UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Papel da Interleucina 6 (IL-6) na resposta inflamatória neutrofílica durante a
infecção por *Leishmania infantum***

Ítala Cristine Silva

RIBEIRÃO PRETO
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Papel da Interleucina 6 (IL-6) na resposta inflamatória neutrofílica durante a
infecção por *Leishmania infantum***

Ítala Cristine Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Nome do Orientador: Prof. Dra. **Vanessa Carregaro Pereira**

RIBEIRÃO PRETO

2016

Autorizo a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Ítala Cristine

Papel da Interleucina 6 (IL-6) na resposta inflamatória neutrofílica durante a infecção por *Leishmania infantum*. Ribeirão Preto, 2016.

92 p. : il. ; 30 cm

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Vanessa Carregaro Pereira.

1. Leishmaniose visceral 2. Interleucina 6 (IL-6) 3. Neutrófilos.

Nome: Ítala Cristine Silva

Título: **Papel da Interleucina 6 (IL-6) na resposta inflamatória neutrofílica durante a infecção por *Leishmania infantum*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Vanessa Crregaro Pereira

Instituição: FMRP-USP

Julgamento:

Prof. Dr^o. Roque Pacheco de Almeida

Instituição: UFS

Julgamento:

Prof. Dr^o. José Clovis do Prado Junior

Instituição: FCFRP-USP

Julgamento:

Prof. Dr^a. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Instituição: FMRP-USP

Julgamento:

Dedicatória

Aos meus pais

Maria Concebida de Souza Silva e Antônio Silva, pela dedicação incondicional, amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã Inara Aparecida Silva pela fé depositada em mim, por sua companhia e por ser o meu exemplo.

À eles o meu mais profundo muito obrigada.

Agradecimentos

A minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Vanessa Carregaro** primeiramente pela oportunidade oferecida em seu laboratório, pelo aprendizado ao longo desses anos, e pela confiança depositada em mim no desenvolvimento desse projeto;

Ao Prof^o. Dr^o. João Santana pelo incentivo à pesquisa e oportunidade de desenvolver esse trabalho em seu laboratório;

Aos meus pais **Maria C. de Souza Silva** e **Antonio Silva**, pelo apoio incondicional;

A minha irmã **Inara A. Silva** pelo suporte e presença em todos os momentos;

Ao meu namorado **Francisco Sabino**, pelo amor paciente, que tudo suporta;

A **Prof^a. Dr^a. Yara Maria Luciano Valim** pela colaboração nesse projeto, e disponibilidade do seu laboratório para a realização de experimentos;

Ao **Dr^o. Micássio Fernandes de Andrade** pela colaboração nesse projeto, as discussões científicas, o incentivo, e principalmente a amizade;

Ao **Prof^o. Dr^o. Wilson A. da Silva Jr** pela colaboração nesse projeto;

A **Jéssica R. Praça** pela colaboração nesse projeto, pelas análises do RNAseq e pelos ensinamentos;

Ao **Prof^o. Dr^o. Roque Pacheco de Almeida** pela colaboração nesse projeto, e pelas amostras cedidas dos pacientes;

A todos os membros do **Laboratório de Imunoparasitologia** que dividiram comigo o ambiente de trabalho ao longo desses anos;

Em especial aos amigos do **Grupo da Leishmania**, **Msc. Laís Sacramento**, **Msc. Mikael Haruo**, pelas discussões, pelo aprendizado que obtive com vocês e pela amizade;

Ao meu amigo **Msc. Pedro Alexandre Sampaio**, minha dupla de bancada, de barriga, de bandeijão, de HC, de cantina, e principalmente nesse trabalho, que também é parte dele;

Aos meus caros amigos da pós-graduação, **Amanda**, **Lucinéia**, **Josiane**, **Naira**, **Bruna**, **Rafaela**, **Leandro**, **Luna**, **Rômulo**, **Luiz**, **Jeferson**, **Davi** e **Guilherme**. Sem vocês o caminho até aqui teria sido muito mais difícil;

