina. É feita a injeção de 10 μ l de λ -carragenina a 1% p/v em salina 0,9% por via intradérmica na orelha esquerda e PBS na orelha direita de camundongos selvagens e camundongos IL-18. A lesão foi acompanhada e medida diariamente por três dias (A). Por citometria de fluxo, analisamos, também, a quantidade de células vivas na orelha dos animais desafiados (B): os animais foram mortos e as orelhas foram coletadas, digeridas em uma solução com collagenase e DNase e marcadas com Live/Dead para determinação das células viáveis. Em C encontramos os níveis da produção de IL-18 nos animais selvagens. Os resultados são representativos de dois experimentos (n=5 a 8) desenvolvidos independentemente. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.3.2 Estratégia dos gates para a análise do perfil celular nos animais selvagens e IL-18 KO desafiados pela λ -carragenina

Para a análise das populações das células nas amostras, seguimos os mesmos passos dos aplicados às amostras dos animais infectados demonstrados na figura 10, dadas algumas particularidades. As orelhas dos animais foram coletadas e marcadas com os anticorpos para a definição das populações, seguindo um modelo de separação dos *gates* já bem estabelecido (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012).

Primeiramente fizemos a separação das células vivas (**Figura 26 A**); depois selecionamos a população CD11b⁺ (**Figura 26 B**), já que fizemos a análise das células de origem mielóide. Dentro do *gate* de células CD11b⁺, selecionamos as populações utilizando os marcadores Ly6G e Ly6C. Separamos, então: população Ly6G⁻Ly6C^{hi/int} (**Figura 26 C**), que chamamos de monócitos inflamatórios, população Ly6G⁺Ly6C^{int} (**Figura 26 C**), que chamamos de neutrófilos. Na população Ly6G⁻Ly6C⁻, separamos as populações CD11c⁻F4/80⁺ e dentro dela população F4/80⁺MHCII^{int} (**Figura 26 D**) que chamamos de macrófagos e separamos a população CD11c⁺MHCII^{hi} (**Figura 26 E**) que chamamos de células dendríticas. Dentro de cada população analisamos, também, a presença do receptor da IL-18. Assim, delimitamos as populações em: Ly6C⁺IL-18R⁺ (**Figura 26 F**) para os monócitos, Ly6G⁺IL-18R⁺ (**Figura 26 G**) para os neutrófilos, F4/80⁺IL-18R⁺ (**Figura 26 H**) para os macrófagos e MHCII⁺IL-18R⁺ (**Figura 26 I**) para células dendríticas.

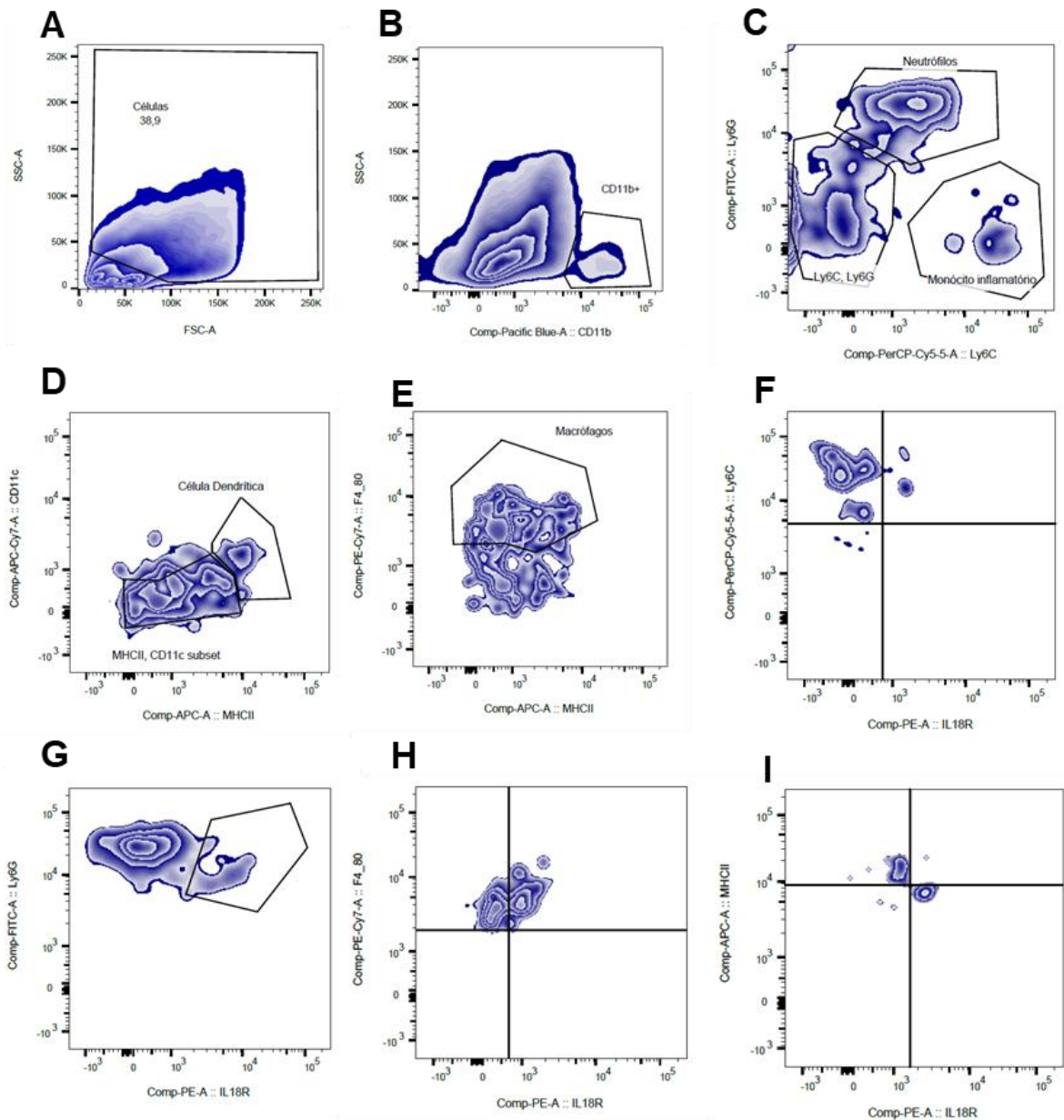


Figura 26. Perfil celular nos animais selvagens e IL-18 KO desafiados pela carragenina. Os camundongos foram desafiados com de 10 μ l de λ -carragenina a 1% p/v em salina 0,9% por via intradérmica na orelha esquerda. Após quatro, cinquenta e seis e setenta e duas horas de desafio, os animais foram mortos e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. Selecionamos as células vivas (A), depois a população CD11b⁺ (B). Efetuamos a seleção das populações Ly6G⁺Ly6C^{hi/int} que chamamos de monócitos inflamatórios e Ly6G⁺Ly6C^{int} que chamamos de neutrófilos (C) e dentro da população Ly6G⁺Ly6C⁺ separamos as populações CD11c⁺F4/80⁺ e dentro dela população F4/80⁺MHCII^{int} (D) que chamamos de macrófagos, separamos, também a população CD11c⁺MHCII^{hi} (E) que chamamos de células dendríticas. Dentro de cada população delimitamos as populações em: Ly6C⁺IL-18R⁺ (F) para os monócitos, Ly6G⁺IL-18R⁺ (G) para os neutrófilos, F4/80⁺IL-18R⁺ (H) para os macrófagos e MHCII⁺IL-18R⁺ (I) para as células dendríticas. Os *gates* e quadrantes foram aplicados para todas as amostras.

4.3.3 Avaliação do perfil dos monócitos presente no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO no modelo de inflamação induzida por λ -carragenina

Ao analisarmos a quantidade de monócitos inflamatórios, encontramos a mesma quantidade de células nos animais selvagens em comparação com os animais IL-18 KO (**Figura 27 A**), sendo o pico dessas células na quinquagésima sexta hora. Com relação à frequência dessas células, vemos uma maior quantidade de monócitos inflamatórios nos WT 4 horas após o desafio com a carragenina; nos tempos seguintes, há uma uniformidade da frequência em torno de 30% nas duas linhagens de animais (**Figura 27 B**). Com relação à presença do receptor da IL-18 nessas células, não encontramos receptores na quarta hora após o desafio com carragenina. Porém, vemos que na quinquagésima sexta hora já há monócitos inflamatórios expressando o receptor, sendo que essa quantidade de células IL-18R⁺ diminui no tempo final (**Figura 27 C**). Já na frequência dessas células, vemos um padrão parecido com a cinética de produção da IL-18 vista na figura 25 C, vemos um aumento de cerca de 2 vezes na quinquagésima sexta hora em relação à quarta hora após o desafio com carragenina e um aumento mais discreto da quinquagésima sexta hora para a septuagésima segunda hora após o desafio (**Figura 27 D**). Analisamos, também, a expressão do IL-18R e notamos um padrão uniforme de expressão nos animais WT (**Figura 27 E**). Um fato interessante é que, em nossos experimentos com *Leishmania amazonensis*, não verificamos monócitos inflamatórios expressando o receptor da IL-18 em nenhum dos tempos analisados.

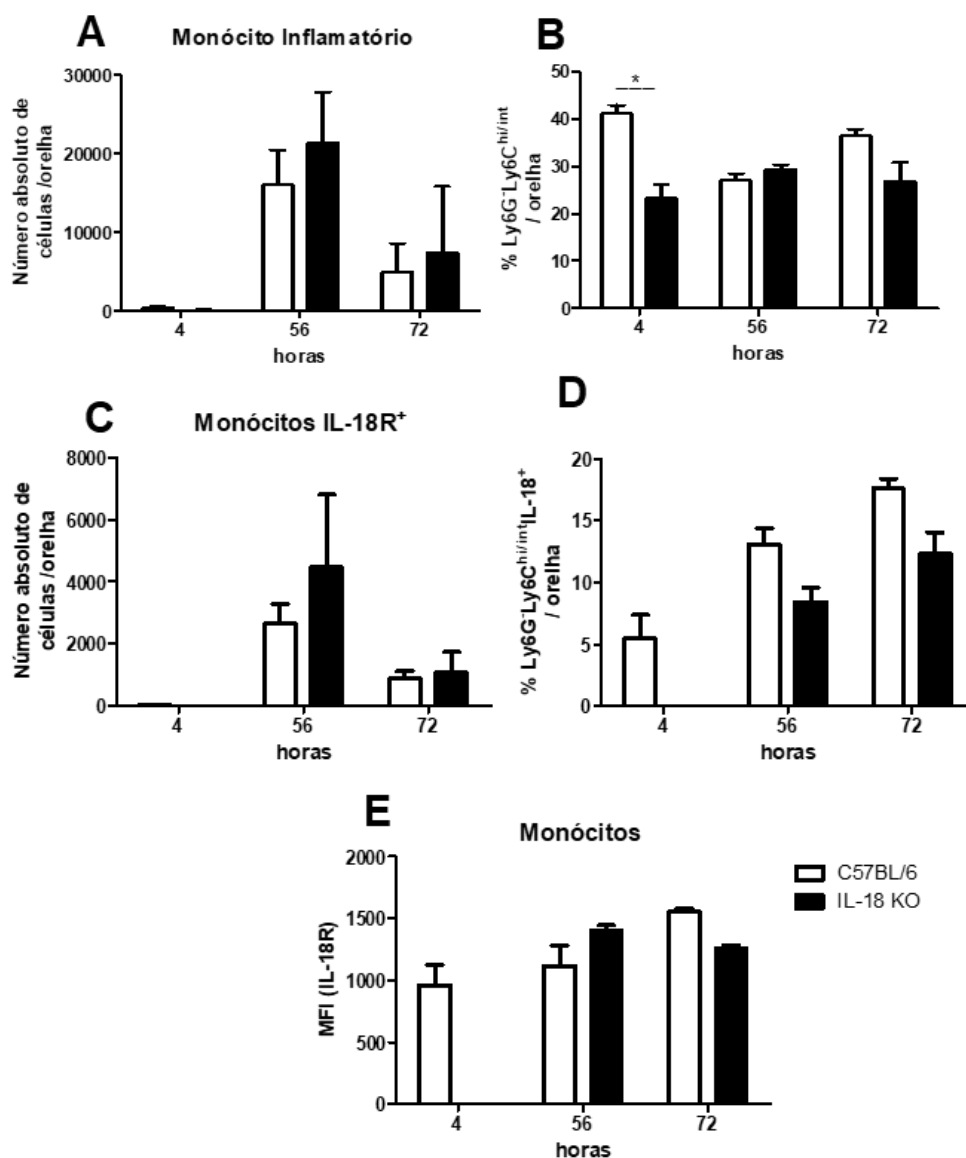


Figura 27 Avaliação dos monócitos inflamatórios presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina. Os camundongos foram desafiados com de 10 μ l de λ -carragenina a 1% p/v em salina 0,9% por via intradérmica na orelha esquerda. Após quatro, cinquenta e seis e setenta e duas horas de desafio os animais foram mortos e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. Analisamos o número absoluto de células representados pelo *gate* F4/80⁺MHCII^{int}, que chamamos de macrófagos (A), assim como a sua frequência (B). Analisamos o número absoluto (C) e a frequência (D) dos macrófagos IL-18R⁺ e também a expressão desse receptor nessa população de células (E). Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=4 a 5). Análise estatística feita pelo teste *t* de Student para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.3.4 Avaliação do perfil dos macrófagos presente no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO no modelo de inflamação induzida por λ -carragenina

Analisando a população de macrófagos, encontramos uma maior quantidade de macrófagos na lesão dos animais IL-18 KO na quinquagésima sexta hora após o desafio (**Figura 28 A**), mas a mesma frequência quando comparado com o perfil nos animais selvagens nos três tempos analisados (**Figura 28 B**). Analisamos, também, a presença de macrófagos que apresentassem o receptor da IL-18 e encontramos uma baixa quantidade de células, exceto nos animais IL-18 KO na quinquagésima sexta hora, em que encontramos uma grande quantidade dessas células IL-18R⁺ (**Figura 28 C**). Encontramos mais de 50% de macrófagos IL-18R⁺ em todos os tempos analisados e nas duas linhagens de animais (**Figura 28 D**), além de um perfil de MFI uniforme em todos os tempos analisados (**Figura 28 E**). Mais uma vez, em nossos dados com *Leishmania amazonensis*, não encontramos macrófagos que expressassem o receptor da IL-18. Mais do que isso, em experimentos *in vitro* utilizando macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 e com estímulos específicos, não verificamos a presença do receptor da IL-18 (Sousa *et al.*, 2015). Porém, na inflamação induzida pela λ -carragenina, a expressão parece ser bastante consistente.

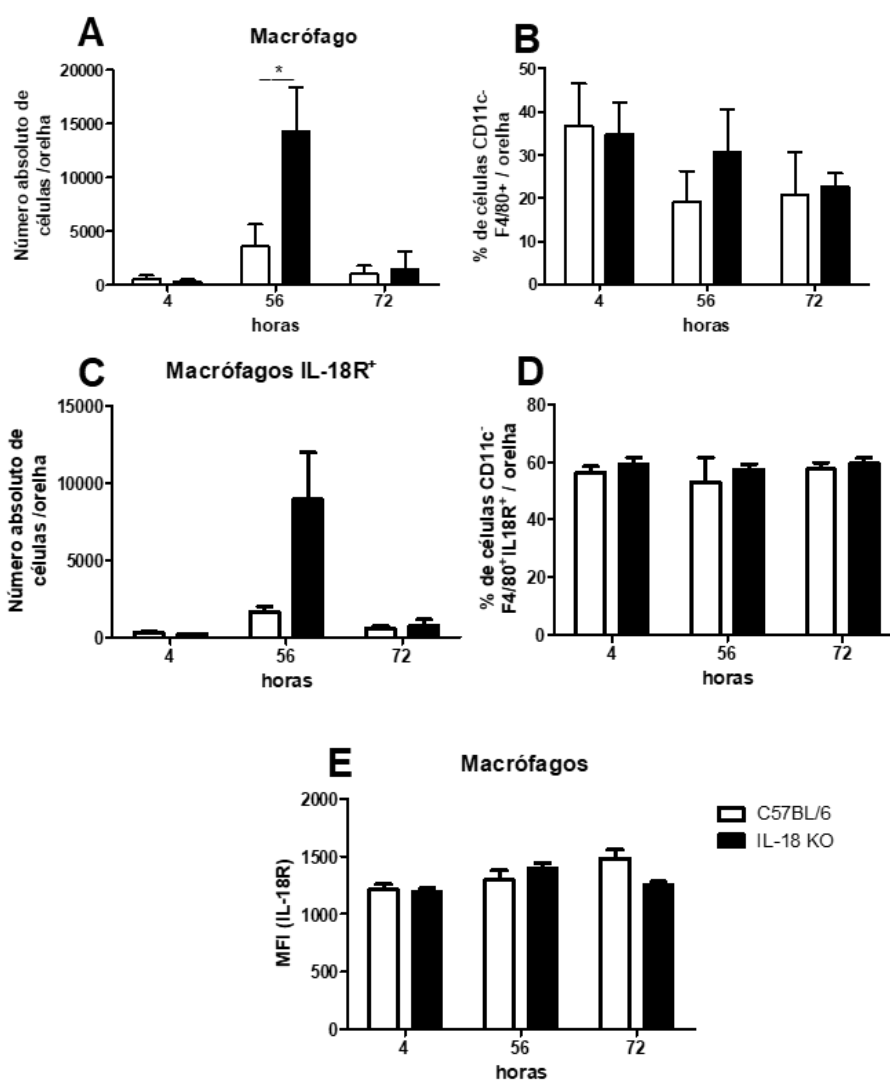


Figura 28 Avaliação dos macrófagos presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina. Os camundongos foram desafiados com de 10 μ l de λ -carragenina a 1% p/v em salina 0,9% por via intradérmica na orelha esquerda. Após quatro, cinquenta e seis e setenta e duas horas de desafio os animais foram mortos e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. Analisamos o número absoluto de células representados pelo *gate* CD11Ly6G-Ly6C^{Hi/int}, que chamamos de monócitos inflamatórios (A), assim como a sua frequência (B). Analisamos o número absoluto (C) e a frequência (D) dos monócitos inflamatórios IL-18R⁺ e também a expressão desse receptor nessa população de células (E). Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=4 a 5). Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.3.5 Avaliação do perfil das células dendríticas presente no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO no modelo de inflamação induzida por λ -carragenina

Ao analisarmos a população de células dendríticas, encontramos a mesma quantidade dessas células entre os animais IL-18 KO e os animais selvagens em todos os tempos analisados, sendo que quase não encontramos essa população na quarta hora após o desafio com λ -carragenina (**Figura 29 A**). Encontramos uma maior frequência de células dendríticas nos animais selvagens na septuagésima segunda hora após o desafio, momento em que as lesões já estão regredindo (**Figura 29 B**). Ao analisarmos a presença do receptor da IL-18, quase não encontramos células IL-18R⁺ na quarta hora após o desafio, visto que apenas cerca de 15% das células dendríticas expressam o receptor da IL-18 nesse tempo e a quantidade de células já era pequena. Houve um aumento da quantidade de células dendríticas IL-18R⁺ nos tempos mais tardios, assim como um aumento na frequência dessas células na septuagésima segunda hora (**Figura 29 C e D**). Com relação a expressão do receptor da IL-18, encontramos um alto MFI nas células dendríticas em todos os tempos analisados, sendo constante até a septuagésima segunda hora após o desafio (**Figura 29 E**).

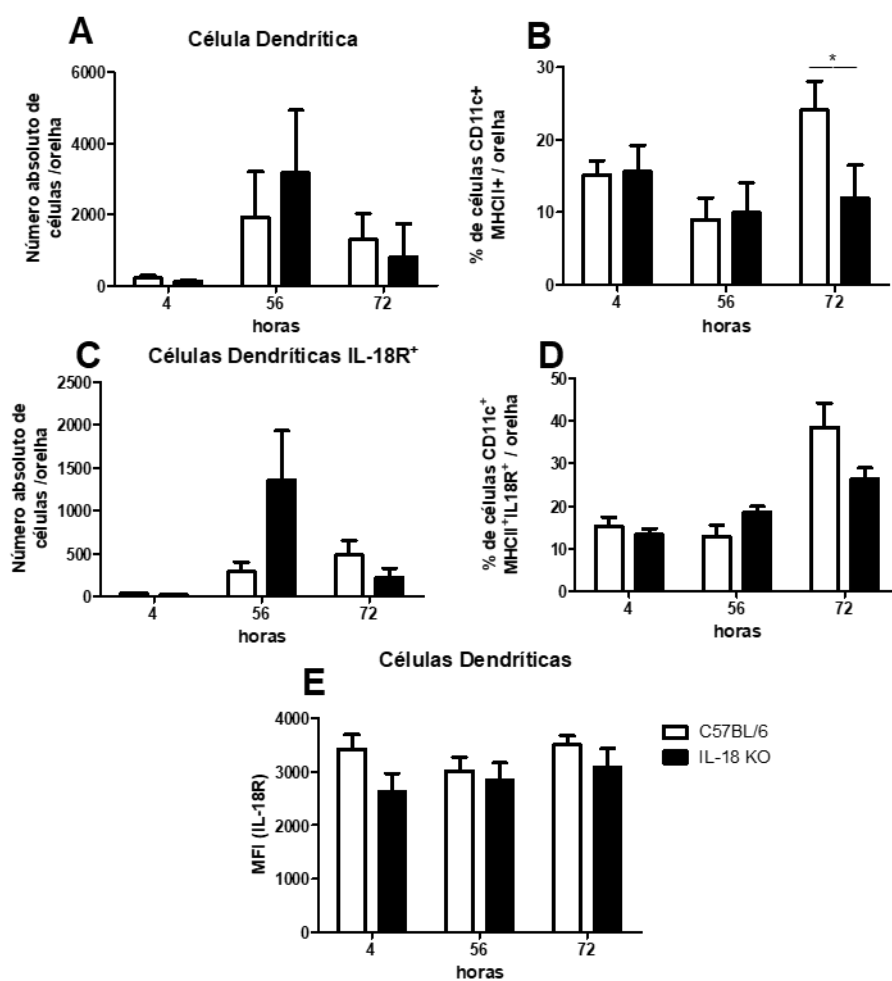


Figura 29 Avaliação das células dendríticas presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina. Os camundongos foram desafiados com de 10 μ l de λ -carragenina a 1% p/v em salina 0,9% por via intradérmica na orelha esquerda. Após quatro, cinquenta e seis e setenta e duas horas de desafio os animais foram mortos e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. Analisamos o número absoluto de células representados pelo *gate* CD11c⁺MHCII^{hi}, que chamamos de células dendríticas (A), assim como a sua frequência (B). Analisamos o número absoluto (C) e a frequência (D) das células dendríticas IL-18R⁺ e também a expressão desse receptor nessa população de células (E). Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=4 a 5). Análise estatística feita pelo teste *t de Student* para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

4.3.6 Avaliação do perfil dos neutrófilos presente no infiltrado inflamatório das lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO no modelo de inflamação induzida por λ -carragenina

Ao analisarmos a quantidade de neutrófilos, encontramos quantidades similares entre as linhagens em todos os tempos analisados e um pico da presença dessas células na lesão na quinquagésima sexta hora, pico da lesão dos animais (**Figura 30 A**). Porém, a frequência dessas células permaneceu o mesmo em todos os tempos analisados (**Figura 30 B**). Ao contrário do que verificamos em nosso modelo de infecção por *Leishmania amazonensis*, em que não verificamos uma expressão significativa de IL-18R nos neutrófilos (**APÊNDICE – Figura 6 D**), verificamos que os neutrófilos, no modelo de inflamação induzida por Carragenina expressam o receptor da IL-18 e mantem essa expressão durante todos os tempos analisados (**Figura 30 C e D**). Além disso, ao analisarmos o MFI do IL-18R, verificamos uma alta expressão do receptor da IL-18 nos neutrófilos em todos os tempos analisados, sendo cerca de três vezes mais do que o MFI das outras populações celulares analisadas anteriormente (**Figura 30 E**). Sendo assim, apesar do animal IL-18 KO apresentar um robusto infiltrado inflamatório, inclusive com uma maior população de macrófagos, este animal continua a apresentar uma menor lesão na orelha quanto comparado com o animal selvagem. Segundo dados anteriores do nosso grupo, diferentemente do modelo de infecção pela *Leishmania amazonensis* em que encontramos diferenças no infiltrado inflamatório (**Dados não mostrados**). Em um quadro de inflamação aguda, parece que o mecanismo de atuação da IL-18 seria diferente (Rathinam e Chan, 2018). Além disso, encontramos em todas as populações analisadas a presença do receptor da IL-18 no modelo de inflamação induzida pela λ -carragenina. Porém, esses mesmos tipos celulares no modelo de infecção por *Leishmania amazonensis* ou expressavam muito pouco ou não expressavam o receptor, como o caso dos monócitos e macrófagos.