A querida amiga **Camila Bussola** pela hospedagem desde a época do curso de inverno, pelo exemplo de pessoa e pelo apoio, você foi essencial para a realização desse trabalho;

Aos professores que compõem a banca, **Drº. José Clovis do Prado Júnior**, **Drª. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos**, **Drº. Roque Pacheco de Almeida**, pela disponibilidade e atenção;

Aos **funcionários da FMRP-USP** pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, são eles: **Rubilan**, **Edir**, **Denner**, **Júlio**, **Dorley**, **Beto**, **Vera**, **Denise**.

Em especial a **Ana Cristina** pelo apoio e dedicação aos alunos da Pós graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Aos **Técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia**, **Cristiane**, **Wander**, **Mara**, e **Vera**, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, vocês são parte dele;

A **CAPES**, **CNPq**, **FAPESP**, **FAEPA** e **IBA** pelo incentivo financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho – Processo 15/12526-2.

APOIO SUPORTE E FINANCIAMENTO

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia, coordenado pelos Professores Drs João Santana da Silva e Vanessa Carregaro Pereira- Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)- Processo 15/12526-2.

“A natureza nunca nos engana; somos sempre nós que nos enganamos.”
(JEAN-JACQUES ROUSSEAU)

Cristine Silva, I. Papel da Interleucina 6 (IL-6) na resposta inflamatória neutrofílica durante a infecção por *Leishmania infantum*.

Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2016, 92pg.

Resumo

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas pela infecção com protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil, o parasita *L. infantum* provoca a manifestação de uma doença sistêmica e crônica, conhecida como leishmaniose visceral (VL), que, quando não tratada, pode levar o indivíduo à óbito. A gravidade da leishmaniose visceral vem sendo associada ao aumento do nível sistêmico de IL-6 em pacientes sintomáticos. Ainda não está claro como o aumento dessa citocina coordena a progressão da doença. Nós demonstramos durante a infecção por *L. infantum* experimental há produção dessa citocina nos órgãos alvos. Em decorrência dessa via, animais deficientes para IL-6 (IL-6^{-/-}) são suscetíveis a infecção por apresentar maior número de parasitos nos órgãos alvo e por desenvolverem uma fraca resposta inflamatória em função da diminuição do infiltrado inflamatório. Como consequência, há o aumento de CXCL2 que medeia o recrutamento de neutrófilos no baço. Apesar de aumentada em animais IL-6^{-/-} os neutrófilos apresentam um estado menos ativado. A produção dos principais mediadores de morte dos parasitos, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e o óxido nítrico (NO), estão comprometidas e favorecem a disseminação do parasito em animais IL-6^{-/-}. Por outro lado, a IL-6 não interfere na produção de citocinas pró-inflamatórias e na proliferação de linfócitos Th1, atuando somente em linfócitos Th17 no início da infecção, sugerindo que o controle da resposta inflamatória é dependente de mecanismos inatos. Em humanos, identificamos dois genes modulados pela via de sinalização da IL-6. Os genes Hsbp1 e AR estão up-regulados em pacientes com a doença ativa e são genes associados com a migração e a produção de neutrófilos na medula óssea, possivelmente envolvidos com a neutropenia em pacientes com LV. Juntos, os dados mostram que a via de sinalização da IL-6 tem papel importante na modulação da resposta imune de neutrófilos, e em promover proteção durante a LV.

Palavras chaves: Leishmaniose Visceral; Neutrófilos; Interleucina 6; RNA-seq.

Cristine Silva, I. **The role of Interleukin 6 (IL-6) in the neutrophil inflammatory response during infection by *Leishmania infantum*.**

Masters dissertation. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2016, 92 pg.