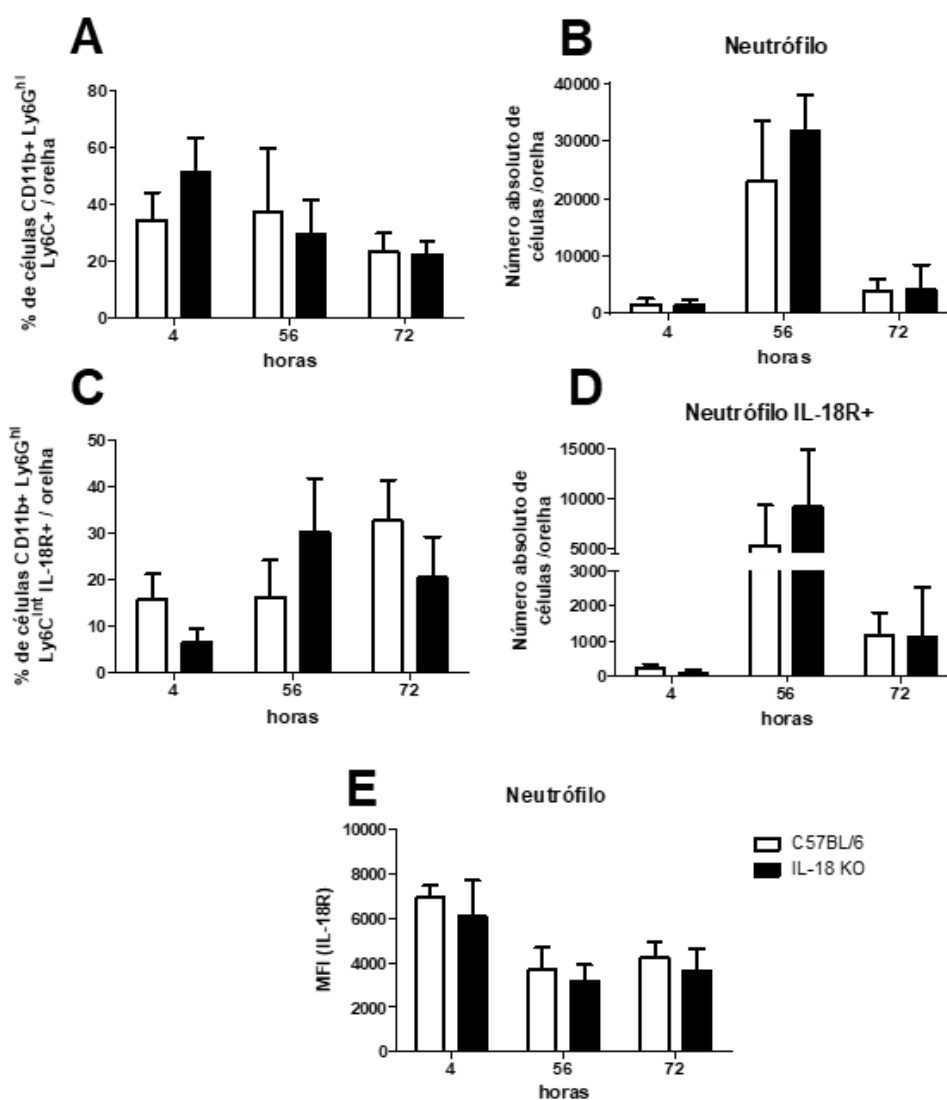


Figura 30. Avaliação dos neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens e IL-18 KO desafiados com λ -carragenina. Os camundongos foram desafiados com de 10 μ l de λ -carragenina a 1% p/v em salina 0,9% por via intradérmica na orelha direita e PBS na orelha. Após quatro, cinquenta e seis e setenta e duas horas de desafio, os animais foram mortos e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. Analisamos o número absoluto de células representados pelo *gate* CD11b⁺Ly6G^{hi}Ly6C^{int}, que chamamos de neutrófilos. Analisamos o número absoluto dessas células na lesão dos animais (A) e a frequência (B). Analisamos também a quantidade de neutrófilos IL-18R⁺ (C), a frequência dessas células (D) e a expressão do IL-18R (E). Este é o resultado representativo de dois experimentos (n=4 a 5). Análise estatística feita pelo teste *t* de Student para determinar as diferenças entre dois grupos (* p<0,05).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, durante a infecção pela *L. amazonensis*, nós observamos que os efeitos da ausência ou presença da IL-18 aparecem de forma mais tardia, a partir da quarta semana de infecção. Os animais não apresentam diferenças na quantidade de parasitos; mas apresentam diferenças no tamanho das lesões e no perfil das populações de células T CD4⁺. A quarta semana de infecção no animal WT parece ser um momento importante para a definição do perfil da lesão. Nesse momento, temos o pico da produção da IL-18, aumento da expressão do receptor da IL-18 nas células T CD4⁺. Além disso, é na quarta semana que a lesão começa a aumentar e encontramos células IL-4⁺ na lesão dos animais e células IFN- γ ⁺ nos linfonodos drenantes. Esse cenário com IL-18 e células CD4⁺ responsivas a essa citocina parecem ser importantes para a manutenção de uma lesão progressiva nos animais. Caso façamos a retirada das células T CD4⁺ na quarta semana, mesmo após o término do tratamento com anticorpo e retorno das células para a lesão, a lesão continuará menor do que a dos animais que não sofreram a retirada dessa população de células.

Ao estudarmos o papel da IL-18 nos modelos experimentais na literatura, nos deparamos com vários modelos de patogenias crônicas em que a IL-18 age diretamente. Na artrite induzida pela IL-18, há um aumento do IFN- γ e outras citocinas inflamatórias, assim como o aumento do infiltrado inflamatório e, conseqüentemente, aumento da erosão da cartilagem das articulações (Leung, B.P. *et al.*, 2001). Encontra-se, também, a associação dos níveis de IL-18 no plasma com a exacerbação da patologia e inflamação em pacientes com dengue, leptospirose e febre entérica (Michels *et al.*, 2015). A IL-18 participa da mediação dos níveis de IL-1 e influencia no desenvolvimento de disfunção cardíaca, pois leva ao aumento dos níveis de IFN- γ , que ativa macrófagos, de maneira que há aumento do dano no tecido cardíaco, levando ao aumento da formação de tecido fibroso (Toldo *et al.*, 2014). Ela está relacionada, também, com a piora do quadro de enfisema pulmonar de pacientes fumantes, também pelo aumento de tecido fibroso causado pela destruição do tecido saudável pelos macrófagos ativados pelo IFN- γ (Kratzer *et al.*, 2013). A IL-18 está associada com a piora de quadros de psoríase, pois está relacionada ao aumento da quantidade de células Th1 e Th17 nas lesões (Ohta *et al.*, 2001; Companjen *et al.*, 2004a), já demonstrando que a IL-18 tem certa influência em doenças de pele. Ao analisarmos a IL-18 em protozooses como a doença de Chagas, há indícios de que certos polimorfismos no gene que codifica a IL-18 em humanos estão associados diretamente com a suscetibilidade a infecção por *Trypanosoma cruzi* (Nogueira *et al.*, 2015; Leon

Rodriguez *et al.*, 2016). Em modelos murinos, a IL-18 parece induzir diretamente a miocardite em camundongos infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2014).

Como a IL-18 tem um papel importante no desenvolvimento de diversas patologias crônicas, como em algumas doenças de pele, decidimos estudar o seu papel em um modelo de protozoose crônica com uma lesão cutânea: o modelo de leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania amazonensis*. Ao trabalharmos com modelos de infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania*, há de se preocupar com a forma com que a infecção será feita: se pela via natural, utilizando o vetor infectado, ou pela via artificial, utilizando quantidade de parasito controlada e inóculo com agulha. Nos modelos em que se opta pela infecção utilizando o vetor, não há o controle da quantidade de parasitos, que, em sua maioria, são poucos, menos de 600 parasitos (Kimblin *et al.*, 2008). Nesse modelo, juntamente com os parasitos, há o inóculo do gel a base de proteofosfoglicanos, presente no terço distal do tubo digestório do vetor, além de saliva. Esses componentes também geram resposta inflamatória e influenciam no curso da lesão nos animais (Belkaid *et al.*, 2000; Luz *et al.*, 2018). Por exemplo, já foi demonstrado que componentes da saliva dos flebotomíneos participam no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (Peters *et al.*, 2008; Coutinho-Abreu *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que a microbiota do vetor também influencia na inflamação no foco da infecção, aparentemente via ativação do inflamassoma (Dey *et al.*, 2018). Porém, há diversos fatores que dificultam a utilização desse modelo, como a manutenção dos insetários, o controle da quantidade de parasitos inoculados e o sucesso da infecção (Kimblin *et al.*, 2008). Um modelo mais amplamente utilizado é o da infecção feita pelo inóculo de uma quantidade controlada de parasitos utilizando agulha. Nas décadas de 1980 e 1990, a via de inóculo predominante era via subcutânea, sendo a infecção feita na pata. Porém, com o tempo, a via de infecção intradérmica, sendo o inóculo feito na orelha, foi ganhando espaço nos estudos. Isso ocorreu, pois durante a infecção natural no ato do repasto sanguíneo feito pelos vetores, os parasitos são inoculados na camada intradérmica e não na camada subcutânea, ou seja, a via de infecção intradérmica reflete melhor as condições naturais de infecção (Sacks e Melby, 2001).

Para os nossos experimentos preferimos utilizar a via intradérmica; porém, esbarramos em uma outra questão: a quantidade de parasitos. Alguns defendem que quantidades menores do que 1000 parasitos é o ideal, pois se assemelha mais à quantidade das infecções naturais. Porém, há outros fatores que influenciam na infecção, como os citados anteriormente, que auxiliam a geração de uma resposta inflamatória robusta. Para definirmos a quantidade de parasitos, infectamos nossos animais com quatro quantidades diferentes de promastigotas

metacíclicas de *L. amazonensis*: 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 . Verificamos que há um atraso do fenômeno, no caso a diferença entre as lesões dos animais selvagens e deficientes para a IL-18, nas quantidades menores ou iguais a 1000 metacíclicas. Porém, em quantidades muito altas, como 10^5 ou mais, há uma resposta exacerbada e uma lesão muito grande, o que pode afetar a interpretação do fenômeno. Esse atraso da lesão e resposta imune mais branda em quantidades menores de parasitos e exacerbção da resposta em quantidades maiores já foi verificado outras vezes em modelos de infecção por *Leishmania* (Cortes *et al.*, 2010; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2014). Ao analisarmos a quantidade de parasito na lesão dos animais, apenas na infecção com 10^3 promastigotas de *L. amazonensis* é que o animal IL-18 KO apresentou menor quantidade de parasitos, o que coincide com achados anteriores do nosso grupo (Sousa *et al.*, 2015). Nesse trabalho do nosso grupo, foi demonstrado que os animais IL-18 KO apresentaram menor atividade de arginase nas lesões quando comparados com os animais selvagens. Dentre todas as quantidades de parasitos que utilizamos, apenas na infecção feita com 10^3 parasitos é que encontramos menor quantidade de parasitos na lesão e no linfonodo drenante dos animais IL-18 KO. A IL-18 é uma indutora da produção de IFN- γ e já foi demonstrado que o IFN- γ tem a capacidade de induzir a expressão do Transportador de Aminoácidos Catiônicos 2B (CAT2B) em macrófagos, sendo que o CAT2B é um transportador da L-arginina. Essa L-arginina pode ser utilizada pelos parasitos para a produção de poliaminas para o seu crescimento (Mantovani *et al.*, 2004; Wanasen *et al.*, 2007; Carroll *et al.*, 2008). Talvez por isso no animal WT haja mais parasitos do que animal IL-18KO, mas ainda não é claro do porquê desse fenômeno acontecer apenas na infecção feita com 10^3 parasitos. Alguns trabalhos definem a quantidade de 10^4 como ideal, pois gera uma resposta imunológica robusta e não há uma quantidade muito grande de parasitos no inóculo, sendo amplamente utilizada (Lima-Junior *et al.*, 2013; Carneiro, M.B. *et al.*, 2015; Seyed *et al.*, 2018). Por esse motivo, escolhemos continuar os experimentos fazendo as infecções com 10^4 promastigotas metacíclicas da *L. amazonensis*.

Ao analisarmos a produção da IL-18 durante a infecção, encontramos o pico da produção de IL-18 na quarta semana, o que coincide com a exacerbção da diferença entre a lesão do camundongo selvagem e do camundongo IL-18 KO. Ou seja, temos o aumento da lesão nos animais selvagens juntamente com o aumento do nível da IL-18. O aumento de IL-18 está associado a diversas condições patológicas. Em um trabalho que investigou os níveis de IL-18 a fim de correlacioná-los com a presença do adenocarcinoma de pâncreas, mostrou-se que a IL-18 está aumentada em pacientes com adenocarcinoma de pâncreas e em pacientes não responsivos à quimioterapia (Usul *et al.*, 2017). Também foi publicado um trabalho que

demonstrou uma correlação entre os níveis aumentados da IL-18 livre, já que analisaram a presença da IL-18 e da IL-18BP, com o diagnóstico positivo para síndrome de Sjögren (Liuqing *et al.*, 2017). Também foi encontrada correlação entre o diagnóstico positivo para a miocardite viral com altos níveis da IL-18 no soro dos pacientes (Wang *et al.*, 2016). Em uma meta-análise feita a partir dos trabalhos com pacientes com cirrose hepática, foi encontrada correlação entre altos níveis da IL-18 com o diagnóstico da doença (Puthumana *et al.*, 2016). Ou seja, o aumento dos níveis da IL-18 está associado a diversas patologias, eventualmente com o agravamento dos processos inflamatórios, inclusive em doenças de pele como a psoríase, em que a IL-18 parece estar associada à estimulação de células dendríticas a produzirem IL-23, que, juntamente com a IL-18, induz células Th17 e células T $\gamma\delta$ a produzirem IL-17. Isso leva a um agravamento das lesões de psoríase (Nakano *et al.*, 2003; Companjen *et al.*, 2004a; Inoue *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015; Aira *et al.*, 2018).

A *L. amazonensis* demora cerca de oito dias para se diferenciar em amastigota e a se replicar de maneira expressiva no hospedeiro mamífero, mas, mesmo com o crescimento lento, o parasito consegue evadir as respostas imunes e se estabelecer (Courret *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2004). Ao analisarmos o curso de infecção nos primeiros sete dias e a produção de citocinas, não encontramos diferenças na produção das citocinas IFN- γ , TNF e IL-12p70, assim como não encontramos diferenças no tamanho das lesões e na quantidade de parasitos nas lesões e nos linfonodos drenantes entre os camundongos selvagens e IL-18 KO. Talvez nesse momento em que o parasito está se estabelecendo no novo hospedeiro, não haja a formação de uma resposta inflamatória consistente e robusta, o que se reflete na lesão ainda bastante pequena.

A infecção pela *L. amazonensis* difere das infecções pelas outras espécies de *Leishmania*. Os modelos murinos, que em sua maioria são suscetíveis à infecção por *L. amazonensis*, desenvolvem lesões duradoras, formação de um vacúolo parasitóforo grande e com mais de um parasito e manutenção de uma carga de parasitos alta (Soong *et al.*, 1997). Uma outra característica das infecções nos modelos murinos pela *L. amazonensis* é que esse fenótipo de suscetibilidade não está relacionado à formação de uma população de células Th2 ou Th1, mas sim uma ativação de células T CD4⁺, relacionadas a um perfil Th1, mas capazes de produzir IFN- γ , IL-10 e IL-17, o que gera um ambiente inflamatório mais complexo do que o balanço IL-4/Th2 e IFN- γ /Th1 encontrado na infecção por *L. major* (Xin *et al.*, 2007). Nossos achados também demonstram um papel crucial das células T CD4⁺ na manutenção das lesões na infecção por *L. amazonensis*. Observamos em nossos resultados que a expressão do receptor da IL-18 ocorre de maneira significativa após a quarta semana de infecção, o que coincide com

o aumento da diferença entre as lesões dos animais selvagens e IL-18 KO e com o pico de produção de IL-18. Já é sabido que as células T CD4⁺ expressam receptor de IL-18 e que, como mostrado no trabalho de Soong e colaboradores (1997), as células T CD4⁺ desempenham um papel crucial na patogênese da infecção por *L. amazonensis*. Nesse trabalho relacionou-se a presença da população de células CD4⁺ com a formação da lesão nos animais C57BL/6, sendo que, provavelmente, essa população é relacionada ao perfil Th1. Ao fazermos a depleção das células T CD4⁺ em nosso modelo, identificamos a diminuição das lesões dos camundongos C57BL/6. O que nos intrigou nesse dado foi que, ao depletarmos as células T CD4⁺ dos animais selvagens e dos animais deficientes para a IL-18, os dois animais tiveram a diminuição da lesão durante o tratamento, provavelmente devido à diminuição do número de células na lesão. Após o fim do tratamento na sexta semana de infecção, os animais selvagens mantiveram as lesões menores do que a dos animais selvagens tratados com IgGs não relacionadas; porém, as lesões dos animais IL-18 KO aumentaram e se igualaram às lesões dos animais IL-18 KO tratados com IgGs. Dados do nosso grupo já haviam demonstrado, em um modelo de infecção por *L. amazonensis* na pata, que a depleção das células T CD4⁺ leva à diminuição da lesão. Porém, foi encontrada menor quantidade de parasitos nos animais depletados (Carneiro, M. B. *et al.*, 2015) e a depleção das células T CD8⁺ não alterou o curso de infecção (dados não publicados). Em um modelo de infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, a depleção das células T CD4⁺ também gerou uma menor lesão (Silva *et al.*, 1994). Então, qual seria o papel da IL-18, das células T e suas ações em conjunto no desenvolvimento de lesões cutâneas?

A nossa hipótese é de que nesse momento, entre a terceira e quarta semana de infecção, a ativação das células T CD4⁺ pela IL-18 é importante para a manutenção de um balanço inflamatório essencial para a manutenção da lesão, visto que a IL-18 tem a capacidade de induzir perfis Th1, Th2 e Th17 (Nakanishi *et al.*, 2001). Por muito tempo se discutiu sobre o paradigma Th1/Th2 e de como, por exemplo, na infecção por *L. major* o balanço com mais células Th1 do que células Th2 estava associado à resistência e um balanço com mais células Th2 do que células Th1 estava associado à suscetibilidade (Scott e Novais, 2016). Nas últimas décadas, a plasticidade e complexidade da resposta mediada por células T foi sendo descoberta e a dicotomia Th1/Th2 não é mais suficiente para explicar a inflamação. Foram descritas, então, outras populações como as células Th17/Treg. Por exemplo, no caso da psoríase, as lesões e a inflamação estão relacionados a uma maior quantidade de células Th1 e Th17 e uma pequena quantidade de células Th2 e Treg (Belge *et al.*, 2014). No caso da asma, já foi reportado que o aumento da gravidade da inflamação nos pulmões está relacionado tanto com uma maior

quantidade de células Th2 como de células Th17 e menor quantidade de células Th1 e Treg (Wilson *et al.*, 2009; Alcorn *et al.*, 2010). Já a população de células Treg está associada à mediação da inflamação, prevenção de doenças autoimunes e geração de tolerância (Piccirillo *et al.*, 2008; Ohkura *et al.*, 2013). Ao aumentar a quantidade de células Treg em relação às outras populações de células T e, conseqüentemente, ocorrer o aumento da IL-10, há ativação de macrófagos em um perfil que está associado ao reparo tecidual (King *et al.*, 2014; Wynn e Vannella, 2016). Ou seja, o balanço entre as quantidades de células Th1, Th2, Th17 e Treg estão associados à patogenicidade ou ao controle da inflamação. Em nossos experimentos, resolvemos, então, modificar o balanço entre as populações Th1, Th2, Th17 e Treg ao depletarmos as células T CD4⁺ a partir da terceira semana de infecção até a sexta semana de infecção. Ao retirarmos essas células T CD4⁺ na quarta semana de infecção, mesmo que elas retornem após a remoção do anticorpo do sistema, a lesão dos animais C57BL/6 continuou menor do que a dos animais tratados com IgG. No caso dos animais que sofreram a depleção, o balanço entre as células Th1, Th2, Th17 e Treg já foi alterado, e no caso dos animais C57BL/6, parece ser suficiente para impedir o desenvolvimento progressivo da lesão, mesmo não alterando a quantidade de parasitos. Já o animal deficiente para a IL-18, como as suas células T CD4⁺, nunca entraram em contato com a IL-18; a retirada dessas células na quarta semana de infecção apenas atrasou o desenvolvimento da lesão. Ao analisarmos os perfis de células T CD4⁺, relacionando as células T-bet⁺ com o perfil Th1, as células Gata3⁺ com o perfil Th2, as células RorγT⁺ com o perfil Th17 e as células Foxp3⁺ com as células reguladoras (Zhou *et al.*, 2009; Luckheeram *et al.*, 2012), verificamos que, após o tratamento com anti-CD4⁺, quando as células CD4⁺ já retornaram, os animais deficientes para a IL-18 apresentaram uma maior quantidade de células T-bet⁺ na orelha, se compararmos com a quantidade dessas células na orelha do animal tratado com IgG. Ou seja, houve um aumento da quantidade de uma população de células em um perfil Th1 na lesão dos animais KO que foram tratados com Gk1.5. Com relação à população Gata3⁺, encontramos um aumento dessa população nos animais selvagens e IL-18 KO que foram tratados com Gk1.5, tanto na lesão quanto nos linfonodos. Isso, também, após uma semana depois do último tratamento. O animal IL-18 KO que foi tratado com Gk1.5 apresentou um aumento dos perfis de células Th1 e Th2 na orelha após a remoção do anticorpo do sistema. Talvez isso explique o retorno da lesão desses animais ao mesmo patamar da lesão dos animais KO tratados com IgG. Notamos o aumento, também, de células Th17 na lesão dos animais C57BL/6 e IL-18 KO, que foram tratados com anti-CD4. Ou seja, após a depleção, quando já havia passado uma semana do último tratamento e as células CD4⁺ já retornavam para a lesão, temos na lesão do animal IL-18 KO uma maior população de células Th1, Th2 e

Th17 e sem alterações na população de células reguladoras. Já o animal selvagem tratado com anti-CD4, uma semana depois do último tratamento, apresentou um aumento na quantidade de células Th2 e Th17 na lesão quando comparado com o animal selvagem tratado com IgG, além de apresentar uma tendência ao aumento da população de células reguladoras. Ou seja, a retirada das células T CD4⁺ nesse momento da infecção acarreta uma mudança no balanço das células Th1, Th2, Th17 e Treg na lesão dos animais, tanto dos animais selvagens quanto dos animais deficientes para a IL-18. Entretanto, essa mudança não foi capaz de manter a lesão dos animais KO menores que a dos animais KO tratados com IgG. Já a mudança do perfil de células no animal selvagem tratado com anti-CD4 foi capaz de diminuir e manter a lesão menor do que a do animal tratado com IgG, pelo menos até a oitava semana de infecção. Em um trabalho bastante elegante em um modelo de infecção pelo *T. cruzi*, demonstrou-se que a retirada do sinal via IL-18R das células T CD4⁺ diminuiu a frequência e número de células Th1, mas não afetou a quantidade e frequência das populações de células T CD8⁺, sendo que a transferência adotiva de células T CD4⁺ de animais selvagens para animais IL-18r1 KO aumentou a resistência destes à infecção (Oliveira *et al.*, 2017).