Abstract

Leishmaniasis is a group of diseases caused by infection with protozoa of the genus *Leishmania*. In Brazil, the parasite *L. infantum* causes the manifestation of a systemic and chronic disease, known as visceral leishmaniasis (VL), which, when left untreated, can lead to death. The severity of visceral leishmaniasis has been associated with an increase in the systemic level of IL-6 in symptomatic patients. It is not yet clear how the increase in this cytokine coordinates the progression of the disease. We demonstrated during the infection by experimental *L. infantum* there is production of this cytokine in the target organs. As a result of this pathway, IL-6 (IL-6^{-/-}) deficient animals are susceptible to infection because they present a higher number of parasites in the target organs and they develop a poor inflammatory response due to the decrease of the inflammatory infiltrate. As a consequence, there is an increase in CXCL2 that mediates the recruitment of neutrophils in the spleen. Although increased in IL-6^{-/-} animals the neutrophils have a less activated state. The production of the main mediators of parasite death, such as reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), are compromised and favor the spread of the parasite in IL-6^{-/-} animals. On the other hand, IL-6 does not interfere in the production of pro-inflammatory cytokines and Th1 lymphocyte proliferation, acting only on Th17 lymphocytes at the beginning of the infection, suggesting that the control of the inflammatory response is dependent on innate mechanisms. In humans, we identified two genes modulated by the IL-6 signaling pathway. The Hsbp1 and AR genes are up-regulated in patients with the active disease and are genes associated with the migration and production of neutrophils in the bone marrow, possibly involved with neutropenia in patients with VL. Together, the data show that the IL-6 signaling pathway plays an important role in modulating the neutrophil immune response, and in promoting protection during LV.

Keywords: Visceral Leishmaniasis; Neutrophils; Interleukin 6; RNA-seq.

Lista de Tabelas

Tabela 1- Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	38
Tabela 2- Pacientes e sujeitos controles envolvidos no estudo.....	39

Lista de Figuras

Figura 1: A expressão de IL-6 é regulada positivamente durante a infecção por <i>L. infantum</i>	44
Figura 2: Animais IL-6 ^{-/-} são susceptíveis a infecção por <i>L. infantum</i>	46
Figura 3: Animais deficientes para IL-6 não interferem com a quantidade de MØs e DCs no infiltrado inflamatório.....	48
Figura 4: Animais deficientes para IL-6 apresentam maior infiltrado neutrofílico no baço após infecção por <i>L. infantum</i>	51
Figura 5: As funções leishmanicidas dos neutrófilos são alteradas na ausência da IL-6.....	53
Figura 6: Infecção por <i>L. infantum</i> aumenta a sobrevivência de neutrófilos deficientes para IL-6.....	54
Figura 7: A migração de neutrófilos em animais deficientes para IL-6 é dependente de CXCL-2.....	56
Figura 8: A via de sinalização de citocinas pró inflamatórias nos animais deficientes para IL-6 não é comprometida.....	57
Figura 9: <i>L. infantum</i> induz a produção de IFN-γ em animais deficientes para IL-6.....	58
Figura 10: Animais deficientes para IL-6 tem uma alteração da resposta Th17.....	59
Figura 11: Animais deficientes para IL-6 tem uma alteração de células TCD4 produtoras IL-10.....	60
Figura 12: Identificação de genes diferencialmente expressos na via de sinalização da IL-6 durante a LV.....	63
Figura 13: Validação em pacientes dos possíveis alvos encontrados no RNAseq.....	64

Lista de abreviaturas

ADO	Adenosina
ALT	aminotransferase de alanine
AMP	Adenosina monofosfato
APCs	Células apresentadoras de antígeno
AR	<i>Androgen receptor</i>
AST	aminotransferase de aspartate
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>cicle threshold</i>
DAMPS	Padrões Moleculares Associados a Dano Celular
DCs	Células dendríticas
DTH	Reatividade cutânea de hipersensibilidade tardia
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
gp130	Glicoproteína transdutora de sinal 130
Hspb1	Heat shock protein beta-1
IL-10	Interleucina10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-33	Interleucina 33
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-6 ^{-/-}	Deficientes para IL-6
IL-6R	Receptor- α para IL-6
IL-8	Interleucina 8
INF- γ	Interferon gamma
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucocutânea
M-CSF	Fator estimulante de colônia monócito