Já ao olharmos mais atentamente para o perfil das células T CD4⁺ nos animais tratados com IgG para verificarmos as diferenças entre os animais IL-18 KO e WT, verificamos que o animal selvagem apresenta uma maior quantidade de células Th1 na quarta semana de infecção no linfonodo drenante e uma maior quantidade na sétima semana de infecção na lesão quando comparado com o animal IL-18 KO. O animal selvagem também apresenta maior quantidade de células Th2 e Th17 do que o animal KO. Com relação às células Treg, não há diferenças na quantidade entre os animais selvagens e os animais IL-18 KO. Ao verificarmos as citocinas na quarta semana de infecção, observamos que os animais selvagens apresentam mais células T CD4⁺ e células TCRβ⁻ IL-4⁺ na lesão e mais células T CD4⁺ e células TCRβ⁻ IFN-γ⁺ no linfonodo drenante do que os animais IL-18 KO. Ou seja, a ausência da IL-18 parece acarretar a manutenção de um ambiente com menos células Th1, Th2 e Th17 na lesão e uma menor presença de células produtoras de IL-4 e IFN-γ, o que faz bastante sentido, visto que a IL-18 participa do aumento dessas populações celulares (Carroll *et al.*, 2008). O que é interessante é que, no caso da infecção por *L. amazonensis*, a IL-18 parece aumentar simultaneamente tanto populações Th1 quanto populações Th2; no caso da quarta semana de infecção, isso ainda acontece de forma particionada. Aparentemente, esse ambiente mais inflamatório do animal selvagem para a IL-18 é suficiente para promover a manutenção da lesão, mas não para eliminar o parasito. Assim, temos um ambiente danoso, sem resolução da infecção. No caso do animal

KO, observamos um ambiente ainda incapaz de eliminar o parasito, mas menos danoso para o tecido, o que acarretaria a lesão menor. Mas caso alteremos o balanço, por exemplo, depletando a IL-10 desses animais, a lesão se exacerba. Além disso, as células que foram primadas pela IL-18, se transferidas para o animal IL-18 KO, parecem, também, alterar o balanço da resposta inflamatória, acarretando, igualmente, na exacerbação da lesão. Esse fenômeno não foi observado quando o animal IL-18 KO foi tratado com as células do linfonodo dos animais também deficientes para a IL-18. Ao analisarmos as lesões em comparação com os animais não tratados, percebe-se que as lesões dos animais que receberam células do animal selvagem ou células do animal IL-18 KO juntamente com o anticorpo anti-IL-10R têm tamanho similar quando comparadas às lesões dos camundongos selvagens sem tratamento. A presença da IL-18 parece estar relacionada à piora das lesões de camundongos no modelo de psoríase (Shimoura *et al.*, 2017), assim como no modelo de dermatite atópica (Zedan *et al.*, 2015). Aparentemente, em nosso modelo, as células do linfonodo drenante que foram ativadas em um ambiente com IL-18 já foram capazes de provocar a piora da lesão dos animais IL-18 KO tratados. De maneira interessante, ao alterarmos o balanço da resposta inflamatória dos animais deficientes para a IL-18 pelo tratamento com anti-IL-10R, também ocorreu a piora da lesão dos animais. Esses experimentos são importantes, pois definimos como está o perfil de ativação das células T durante a infecção pela *L. amazonensis* nos camundongos C57BL/6, assim como está o perfil das células IL-4⁺, IFN- γ ⁺, IL-10⁺ e IL-17⁺. Nos camundongos deficientes para a IL-18, verificamos que a alteração desse perfil, mesmo que incapaz de alterar a quantidade de parasitos, foi suficiente para provocar uma lesão menor e, como mostrado na histologia, uma distribuição diferente do infiltrado inflamatório nas lesões. Ao alterarmos esse ambiente nos animais deficientes para a IL-18, seja colocando células do linfonodo dos camundongos WT, seja retirando a possibilidade de sinal via IL-10, conseguimos aumentar a lesão desses animais. Há muito se discute acerca dos perfis de células T (Murphy e Stockinger, 2010) e da importância do mapeamento desses perfis nos modelos de diversas patologias, como na leishmaniose (Nylen e Gautam, 2010; Scott e Novais, 2016), na psoríase (Quaglino *et al.*, 2011) e no lúpus (Talaat *et al.*, 2015).

No animal WT, quase 85% das células CD4⁺ no linfonodo drenante estão no perfil Th1 na quarta semana de infecção e mais de 20% dessas células são CD4⁺IFN- γ ⁺. Perfil que não encontramos nos animais IL-18 KO, já que neles cerca de 70% das células CD4⁺ no linfonodo drenante são do perfil Th1 e apenas 0,2% são CD4⁺IFN- γ ⁺. Soong e colaboradores já haviam descrito que as células CD4⁺ estão ligadas ao desenvolvimento das lesões nos animais C57BL/6

infectados pela *L. amazonensis* e que essas células seriam do perfil Th1. Em nosso modelo, adicionamos, então, a informação de que a IL-18 parece estar envolvida na formação dessa população de células Th1, mas, mais do que comprometida com a proliferação de uma população T-bet⁺, comprometida com uma população CD4⁺IFN- γ ⁺. A manutenção dessa população e a formação de um balanço entre as populações Th1 (IFN- γ ⁺), Th2 (IL-4⁺), Th17 (IL-17⁺) e Treg (IL-10⁺) parecem estar envolvidas na manutenção de um ambiente propício para o desenvolvimento das lesões nos animais infectados.

Já no caso da carragenina, um modelo de inflamação aguda (Handy e Moore, 1998), a presença da IL-18 parece estar relacionada, também, à piora das lesões. A lesão, em nosso modelo, surge já nas primeiras horas, mas se diferenciam a partir da vigésima quarta hora, com pico na quinquagésima sexta. Após setenta e duas horas, as lesões começam a diminuir tanto nos animais WT como para os animais deficientes para a IL-18. Ou seja, mesmo em um modelo em que aparentemente há maior participação de células da imunidade inata, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Leung, B.P. *et al.*, 2001), a IL-18 parece modular o ambiente inflamatório em prol do aumento das lesões. Um dado bastante interessante e que nos levou a pensar na modulação da resposta inflamatória via regulação do receptor da IL-18 foi a presença do receptor da IL-18 nos monócitos inflamatórios, nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos. Como publicamos anteriormente, os macrófagos de C57BL/6 derivados de medula óssea, mesmo estimulados com IL-12 e IL-18, não expressam o receptor da IL-18 (Sousa *et al.*, 2015). Segundo dados anteriores do nosso grupo, ao analisarmos a expressão do receptor da IL-18 nas populações de células inflamatórias na infecção por *L. amazonensis*, não encontramos presença expressiva do receptor da IL-18 nos macrófagos, monócitos inflamatórios, neutrófilos e células dendríticas. Encontramos apenas o receptor nas células NK e células T CD4⁺ e CD8⁺, sendo que o dado mais interessante foi o da expressão nas células T CD4⁺, como mostrado. O interessante, ao analisar esses dados comparativamente, é que, no modelo de infecção, as células que são parasitadas pela leishmania, como os neutrófilos, macrófagos, monócitos e células dendríticas (Liu e Uzonna, 2012; Ribeiro-Gomes e Sacks, 2012; Romano *et al.*, 2017) não apresentaram o receptor da IL-18, mas as células não parasitadas apresentaram. Já no modelo inflamatório da carragenina, essas populações celulares que não apresentaram receptor da IL-18 na infecção por *L. amazonensis* apresentam o IL-18R. Isso nos levou a pensar se o parasito modula de alguma maneira a expressão desse receptor, a fim de regular a resposta inflamatória na lesão. Como já foi demonstrado, a *L. major* tem a capacidade de modular a expressão de receptores de CCL2 e CCL3 nas células dendríticas,

alterando, assim, a capacidade migratória dessas células para os linfonodos drenantes e para o sítio de infecção (Steigerwald e Moll, 2005).

O professor do departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, Helton Santiago, gentilmente nos cedeu os seus dados (**ANEXO**). Santiago utilizou os mesmos modelos que nós utilizamos, ou seja, infecção pelo parasito *L. amazonensis* (tanto na orelha como na pata) e inflamação induzida pela carragenina. Porém, ao invés de utilizar o camundongo C57BL/6, ele utilizou os camundongos BALB/c. Para a infecção na orelha, Santiago utilizou 10^3 formas promastigotas do parasito e encontrou uma menor lesão nos animais selvagens quando comparados com os animais deficientes para a IL-18. O mesmo foi encontrado no modelo de infecção na pata, agora utilizando 10^6 parasitos na fase estacionária. Fato bastante interessante encontrado por Santiago foi que os animais C57BL/6 IL-12 KO infectados na pata com *L. amazonensis* apresentaram maior lesão do que os animais selvagens e do que os animais IL-18 KO. Ou seja, em um ambiente sem IL-12 há exacerbação da lesão e em um ambiente sem IL-18 há diminuição da lesão.

No caso da infecção por *L. major*, o tratamento com a IL-18 recombinante estava associado à piora das lesões dos animais BALB/c e C57BL/6; porém, os animais C57BL/6 ainda conseguiam se curar em tempos mais tardios (Xu *et al.*, 2000). No nosso caso, independente do fundo genético dos animais, a IL-18 parece estar associada à piora das lesões, mas sem alterar a quantidade de parasitos, visto que nos experimentos com a infecção por *L. amazonensis* na pata e na orelha dos camundongos BALB/c, Santiago não encontrou diferença na quantidade de parasitos entre os animais WT e KO, mesmo tendo encontrado a diferença nas lesões. Este resultado está de acordo com o que observamos nos camundongos C57BL/6. Ao desafiar os camundongos BALB/c com carragenina, Santiago, mais uma vez, encontrou lesões aumentadas nos animais selvagens quando comparadas com a lesão nos animais IL-18 KO, porém, com o pico da lesão na vigésima quarta hora. Os animais que o professor Helton utilizou para os experimentos com carragenina foram cedidos pelo Centro de Bioterismo (CeBio) da UFMG. Já em nossos experimentos com carragenina, utilizamos animais SPF cedidos pelo Biotério central da UFMG.

Em nossos experimentos com camundongos C57BL/6 vindos do CeBio e desafiados com carragenina, o pico da lesão também aconteceu na vigésima quarta hora. Mais uma vez, independente do fundo genético do animal, seja no modelo de infecção pela *L. amazonensis* ou na indução de inflamação pela carragenina, a IL-18 parece estar associada à piora das lesões.

Por exemplo, o tratamento dos camundongos em um modelo de aterosclerose com a IL-18BP foi capaz de impedir a progressão da placa aterosclerótica (Mallat *et al.*, 2001), assim como houve diminuição da destruição da cartilagem em modelos murinos de artrite quando tratados com IL-18BP ou anti-IL-18, ou em camundongos deficientes para a IL-18 (Wei *et al.*, 2001; Haas *et al.*, 2006), sendo que, no caso da artrite, esse mecanismo parece ser independente do IFN- γ (Gracie *et al.*, 1999). Em modelos de lesão cerebral traumática, o tratamento com IL-18BP provocou recuperação neurológica avançada em 7 dias em comparação com os animais não tratados. Porém, não houve melhora do edema (Yatsiv *et al.*, 2002). Em um modelo murino de colite induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS), o tratamento com IL-18BP reduziu o dano na mucosa intestinal e reduziu o escore da colite (Ten Hove *et al.*, 2001). No modelo murino de linfo-histiocitose hemofagocítica, o tratamento com IL-18BP diminuiu os níveis de TNF e IFN- γ , assim como diminuiu o dano tecidual no baço e fígado dos animais tratados quando comparados com os que não receberam tratamento (Chiossone *et al.*, 2012). Ou seja, fica claro que o bloqueio da IL-18 tem se mostrado bastante eficaz em diminuir a inflamação e a patogenicidade em diversos modelos de estudo de processos patológicos.

Em nosso trabalho, fica claro, também, que a IL-18 parece ter um papel crucial na montagem de um ambiente inflamatório propício para o desenvolvimento das lesões na infecção por *L. amazonensis*, modulando a resposta inflamatória via células T CD4⁺. Mais interessante, aparentemente a influência da IL-18 parece ser tempo dependente, ou seja, para a manutenção da lesão, as células T precisam ser primadas pela IL-18 entre a terceira e quarta semana de infecção. Caso retiremos essas células nesse momento, a primagem ocorrerá em um tempo tardio e não será capaz, a curto prazo, de gerar um perfil de resposta que levaria ao aumento da lesão, como foi demonstrado nos animais C57BL/6 tratados com anti-CD4.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A IL-18 é uma citocina extremamente versátil, que consegue agir estimulando respostas inflamatórias com o envolvimento de diversos perfis celulares. Em nosso trabalho, mostramos que a produção da IL-18 tem seu pico no momento da exacerbação das lesões nos camundongos C57BL6. Além disso, nesse momento, temos o aumento da expressão da cadeia α do IL-18R nas células T CD4⁺ em relação aos outros tempos na infecção. Seriam, então, as células T CD4⁺ importantes para a manutenção da lesão?

Demonstramos que a retirada dessa população de células na quarta semana de infecção nos animais selvagens alterou o perfil do desenvolvimento da lesão, havendo a manutenção de uma lesão menor do que a do animal selvagem que não sofreu a depleção das células T CD4⁺. A outra questão era se a presença da IL-18 geraria um perfil de células T CD4⁺ diferente do perfil dos animais sem a IL-18. Mostramos, então, que, nos animais selvagens, há uma população robusta de células ligadas a um perfil predominantemente Th1 na quarta e oitava semana de infecção. Porém, se feita a depleção das células T CD4⁺, após a retirada do anticorpo do sistema e retorno das células, encontramos, na oitava semana de infecção, maiores quantidades de células no perfil Th2 e Th17 do que nos animais selvagens não depletados, o que veio acompanhado de uma lesão menor. Notamos, então, que mudanças nesse perfil, em que há um predomínio de células Th1 na quarta e oitava semana de infecção e um predomínio de IL-4 na orelha e de IFN- γ no linfonodo drenante na quarta semana de infecção, foi acompanhado de uma redução das lesões, como ocorreu nos animais selvagens depletados e como ocorre nos animais IL-18 KO. Algo interessante é que a transferência de células do linfonodo drenante dos animais selvagens para os animais IL-18 KO foi suficiente para o aumento das lesões. Nossos experimentos apontam, também, para novas perspectivas de investigação, por exemplo, na possibilidade de o parasito *L. amazonensis* modular a expressão do receptor da IL-18, conferindo, assim, ao parasito, a capacidade de orquestrar uma resposta inflamatória mais favorável para a sua replicação.

A IL-18 na infecção por *L. amazonensis* parece, então, modular a formação de uma população de células predominantemente Th1 e a produção de IL-4 e IFN- γ , promovendo a manutenção de um ambiente propício para o desenvolvimento progressivo das lesões, mas ainda assim incapaz de eliminar o parasito. Dessa maneira, a sinalização via o receptor da IL-18 pode ser um alvo interessante para a modulação da resposta das células Th0, seja nos

modelos de infecção pela *L. amazonensis* ou pela indução de inflamação pela carragenina. Esses dados são importantes, pois a IL-18 parece ser um alvo interessante para o controle de lesões cutâneas, visto que a sua ausência está associada a lesões menores em mais de um modelo de inflamação na pele e em mais de um modelo murino. Além disso, salientamos que a IL-18 tem a capacidade de modular mais de um tipo de resposta nas células T CD4⁺, estando relacionada a um aumento das células IL-4⁺ nas lesões e um aumento das células IFN- γ ⁺ no linfonodo drenante, o que mais uma vez, frisa a versatilidade dessa citocina.

REFERÊNCIAS

- AIRA, L. E. et al. Caspase 1/11 deficiency or pharmacological inhibition mitigates psoriasis-like phenotype in mice. **J Invest Dermatol**, 2018.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- AKITA, K. et al. Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. **J Biol Chem**, v. 272, n. 42, p. 26595-603, 1997.
- ALCOLEA, P. J. et al. Increased Abundance of Proteins Involved in Resistance to Oxidative and Nitrosative Stress at the Last Stages of Growth and Development of Leishmania amazonensis Promastigotes Revealed by Proteome Analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0164344, 2016.
- ALCORN, J. F.; CROWE, C. R.; KOLLS, J. K. TH17 cells in asthma and COPD. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 495-516, 2010.
- ALLEN, I. C. et al. 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.
- ANNAMALAI, P.; THANGAM, E. B. Local and Systemic Profiles of Inflammatory Cytokines in Carrageenan-induced Paw Inflammation in Rats. **Immunol. Invest**, p. 1-10, 2016.
- ASTE-AMEZAGA, M. et al. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. **J Immunol**, v. 160, n. 12, p. 5936-44, 1998.
- BADIMON, L. Interleukin-18: a potent pro-inflammatory cytokine in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v. 96, n. 2, p. 172-5; discussion 176-80, 2012.
- BANDA, N. K. et al. Mechanisms of inhibition of collagen-induced arthritis by murine IL-18 binding protein. **J Immunol**, v. 170, n. 4, p. 2100-5, 2003.
- BANERJEE, S.; BOND, J. S. Prointerleukin-18 is activated by mepri beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. **J Biol Chem**, v. 283, n. 46, p. 31371-7, 2008.
- BAO, Y. et al. Identification of IFN-gamma-producing innate B cells. **Cell Res**, v. 24, n. 2, p. 161-76, 2014.

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

BAZAN, J. F.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A. A newly defined interleukin-1? **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 591, 1996.

BELGE, K.; BRUCK, J.; GHORESCHI, K. Advances in treating psoriasis. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 4, 2014.

BELKAID, Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J Exp Med**, v. 194, n. 10, p. 1497-506, 2001.

BELKAID, Y. et al. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J Immunol**, v. 165, n. 2, p. 969-77, 2000.

BIEBER, T. Atopic dermatitis. **N Engl J Med**, v. 358, n. 14, p. 1483-94, 2008.

BOSSALLER, L. et al. Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 β and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. **J Immunol**, v. 189, n. 12, p. 5508-12, 2012.

BRUUN, J. M. et al. Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and weight loss. **Eur J Endocrinol**, v. 157, n. 4, p. 465-71, 2007.

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.

BUFLER, P. et al. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13723-8, 2002.

CALEGARI-SILVA, T. C. et al. *Leishmania amazonensis* downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism. **Eur J Immunol**, v. 48, n. 7, p. 1188-1198, 2018.

CANETTI, C. A. et al. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF- α and leukotriene B4. **J Immunol**, v. 171, n. 2, p. 1009-15, 2003.

CARNEIRO, M. B. et al. IFN- γ -Dependent Recruitment of CD4(+) T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. **J Interferon Cytokine Res**, v. 35, n. 12, p. 935-47, 2015.

CARNEIRO, M. B. et al. IFN-gamma-Dependent Recruitment of CD4(+) T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. **J.Interferon Cytokine Res.**, v. 35, n. 12, p. 935-947, 2015.

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.

CHARMOY, M. et al. The Nlrp3 inflammasome, IL-1beta, and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **Eur J Immunol**, v. 46, n. 4, p. 897-911, 2016.

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.

CHEN, C. J. et al. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nat Med**, v. 13, n. 7, p. 851-6, 2007.

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-37, 2010.

CHIOSSONE, L. et al. Protection from inflammatory organ damage in a murine model of hemophagocytic lymphohistiocytosis using treatment with IL-18 binding protein. **Front Immunol**, v. 3, p. 239, 2012.

CHO, D. et al. The enhanced IL-18 production by UVB irradiation requires ROI and AP-1 signaling in human keratinocyte cell line (HaCaT). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 298, n. 2, p. 289-95, 2002.

CHUANG, Y. et al. Regulation of the IL-10-driven macrophage phenotype under incoherent stimuli. **Innate Immun**, v. 22, n. 8, p. 647-657, 2016.

CLABORN, D. M. The biology and control of leishmaniasis vectors. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 127-34, 2010.

COMPANJEN, A. et al. Elevated interleukin-18 protein expression in early active and progressive plaque-type psoriatic lesions. **Eur.Cytokine Netw.**, v. 15, n. 3, p. 210-216, 2004a.

_____. Elevated interleukin-18 protein expression in early active and progressive plaque-type psoriatic lesions. **Eur Cytokine Netw**, v. 15, n. 3, p. 210-6, 2004b.

CORBAZ, A. et al. IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease. **J Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3608-16, 2002.

CORTES, D. F. et al. Low and high-dose intradermal infection with *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* in C57BL/6 mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 736-45, 2010.

COURA, C. O. et al. Mechanisms involved in the anti-inflammatory action of a polysulfated fraction from *Gracilaria cornea* in rats. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119319, 2015.

COURRET, N. et al. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, v. 122, n. Pt 3, p. 263-79, 2001.

COUTINHO-ABREU, I. V.; GUIMARAES-COSTA, A. B.; VALENZUELA, J. G. Impact of Insect Salivary Proteins in Blood Feeding, Host Immunity, Disease, and in the Development of Biomarkers for Vector Exposure. **Curr Opin Insect Sci**, v. 10, p. 98-103, 2015.

CUZZOCREA, S. et al. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **J.Immunol.**, v. 163, n. 9, p. 5094-5104, 1999.

DA SILVA, S. C.; BRODSKY, C. I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Front Public Health**, v. 2, p. 165, 2014.

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

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.

DEY, R. et al. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host Microbe**, v. 23, n. 1, p. 134-143 e6, 2018.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. **Int Rev Immunol**, v. 16, n. 5-6, p. 457-99, 1998.

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

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 8-27, 2018.

DINARELLO, C. A. et al. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. **J.Leukoc.Biol.**, v. 63, n. 6, p. 658-664, 1998.

DO, D. V. et al. 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.

DOEHL, J. S. P. et al. Skin parasite landscape determines host infectiousness in visceral leishmaniasis. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 57, 2017.

DOMENEGHETTI, L. et al. Calophyllum brasiliense Modulates the Immune Response and Promotes Leishmania amazonensis Intracellular Death. **Mediators Inflamm**, v. 2018, p. 6148351, 2018.

DUARTE, D. B.; VASKO, M. R.; FEHRENBACHER, J. C. Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. **Curr.Protoc.Pharmacol.**, v. 72, p. 5-9, 2016.

DUPAUL-CHICOINE, J. et al. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 367-78, 2010.

ELHAGE, R. et al. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. **Cardiovasc Res**, v. 59, n. 1, p. 234-40, 2003.

ELINAV, E. et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 745-57, 2011.

ESFANDIARI, E. et al. 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. et al. 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. et al. 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.

FEHRENBACHER, J. C.; VASKO, M. R.; DUARTE, D. B. Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. **Curr.Protoc.Pharmacol.**, v. Chapter 5, p. Unit5, 2012.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 9, p. 1590-604, 2007.

FIGUEIREDO, A. B. et al. Leishmania amazonensis-Induced cAMP Triggered by Adenosine A2B Receptor Is Important to Inhibit Dendritic Cell Activation and Evade Immune Response in Infected Mice. **Front Immunol**, v. 8, p. 849, 2017.

FUSCO, R. et al. Inhibition of inflammasome activation improves lung acute injury induced by carrageenan in a mouse model of pleurisy. **FASEB J**, v. 31, n. 8, p. 3497-3511, 2017.

GERDES, N. et al. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. **J Exp Med**, v. 195, n. 2, p. 245-57, 2002.

GHOSE, P. et al. The interaction between IL-18 and IL-18 receptor limits the magnitude of protective immunity and enhances pathogenic responses following infection with intracellular bacteria. **J Immunol**, v. 187, n. 3, p. 1333-46, 2011.

GHOSH, S. et al. Absence of CD4(+) T cell help generates corrupt CD8(+) effector T cells in sarcoma-bearing Swiss mice treated with NLGP vaccine. **Immunol.Lett.**, v. 175, p. 31-39, 2016.

Global leishmaniasis update, 2006-2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 92, n. 38, p. 557-65, 2017.

GOMES, I. N. et al. 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.

GONCALVES, R. et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection. **J Exp Med**, v. 208, n. 6, p. 1253-65, 2011.

GONCALVES, V. M. et al. NLRP3 controls Trypanosoma cruzi infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2469, 2013.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following Leishmania major infection. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 3, p. e1003243, 2013.

GORFU, G. et al. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to Toxoplasma gondii. **MBio.**, v. 5, n. 1, 2014.

GRACIE, J. A. et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v. 104, n. 10, p. 1393-401, 1999.

GREEN, S. J. et al. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . **J.Immunol.**, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990.

GU, H. et al. The protective role of interleukin-18 binding protein in a murine model of cardiac ischemia/reperfusion injury. **Transpl Int**, v. 28, n. 12, p. 1436-44, 2015.

GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. 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.

HAAS, C. S. et al. Inhibition of angiogenesis by interleukin-4 gene therapy in rat adjuvant-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 8, p. 2402-14, 2006.

HAND, T. W. Interleukin-18: The Bouncer at the Mucosal Bar. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1310-2, 2015.

HANDY, R. L.; MOORE, P. K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. **Br.J.Pharmacol.**, v. 123, n. 6, p. 1119-1126, 1998.

HARRISON, O. J. et al. Commensal-specific T cell plasticity promotes rapid tissue adaptation to injury. **Science**, 2018.

HARRISON, O. J. et al. Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3(+) Treg cell function in the intestine. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 6, p. 1226-36, 2015.

HEINZEL, F. P. et al. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with Leishmania major. **J.Exp.Med.**, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, 1993.

HERMIDA, M. D. et al. Leishmania amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. **BMC.Infect.Dis.**, v. 14, p. 450, 2014.

HIROTA, S. A. et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 6, p. 1359-72, 2011.

HOLADAY, B. J. et al. Reconstitution of Leishmania immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. **J.Immunol.**, v. 147, n. 5, p. 1653-1658, 1991.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5041-4, 1999.

HOSHINO, T. et al. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 1, p. 49-62, 2007.

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.

IMAOKA, H. et al. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. **Eur Respir J**, v. 31, n. 2, p. 287-97, 2008.

INOUE, Y. et al. Interleukin-18 is elevated in the horny layer in patients with atopic dermatitis and is associated with Staphylococcus aureus colonization. **Br J Dermatol**, v. 164, n. 3, p. 560-7, 2011.

JOHANSEN, C. et al. The activity of caspase-1 is increased in lesional psoriatic epidermis. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 12, p. 2857-64, 2007.

JONES, D. E. et al. Early enhanced Th1 response after Leishmania amazonensis infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 4, p. 2151-8, 2002.

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.

JOOSTEN, L. A. et al. An IFN-gamma-independent proinflammatory role of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. **J Immunol**, v. 165, n. 11, p. 6553-8, 2000.

KAHLENBERG, J. M.; KAPLAN, M. J. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? **Curr Opin Rheumatol**, v. 26, n. 5, p. 475-81, 2014.

KALINA, U. et al. IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. **J Immunol**, v. 165, n. 3, p. 1307-13, 2000.