M ϕ	Macrófagos
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NO	Óxido nítrico
PKDL	leishmaniose pós kala-azar
RNA-Seq	RNA sequencing
SH2	Domínio de homologia Src
sIL-6R	Receptor solúvel da IL-6
T	Linfócitos
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral <i>alpha</i>
Treg	Linfócitos T reguladores
VL	Leishmaniose visceral
WT	Wild type/ selvagens

Sumário

Resumo.....	XI
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Figuras.....	XIV
Lista de Abreviaturas.....	XV
1. Introdução.....	18
1.1 Leishmanioses.....	19
1.2 Resposta imune na Leishmaniose visceral.....	21
1.3 Neutrófilos na Leishmaniose visceral.....	25
1.4 Sinalização via IL-6.....	26
2. Objetivos.....	29
2.1 Geral.....	30
2.2 Específicos.....	30
3. Material e Métodos.....	31
3.1 Animais.....	32
3.2 Parasitos e Infecção.....	32
3.3 Separação e cultura de células do baço.....	33
3.4 Citometria de fluxo.....	33
3.5 Análise Histopatológica do Fígado.....	34
3.6 Isolamento de Neutrófilos.....	34
3.7 Cultura de neutrófilos.....	35
3.8 Quantificação da produção de ROS por quimioluminescência.....	35
3.9 Produção de NO.....	36
3.10 Produção de citocinas por ELISA.....	36
3.11 Apoptose dos neutrófilos.....	37
3.12 Extração de RNA e confecção do DNA complementar (cDNA).....	37
3.13 PCR em tempo real.....	38
3.14 Pacientes, indivíduos assintomáticos e controles.....	38
3.15 Amostras de Sangue Periférico Total Humano, e obtenção de leucócitos para RNA-seq.....	39
3.16 Extração de RNA de Sangue Total Humano.....	40
3.17 RNA-seq, bioinformática e análise de dados.....	40

3.18 Análise estatística.....	40
4. Resultados.....	43
4.1 A infecção por <i>L. infantum</i> induz a expressão de IL-6.....	43
4.2 Animais IL-6 ^{-/-} são incapazes de controlar o parasitismo nos tecidos alvo.....	44
4.3 Animais deficientes para IL-6 não interferem com a quantidade de macrófagos e células dendríticas no infiltrado inflamatório.....	47
4.4 Animais deficientes para IL-6 apresentam maior quantidade de neutrófilos no baço após infecção por <i>L. infantum</i>	49
4.5 As funções leishmanicidas dos neutrófilos são afetadas na ausência da IL-6.....	52
4.6 Infecção por <i>L. infantum</i> aumenta a sobrevivência de neutrófilos deficientes para IL-6.....	55
4.7 A migração de neutrófilos em animais deficientes para IL-6 é dependente da quimiocina CXCL-2.....	54
4.8 A via de sinalização de IL-6 não altera respostas Th1 e Th17 durante a LV.....	56
4.9 A produção de IL-10 por células CD3 ⁺ CD4 ⁺ é regulada positivamente em animais deficientes para IL-6.....	59
4.10 Análise transcriptômica em pacientes, e identificação de genes diferencialmente expressos na via de sinalização da IL-6 durante a LV.....	61
4.11 Validação em pacientes dos possíveis alvos encontrados no RNAseq.....	64
5.Discussão.....	65
6. Conclusões.....	77
7.Referências.....	79