KALLIES, A.; GOOD-JACOBSON, K. L. Transcription Factor T-bet Orchestrates Lineage Development and Function in the Immune System. **Trends Immunol**, v. 38, n. 4, p. 287-297, 2017.

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.

KAPLANSKI, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 138-153, 2018.

KIMBLIN, N. et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 29, p. 10125-30, 2008.

KING, A. et al. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 3, n. 4, p. 315-323, 2014.

KOBAYASHI, K. et al. Decreased expression of cytokines that induce type 1 helper T cell/interferon-gamma responses in genetically susceptible mice infected with *Mycobacterium avium*. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 85, n. 1, p. 112-6, 1997.

KONISHI, H. et al. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 17, p. 11340-5, 2002.

KRATZER, A. et al. Role of IL-18 in second-hand smoke-induced emphysema. **Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.**, v. 48, n. 6, p. 725-732, 2013.

KREIDER, T. et al. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Curr.Opin.Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 448-453, 2007.

KRUEGER, J. G. Hiding under the skin: A welcome surprise in psoriasis. **Nat Med**, v. 18, n. 12, p. 1750-1, 2012.

KRUISBEEK, A. M. In vivo depletion of CD4- and CD8-specific T cells. **Curr.Protoc.Immunol.**, v. Chapter 4, p. Unit, 2001.

LALOR, S. J. et al. Caspase-1-processed cytokines IL-1beta and IL-18 promote IL-17 production by gamma delta and CD4 T cells that mediate autoimmunity. **J Immunol**, v. 186, n. 10, p. 5738-48, 2011.

LAUW, F. N. et al. IL-18 improves the early antimicrobial host response to pneumococcal pneumonia. **J Immunol**, v. 168, n. 1, p. 372-8, 2002.

LEE, J. H.; CHO, D. H.; PARK, H. J. IL-18 and Cutaneous Inflammatory Diseases. **Int.J.Mol.Sci.**, v. 16, n. 12, p. 29357-29369, 2015.

LEMOS DE SOUZA, V. et al. Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect**, v. 2, n. 15, p. 1807-15, 2000.

LEON, B.; LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-31, 2007.

LEON RODRIGUEZ, D. A. et al. IL18 Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease. **PLoS.Negl.Trop.Dis.**, v. 10, n. 3, p. e0004583, 2016.

LEUNG, B. P. et al. A role for IL-18 in neutrophil activation. **J.Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2879-2886, 2001.

LEUNG, B. P. et al. A role for IL-18 in neutrophil activation. **J Immunol**, v. 167, n. 5, p. 2879-86, 2001.

LEUNG, B. P. et al. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis. **J.Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6495-6502, 2000.

LEVY, M. et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1428-43, 2015.

LI, J. et al. lambda-Carrageenan improves the antitumor effect of dendritic cell-based vaccine. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 29996-30007, 2017.

LI, S. et al. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 8, p. 2497-502, 2015.

LIANG, H. et al. Inhibition of IL-18 reduces renal fibrosis after ischemia-reperfusion. **Biomed Pharmacother**, v. 106, p. 879-889, 2018.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nat.Med.**, v. 19, n. 7, p. 909-915, 2013.

LIPIEC, K. et al. Angiotensinogen and interleukin-18 as markers of chronic kidney damage in children with a history of hemolytic uremic syndrome. **Physiol Res.**, 2016.

LISSNER, D.; SONNENBERG, E.; SIEGMUND, B. [Inflammatory bowel disease: cardinal signs and their diagnostics]. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 113, n. 13, p. 937-944, 2018.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 83, 2012.

LIUQING, W. et al. Elevated IL-37, IL-18 and IL-18BP serum concentrations in patients with primary Sjogren's syndrome. **J.Investig.Med.**, 2017.

LOCKSLEY, R. M. et al. Induction of Th1 and Th2 CD4+ subsets during murine Leishmania major infection. **Res.Immunol.**, v. 142, n. 1, p. 28-32, 1991.

LOCKSLEY, R. M. et al. 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. et al. 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.

LOPES, M. F.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; DOSREIS, G. A. Innate immunity to Leishmania infection: within phagocytes. **Mediators.Inflamm.**, v. 2014, p. 754965, 2014.

LOPETUSO, L. R.; CHOWDHRY, S.; PIZARRO, T. T. Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. **Front Immunol.**, v. 4, p. 181, 2013.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J Immunol**, v. 182, n. 5, p. 3039-46, 2009.

LOWES, M. A.; SUAREZ-FARINAS, M.; KRUEGER, J. G. Immunology of psoriasis. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 32, p. 227-255, 2014.

LU, Y. et al. Expansion of CD4(+) CD25(+) and CD25(-) T-Bet, GATA-3, Foxp3 and RORgammat cells in allergic inflammation, local lung distribution and chemokine gene expression. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19889, 2011.

LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4(+)T cells: differentiation and functions. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 925135, 2012.

LUDWICZEK, O. et al. Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-18 binding protein are elevated in patients with chronic liver disease. **J Clin Immunol**, v. 22, n. 6, p. 331-7, 2002.

LUZ, N. F. et al. Lutzomyia longipalpis Saliva Induces Heme Oxygenase-1 Expression at Bite Sites. **Front Immunol**, v. 9, p. 2779, 2018.

MA, X. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Res**, v. 4, 2015.

MALLAT, Z. et al. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. **Circ Res**, v. 89, n. 7, p. E41-5, 2001.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 12, p. 677-686, 2004.

MAROTTE, H. et al. Blocking ERK-1/2 reduces tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-18 bioactivity in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by induction of interleukin-18 binding protein A. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 3, p. 722-31, 2010.

MCNAMEE, E. N. et al. Interleukin 37 expression protects mice from colitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 40, p. 16711-6, 2011.

MEYER ZUM BUSCHENFELDE, C. et al. Trypanosoma cruzi induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-gamma) production. **Clin Exp Immunol**, v. 110, n. 3, p. 378-85, 1997.

MICALLEF, M. J. et al. In vivo antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites. **Cancer Immunol Immunother**, v. 43, n. 6, p. 361-7, 1997.

MICHELS, M. et al. Normal free interleukin-18 (IL-18) plasma levels in dengue virus infection and the need to measure both total IL-18 and IL-18 binding protein levels. **Clin.Vaccine Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 650-655, 2015.

MOHAMADI, Y. et al. The role of inflammasome complex in ischemia-reperfusion injury. **J Cell Biochem**, 2018.

MOHR, E.; FEHR, S.; RICHTER, D. Axonal transport of neuropeptide encoding mRNAs within the hypothalamo-hypophyseal tract of rats. **EMBO J.**, v. 10, n. 9, p. 2419-2424, 1991.

MONTEFORTE, G. M. et al. 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. et al. 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. 37069-75, 2001.

MOREL, J. C. et al. Signal transduction pathways involved in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin-18-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. **J Biol Chem**, v. 277, n. 38, p. 34679-91, 2002.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol.Biol.**, v. 225, p. 115-121, 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. et al. 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. 2103-8, 1998.

MURPHY, K. M.; STOCKINGER, B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. **Nat Immunol**, v. 11, n. 8, p. 674-80, 2010.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, 2005.

NACIFE, V. P. et al. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide in vivo. **Cell Struct Funct**, v. 29, n. 2, p. 27-34, 2004.

NAIK, S. M. et al. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. **J Invest Dermatol**, v. 113, n. 5, p. 766-72, 1999.

NAKAMURA, K. et al. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. **Infect.Immun.**, v. 57, n. 2, p. 590-595, 1989.

NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 19, p. 423-474, 2001.

NAKANO, H. et al. Persistent secretion of IL-18 in the skin contributes to IgE response in mice. **Int Immunol**, v. 15, n. 5, p. 611-21, 2003.

NAKAYAMA, T. et al. Th2 Cells in Health and Disease. **Annu Rev Immunol**, v. 35, p. 53-84, 2017.

NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 9, n. 10, p. 679-691, 2009.

NETEA, M. G. et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. **Nat Med**, v. 12, n. 6, p. 650-6, 2006.

NEUMANN, D. et al. Lymphocytes from autoimmune MRL lpr/lpr mice are hyperresponsive to IL-18 and overexpress the IL-18 receptor accessory chain. **J Immunol**, v. 166, n. 6, p. 3757-62, 2001.

NOGUEIRA, L. G. et al. Functional IL18 polymorphism and susceptibility to Chronic Chagas Disease. **Cytokine**, v. 73, n. 1, p. 79-83, 2015.

NOLD-PETRY, C. A. et al. IL-37 requires the receptors IL-18Ralpha and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. **Nat Immunol**, v. 16, n. 4, p. 354-65, 2015.

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **J Immunol**, v. 183, n. 12, p. 8088-98, 2009.

NOVICK, D. et al. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. **Immunity**, v. 10, n. 1, p. 127-36, 1999.

NOVICK, D. et al. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. **Cytokine**, v. 14, n. 6, p. 334-42, 2001.

NOWARSKI, R. et al. Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1444-56, 2015.

NYLEN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 135-46, 2010.

OHKURA, N.; KITAGAWA, Y.; SAKAGUCHI, S. Development and maintenance of regulatory T cells. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 414-23, 2013.

OHKUSU, K. et al. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania* major infection. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2449-56, 2000.

OHTA, Y.; HAMADA, Y.; KATSUOKA, K. Expression of IL-18 in psoriasis. **Arch.Dermatol.Res.**, v. 293, n. 7, p. 334-342, 2001.

OKAMURA, H. et al. 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.

OKAMURA, H. et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. **Nature**, v. 378, n. 6552, p. 88-91, 1995.

OLIVEIRA, A. C. et al. Crucial role for T cell-intrinsic IL-18R-MyD88 signaling in cognate immune response to intracellular parasite infection. **Elife**, v. 6, 2017.

OLIVEIRA, C. F. et al. Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*. **Clin.Dev.Immunol.**, v. 2012, p. 865708, 2012.

OMOTE, K. et al. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Res.**, v. 912, n. 2, p. 171-175, 2001.

OMOTO, Y. et al. Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. **J.Immunol.**, v. 177, n. 12, p. 8315-8319, 2006.

OMOTO, Y. et al. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. **J.Dermatol.Sci.**, v. 59, n. 2, p. 129-135, 2010.

ORDONEZ-RUEDA, D. et al. A hypomorphic mutation in the Gfi1 transcriptional repressor results in a novel form of neutropenia. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 9, p. 2395-408, 2012.

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.

PEJNOVIC, N. et al. Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet. **Mol Immunol**, v. 47, n. 1, p. 37-45, 2009.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PHAM, O. H. et al. T cell expression of IL-18R and DR3 is essential for non-cognate stimulation of Th1 cells and optimal clearance of intracellular bacteria. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 8, p. e1006566, 2017.

PICCIRILLO, C. A. et al. CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the control of autoimmunity: in vivo veritas. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 6, p. 655-62, 2008.

PLATIS, A. et al. The effect of daily administration of IL-18 on cardiac structure and function. **Perfusion**, v. 23, n. 4, p. 237-42, 2008.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br.J.Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PUTHUMANA, J. et al. Urine Interleukin 18 and Lipocalin 2 are Biomarkers of Acute Tubular Necrosis in Patients With Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clin.Gastroenterol.Hepatol.**, 2016.

QI, H. et al. 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.

QIU, R. et al. Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. **Clin Rev Allergy Immunol**, 2018.

QUAGLINO, P. et al. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. **Dermatology**, v. 223, n. 1, p. 57-67, 2011.

RATHINAM, V. A. K.; CHAN, F. K. Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. **Trends Mol.Med.**, v. 24, n. 3, p. 304-318, 2018.

RAVICHANDRAN, K. et al. CD4 T cell knockout does not protect against kidney injury and worsens cancer. **J.Mol.Med.(Berl)**, v. 94, n. 4, p. 443-455, 2016.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002536, 2012.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. **Infect Immun**, v. 82, n. 7, p. 2713-27, 2014.

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, p. 59, 2012.

RICARDO-GONZALEZ, R. R. et al. Tissue signals imprint ILC2 identity with anticipatory function. **Nat Immunol**, v. 19, n. 10, p. 1093-1099, 2018.

ROBINSON, E. S.; WERTH, V. P. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 73, n. 2, p. 326-34, 2015.

ROCHAEL, N. C. et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. **Sci.Rep.**, v. 5, p. 18302, 2015.

ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463-467, 2004.

ROMANO, A. et al. Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 6, p. e1006479, 2017.

SACKS, D. L.; MELBY, P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 19, p. Unit 19 2, 2001.

SANTANA, D. Y. et al. MyD88 activation in cardiomyocytes contributes to the heart immune response to acute *Trypanosoma cruzi* infection with no effect on local parasite control. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 8, p. e0006617, 2018.