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada endêmica em mais de 98 países. É causada pelo parasito protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e ao gênero *Leishmania* (Alvar et al., 2012; "Leishmaniasis," 2016). Atualmente esse gênero abriga mais de 20 espécies conhecidas por serem patogênicas a humanos (Sacks & Kamhawi, 2001). Devido a grande variedade de espécies, a sintomatologia clínica é altamente variável e apresenta-se dividida em quatro formas distintas da doença, sendo a Leishmaniose cutânea (LC) (Reithinger, 2016; Scott & Novais, 2016), Leishmaniose mucocutânea (LM) (Goto & Lauletta Lindoso, 2012; Goto & Lindoso, 2010) e a leishmaniose visceral (VL). Ainda, pacientes com LV podem desenvolver, após o tratamento, uma forma cutânea conhecida por leishmaniose pós kala-azar (PKDL) (Alvar et al., 2012; Kaye & Scott, 2011; Mukhopadhyay, Dalton, Kaye, & Chatterjee, 2014; Pace, 2014; Zijlstra, 2016).

As Leishmanioses afetam várias regiões do mundo e sua distribuição geográfica abrange principalmente áreas tropicais e subtropicais das Américas, Ásia, África e Europa (*Control of the leishmaniasis: Report of a WHO expert committee*, 1990). Estima-se que 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de VL, e 0,7 a 1,2 milhões de LC, surgem a cada ano no mundo (Alvar et al., 2012). Em 2014 foi reportado que mais de 90% dos casos de LV concentram-se em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sul do Sudão e Sudão ("Leishmaniasis," 2016).

O ciclo biológico de transmissão da leishmaniose envolve a participação de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado, sendo que o ciclo no invertebrado ocorre no inseto vetor pertencente à subfamília Phlebotominae, conhecido popularmente como flebotomíneo ou "mosquito palha". Esses insetos são divididos em dois gêneros distintos que variam de acordo com a localização geográfica das espécies que os compõem, sendo eles, *Lutzomyia*, predominante distribuída no novo mundo, e *Phlebotomus* no velho mundo (Pace, 2014; Sacks & Kamhawi, 2001).

A transmissão ao hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo feito pela fêmea do flebótomo no momento em que fagócitos infectados são ingeridos juntamente com a alimentação sanguínea. Os parasitos passam por um estágio de desenvolvimento que os classificam em subgrupos de acordo com a parte do intestino do inseto que os mesmos colonizam. Logo são divididos em três subgêneros distintos: *Viannia*, *Leishmania* e *Sauroleishmania* (Bates, 2007; Killick-Kendrick, 1999). No tubo digestivo do inseto, as células infectadas ingeridas são rompidas liberando as formas amastigotas.

Dentro de 12-18 horas os parasitos transformam-se em promastigotas procíclicas e se aderem ao trato digestivo médio e anterior do flebotomíneo (Sacks & Kamhawi, 2001). Cerca de 48-72 horas, após diversas multiplicações, os parasitos transformam-se em sua forma infectante, promastigotas metacíclicas, e estão prontos para serem inoculados. Finalmente migram pelo esôfago e causam um bloqueio na probóscide do flebotomíneo forçando-o a regurgita-los diretamente na ferida do hospedeiro vertebrado, reiniciando um novo ciclo biológico (Sacks & Kamhawi, 2001; Séguin & Descoteaux, 2016). No mamífero, ao infectar os fagócitos, o parasito altera sua forma de promastigota para amastigota e, assim, é capaz de sobreviver e prosperar no ambiente hostil do fagolisossomo, uma organela celular especializada no combate aos microorganismos (McConville & Naderer, 2011; Séguin & Descoteaux, 2016).

Na leishmaniose cutânea ou muco-cutânea, o hospedeiro vertebrado pode desenvolver lesões ulcerativas na pele ou mucosa, respectivamente lesões essas que podem tornar-se progressivamente destrutivas em indivíduos imunossuprimidos (Goto & Lauletta Lindoso, 2012). A forma mais grave entre as leishmanioses é a LV, que afeta principalmente a medula óssea, o baço e o fígado dos indivíduos infectados. A LV tem um espectro de distribuição distinto e é causada pelos agentes etiológicos *Leishmania infantum* no novo mundo e *Leishmania donovani* no velho mundo (*Control of the leishmaniases: Report of a WHO expert committee*, 1990; Ready, 2014; Sacks & Kamhawi, 2001). O Brasil é endêmico para *L. infantum* e abriga a maioria dos casos de LV nas Américas (Harhay, Olliaro, Costa, & Costa, 2011).

A terapêutica padronizada inclui o antimonial pentavalente e anfotericina, contudo, a resistência a essas drogas vem aumentando ao longo do tempo e o custo de internação é alto (Sundar, Gupta, Rastogi, Agrawal, & Murray, 2000). A urgência por novas drogas estimula a busca por biomarcadores menos invasivos, mas que reflitam a evolução da doença (Olliaro, Vaillant, Sundar, & Balasegaram, 2012).

1.2 Resposta imune na Leishmaniose visceral

Durante a interação inicial com o parasito, a picada do flebótomo libera as formas promastigotas de *Leishmania* e estimula a secreção salivar (Kamhawi, 2000). A saliva do inseto contém imunomoduladores que são capazes de aumentar a infectividade do parasito, juntamente com a lesão tecidual criada durante a picada do inseto. Nesse momento, há produção de alarminas como a interleucina 33 (IL-33) que, juntamente com a adenosina (ADO), e adenosina monofosfato (AMP) presentes na saliva do flebótomo, e os Padrões Moleculares Associados a Dano Celular (DAMPs), liberados pelo dano tecidual, favorecem o recrutamento de fagócitos para o local da picada (Carregaro et al., 2015).

As formas promastigotas metacíclicas tem como célula hospedeira os por macrófagos (M ϕ) (Handman & Bullen, 2002; Murray & Nathan, 1999b), mas podem ser fagocitadas também por neutrófilos, que são rapidamente recrutados e constituem a primeira linha de defesa contra patógenos (de Oliveira, Rosowski, & Huttenlocher, 2016; Nathan C. Peters, 2008; Peters & Sacks, 2009), ou por células dendríticas (DCs) (L. Sacramento et al., 2015).

Na LV, os neutrófilos rapidamente fagocitam o parasito e são importantes para o estabelecimento da infecção, uma vez que essas células tem tempo de vida curto e entram rapidamente em apoptose. Durante o processo de *clearance* dos neutrófilos apoptóticos, os polimorfonucleares podem ajudar a propagar o parasito. Através de um mecanismo conhecido como "Cavalo de Tróia", os neutrófilos medeiam uma infecção silenciosa em M ϕ (John & Hunter, 2008; Tamás Laskay, Ger van Zandbergen, & Werner Solbach, 2003). Por meio da

“refeição fagocitária” feita pelos MØ, os neutrófilos acabam infectando essas células e impedindo a ativação do seu poder microbicida, o que facilita assim a disseminação da amastigota para outras células (Kaye & Scott, 2011; Nathan C. Peters, 2008).

Os fagócitos mononucleares constituem o principal tipo celular do hospedeiro que é permissivo ao parasito. Acredita-se que inicialmente as DCs são as responsáveis por transportar os parasitos do sítio inicial da infecção para os linfonodos. No linfonodo, a produção de Interleucina 12 (IL-12) pelas DCs infectadas, dão início a uma resposta protetora mediada por linfócitos (T) CD4⁺, do subtipo T helper 1 (Th1) (Scott, Pearce, Cheever, Coffman, & Sher, 1989).

pós as primeiras 24 horas de infecção ocorre o recrutamento de monócitos,, estes são rapidamente infectados e tornam-se a população celular dominante (Kaye & Scott, 2011). A presença de células Th1, e a produção de *Interferon gamma* (INF- γ) por essas células, medeiam os mecanismos efetores dos macrófagos, aumentando a sua capacidade por regular positivamente a produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Olekhnovitch & Bousso, 2015). A síntese de iNOS é induzida por citocinas como o INF- γ , e é responsável pela produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos infectados, levando assim, a eliminação do parasito (Olekhnovitch & Bousso, 2015).