SASAKI, Y. et al. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. **J Exp Med**, v. 202, n. 5, p. 607-16, 2005.

SAWADA, M. et al. IL-18 induces airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation via CD4+ T cell and IL-13. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54623, 2013.

SCHOPF, L. R. et al. Alterations of intralesional and lymph node gene expression and cellular composition induced by IL-12 administration during leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 23, n. 2, p. 71-84, 2001.

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

SCHULTZ, M. J. et al. Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun**, v. 71, n. 4, p. 1630-4, 2003.

SCHULTZ, M. J. et al. Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 282, n. 2, p. L285-90, 2002.

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

SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nat Microbiol**, v. 3, n. 5, p. 548-555, 2018.

SEYED, N.; PETERS, N. C.; RAFATI, S. Translating Observations From Leishmanization Into Non-Living Vaccines: The Potential of Dendritic Cell-Based Vaccination Strategies Against *Leishmania*. **Front Immunol**, v. 9, p. 1227, 2018.

SHAO, W. et al. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. **J Biol Chem**, v. 282, n. 50, p. 36321-9, 2007.

SHIMOURA, N. et al. Interleukin (IL)-18, cooperatively with IL-23, induces prominent inflammation and enhances psoriasis-like epidermal hyperplasia. **Arch Dermatol Res**, v. 309, n. 4, p. 315-321, 2017.

SIEGMUND, B. Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe? **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 300-2, 2010.

SILVA, E. M.; BERTHO, A. L.; MENDONCA, S. C. Effect of in vivo depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. **Acta Trop**, v. 56, n. 1, p. 111-20, 1994.

SILVA, G. K. et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 β response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 191, n. 6, p. 3373-83, 2013.

SKURK, T. et al. The proatherogenic cytokine interleukin-18 is secreted by human adipocytes. **Eur J Endocrinol**, v. 152, n. 6, p. 863-8, 2005.

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

_____. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *Leishmania amazonensis*. **Front Immunol**, v. 3, p. 58, 2012.

SOONG, L. et al. 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. et al. IL-18 contributes to susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection by macrophage-independent mechanisms. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 327-30, 2015.

SOUSA, L. M. et al. 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.

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.

STEIGERWALD, M.; MOLL, H. *Leishmania* major modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2564-7, 2005.

STRENGELL, M. et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. **J Immunol**, v. 170, n. 11, p. 5464-9, 2003.

SUGAWARA, I. et al. Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. **Infect Immun**, v. 67, n. 5, p. 2585-9, 1999.

SUGAWARA, S. et al. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. **J Immunol**, v. 167, n. 11, p. 6568-75, 2001.

SYPEK, J. P. et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J Exp Med**, v. 177, n. 6, p. 1797-802, 1993.

TACCHINI-COTTIER, F. et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **J Immunol**, v. 165, n. 5, p. 2628-36, 2000.

TAKEDA, K. et al. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. **Immunity**, v. 8, n. 3, p. 383-390, 1998.

TALAAAT, R. M. et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. **Cytokine**, v. 72, n. 2, p. 146-53, 2015.

TAM, P. E.; HINS DILL, R. D. Evaluation of immunomodulatory chemicals: alteration of macrophage function in vitro. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 76, n. 1, p. 183-94, 1984.

TANAKA, T. et al. Interleukin-18 is elevated in the sera from patients with atopic dermatitis and from atopic dermatitis model mice, NC/Nga. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 125, n. 3, p. 236-40, 2001.

TANG, L. et al. Transcription Factor Retinoid-Related Orphan Receptor gamma: A Promising Target for the Treatment of Psoriasis. **Front Immunol**, v. 9, p. 1210, 2018.

TEN HOVE, T. et al. Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. **Gastroenterology**, v. 121, n. 6, p. 1372-9, 2001.

TERADA, M. et al. Contribution of IL-18 to atopic-dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 23, p. 8816-21, 2006.

THOMAS, P. G. et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 566-75, 2009.

TOBACMAN, J. K.; WALTERS, K. S. Carrageenan-induced inclusions in mammary myoepithelial cells. **Cancer Detect.Prev.**, v. 25, n. 6, p. 520-526, 2001.

TOLDO, S. et al. Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction. **Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol**, v. 306, n. 7, p. H1025-H1031, 2014.

TOMURA, M. et al. A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells. **J Immunol**, v. 160, n. 10, p. 4738-46, 1998.

TORIGOE, K. et al. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. **J Biol Chem**, v. 272, n. 41, p. 25737-42, 1997.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Res**, v. 6, p. 750, 2017.

TSUJI, N. M. et al. Roles of caspase-1 in *Listeria* infection in mice. **Int Immunol**, v. 16, n. 2, p. 335-43, 2004.

UDAGAWA, N. et al. 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.

USUL, A. C. et al. Circulating interleukin-18 (IL-18) is a predictor of response to gemcitabine based chemotherapy in patients with pancreatic adenocarcinoma. **J.Infect.Chemother.**, 2017.

VAN, D., V et al. Coil-helix transition of iota-carrageenan as a function of chain regularity. **Biopolymers**, v. 65, n. 4, p. 299-312, 2002.

VENKATACHALAM, K. et al. Neutralization of interleukin-18 ameliorates ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. **J Biol Chem**, v. 284, n. 12, p. 7853-65, 2009.

VERRI, W. A., JR. et al. IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production. **Eur.J.Immunol.**, v. 37, n. 12, p. 3373-3380, 2007.

VIEIRA, L. Q. et al. 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.

VORONOV, E. et al. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. **Int Immunol**, v. 22, n. 4, p. 245-57, 2010.

WANASEN, N. et al. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. **Infect Immun**, v. 75, n. 6, p. 2802-10, 2007.

WANG, D. et al. Analysis of the Indicating Value of Cardiac Troponin I, Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin-18, Mir-1 and Mir-146b for Viral Myocarditis among Children. **Cell Physiol Biochem**, v. 40, n. 6, p. 1325-1333, 2016.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Front Immunol**, v. 5, p. 614, 2014.

WEI, X. Q. et al. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. **J Immunol**, v. 166, n. 1, p. 517-21, 2001.

WEI, X. Q. et al. 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. et al. 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.

WILSON, J. et al. 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. H. et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 180, n. 8, p. 720-30, 2009.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WITTMANN, M. et al. IL-27 Regulates IL-18 binding protein in skin resident cells. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38751, 2012.

WOLDBAEK, P. R. et al. Daily administration of interleukin-18 causes myocardial dysfunction in healthy mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 2, p. H708-14, 2005.

WU, J.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; ALNEMRI, E. S. Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*. **J Clin Immunol**, v. 30, n. 5, p. 693-702, 2010.

WYMAN, T. H. et al. Physiological levels of interleukin-18 stimulate multiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 2, p. 401-9, 2002.

WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450-462, 2016.

XIANG, Y.; MOSS, B. Correspondence of the functional epitopes of poxvirus and human interleukin-18-binding proteins. **J Virol**, v. 75, n. 20, p. 9947-54, 2001.

XIAO, H. et al. IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon beta-adrenergic insult. **Eur Heart J**, v. 39, n. 1, p. 60-69, 2018.

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. et al. 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, K. et al. SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 310, n. 4, p. 1188-93, 2003.

YANG, C. A.; CHIANG, B. L. Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review. **J Autoimmun**, v. 61, p. 1-8, 2015.

YANG, J. et al. Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 2, p. 548-55, 1999.

YATSIV, I. et al. Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, n. 8, p. 971-8, 2002.

YOSHIMOTO, T. et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. **Nat.Immunol.**, v. 1, n. 2, p. 132-137, 2000a.

YOSHIMOTO, T. et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. **Nat Immunol**, v. 1, n. 2, p. 132-7, 2000b.

YOSHIMOTO, T. et al. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 8, p. 3948-53, 1997.

YOSHIMOTO, T. et al. 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. 3400-7, 1998.

YOSHIMOTO, T. et al. 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. 13962-6, 1999.

YU, Q. et al. IL-18 induction of osteopontin mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 1, p. H76-85, 2009.

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunol Rev**, v. 265, n. 1, p. 156-71, 2015.

ZEDAN, K. et al. Immunoglobulin e, interleukin-18 and interleukin-12 in patients with atopic dermatitis: correlation with disease activity. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 4, p. WC01-5, 2015.

ZHAO, C. et al. Long-term bicycle riding ameliorates the depression of the patients undergoing hemodialysis by affecting the levels of interleukin-6 and interleukin-18. **Neuropsychiatr.Dis.Treat.**, v. 13, p. 91-100, 2017.

ZHOU, L.; CHONG, M. M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 646-55, 2009.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 445-89, 2010.

ZORRILLA, E. P. et al. Interleukin-18 controls energy homeostasis by suppressing appetite and feed efficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 26, p. 11097-102, 2007.

ANEXO

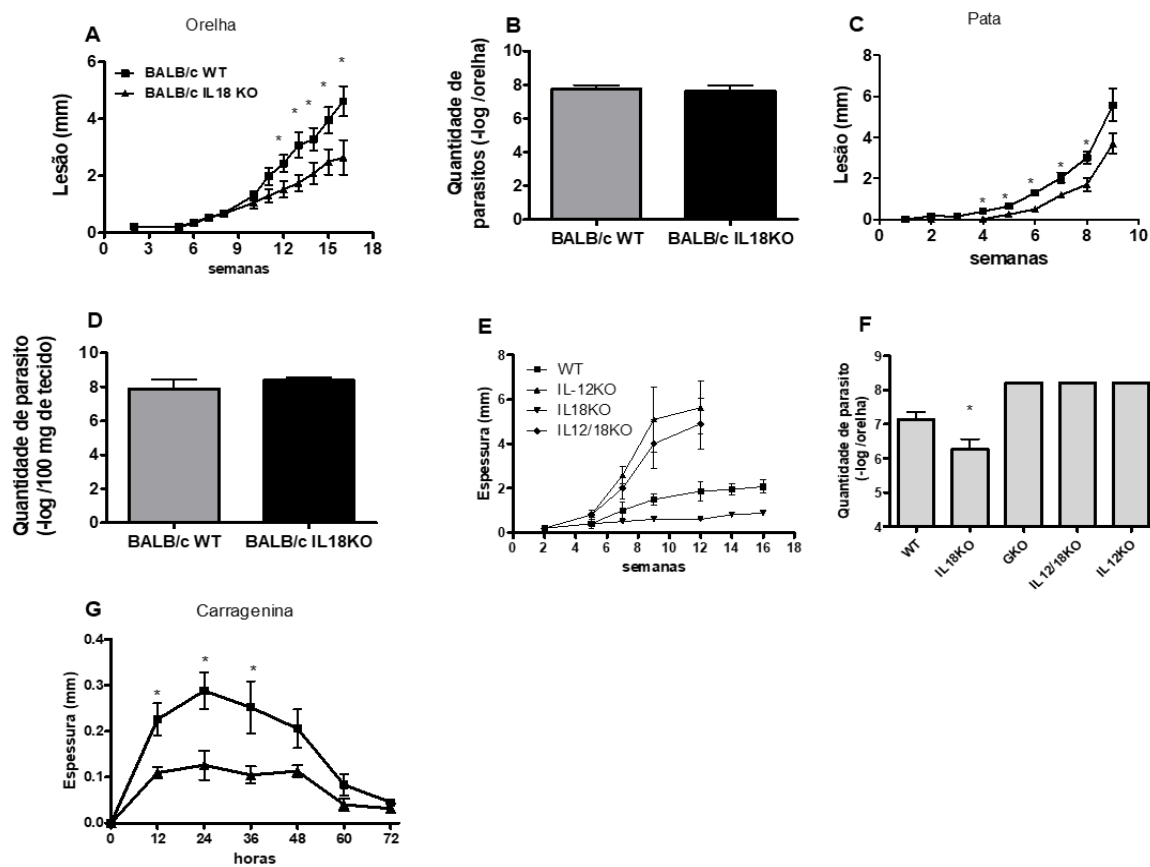


Figura 1: Dados gentilmente cedidos pelo professor Helton Santiago.

Em **A** e **B**: Os camundongos foram infectados com 1000 formas metacíclicas de *L. amazonensis* em ambas as orelhas e lesões acompanhadas por 16 semanas. Em **C** e **D**: Camundongos foram infectados com 1×10^6 formas estacionárias de *L. amazonensis* na pata traseira e a lesão foi acompanhada por 9 semanas. Em **E** e **F** Os camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 formas estacionárias de *L. Amazonensis* na pata traseira e as lesões foram acompanhadas por 16 semanas. Em **G**: Os animais BALB/c e BALB/c IL-18 KO foram injectados com 300 mcg de carragenina na pata traseira direita e PBS na pata esquerda. A lesão foi medida a cada 12 horas.