A imunidade à leishmaniose visceral depende de vários fatores, que variam desde a espécie e virulência do parasito à diferenças na genética do hospedeiro. Juntos esses fatores podem culminar no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa protetora mediada por células Th1. A produção de citocinas que atuam na proliferação e manutenção desse subtipo celular, como IL-12 e INF- γ , respectivamente (Ghalib et al., 1995), são importantes para limitar o crescimento do parasito. A potencialização da resposta protetora desenvolvida na LV, depende de citocinas como o Fator de Necrose Tumoral *alpha* (TNF- α), que também atua na intensificação dos mecanismos efetores dos macrófagos (Kumar et al., 2014).

Além dessas citocinas efetoras, sabe-se que uma resposta mediada por linfócitos T helper 2 (Th2) induz a produção de citocinas como as Interleucinas 4 (IL-4), 5 (IL-5) e 13 (IL-13). Esse *network* de citocinas é capaz de desmontar uma resposta eficaz contra o parasito por diminuir a produção NO e ROS por

macrófagos infectados, deixando o hospedeiro susceptível à infecção (Rebecca J. Faleiro, Rajiv Kumar, Louise M. Hafner, & Christian R. Engwerda, 2014; Rodrigues, Cordeiro-da-Silva, Laforge, Silvestre, & Estaquier, 2016).

O desenvolvimento de uma resposta imune protetora se baseia na presença de citocinas importantes para o estabelecimento da resposta Th1. Porém, é preciso que os mecanismos de imunorregulação do sistema imune, como a produção de citocinas reguladoras por células TCD4⁺, ou por linfócitos T reguladoras (Treg), como a Interleucina 10 (IL-10) e o Fator de crescimento tumoral *beta* (TGF- β), não esteja desregulado, pois a combinação dessas citocinas podem influenciar uma mudança no perfil de resposta, levando a manutenção de um ambiente supressor, e a diminuição da capacidade leishmanicida dos macrófagos, levando o indivíduo à susceptibilidade durante a LV (Rodrigues et al., 2016).

A complexidade e diversidade da resposta imune durante a LV constrói um desafio para a compreensão de como cada indivíduo é capaz de modular resposta imune ao parasito. Os indivíduos que desenvolvem VL podem expressar diferentes formas clínicas da doença dependendo da resposta imunitária desenvolvida. Pacientes com LV podem apresentar três formas da doença, a assintomática, mais comum em adultos, a oligossintomática, e a forma sintomática (Chappuis et al., 2007).

A primeira forma, assintomática, o sistema imunológico monta uma resposta celular rápida e eficiente predominantemente Th1, inicialmente mediada pela produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), com subsequente estimulação da produção de IFN- γ e aumento do potencial microbicida dos macrófagos através da produção de NO e ROS (Kumar et al., 2014). Esse paciente também apresenta reatividade cutânea de hipersensibilidade tardia (DTH) positiva para antígeno solúvel de leishmania (SLA), sem manifestação clínica da doença. A segunda, a forma oligossintomática, o paciente apresenta sorologia positiva para LV e sinais e sintomas de uma infecção sistêmica generalizada, com febre, fadiga, perda de apetite, fraqueza, perda de peso e em alguns casos, hepatomegalia e esplenomegalia de pequeno grau, podendo evoluir ou não para a forma clássica de LV (Bacellar; & M.Carvalho, 2005; Badaro et al., 1986b).

Quando o parasito dissemina pelo sistema linfático e vascular, resulta na infecção de fagócitos no baço, no fígado e na medula óssea. Assim, com o decorrer da doença, os pacientes tornam-se sintomáticos, e como resultado da infiltração desses órgãos, os indivíduos podem apresentar esplenomegalia, hepatomegalia, febre, perda de peso, anemia, hipergamaglobulinemia, trombocitopenia e neutropenia também são frequentes (Badaro et al., 1986a; Chappuis et al., 2007; Rodrigues et al., 2016). Outra alteração importante é a diminuição do número de neutrófilos deixando o hospedeiro mais susceptível a infecções bacterianas. Juntos, esses sinais e sintomas podem intensificar a gravidade da doença e levar o paciente a óbito, caso não haja o tratamento adequado (Belo et al., 2014).

Fatores como idade, gênero e genética estão associados com a sintomatologia das leishmanioses (Belo et al., 2014; Belo et al., 2013). No Brasil, a LV é mais frequente em indivíduos menores de 10 anos (58%) e o gênero masculino é proporcionalmente o mais afetado (61%) (Brasil, 2006). A razão da maior suscetibilidade em crianças pode ser explicado pelo estado de imaturidade imunológica, agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além da maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV, uma vez que a infecção nem sempre condiz com a doença clínica e uma grande parte da população adulta possui a forma assintomática (Brasil, 2006; Chappuis et al., 2007).

Outra dificuldade da LV no indivíduo adulto é o tempo de diagnóstico, que geralmente é longo, e quanto maior o tempo, pior o prognóstico da doença e risco de óbito. Na leishmaniose visceral a diferença hormonal também é um fator relevante para a incidência da doença, uma vez que homens apresentam maior ocorrência de LV, podendo estar relacionado com a maior exposição ao vetor, e também à produção de testosterona, que é associada a maior exacerbação da doença (Snider, Lezama-Davila, Alexander, & Satoskar, 2009).

1.3 Neutrófilos na Leishmaniose visceral

Dentre os leucócitos circulantes, os neutrófilos compõem a principal barreira do sistema imune inato contra microrganismos, além de serem o tipo leucocitário mais abundante na circulação sanguínea. Apresentam um curto período de vida de cerca de 8 a 12 horas, período esse que pode ser prolongado durante o processo inflamatório e quando infectados por *leishmania sp.* (Mayadas, Cullere, & Lowell, 2013; Mócsai, Walzog, & Lowell, 2015). Os neutrófilos proliferam e diferenciam-se através das células precursoras da medula óssea. Receptores de quimiocina como o CXCR4 e CXCR2 expressos em sua membrana são essenciais para a manutenção e liberação, respectivamente, dos neutrófilos da medula comandando o endereçamento aos tecidos (Borregaard, 2010; de Oliveira et al., 2016).

Os mecanismos multifacetados dos neutrófilos implicam no *crosstalk* entre a resposta imune inata e adaptativa. Esse processo ocorre através da sua interação com outras células do sistema imune. Após a ativação do neutrófilo, citocinas como a Interleucina 8 (IL-8) são liberadas e modulam o recrutamento de outros tipos celulares para o tecido, dando início ao processo inflamatório (Mantovani, Cassatella, Costantini, & Jaillon, 2011; Mayadas et al., 2013). Embora o papel dos neutrófilos durante a fase aguda das infecções seja a maioria do nosso conhecimento atual, a sua participação na fase crônica de doenças inflamatórias ainda não foi totalmente entendida (E. D. Carlsen, Y. Liang, et al., 2015).

Atualmente está bem estabelecido que distintas espécies de *Leishmania* podem modular o recrutamento e a função dos neutrófilos no local da infecção (Hurrell, Regli, & Tacchini-Cottier, 2016). A lesão tecidual causada pela picada do flebotômíneo leva ao recrutamento imediato de neutrófilos e o primeiro contato com as formas promastigotas de *Leishmania* induz a uma dualidade de resposta que se é observada dependendo da espécie do parasito e da via de infecção realizada. Assim, os neutrófilos podem desempenhar papel importante na proteção do hospedeiro por conduzir a destruição do parasito através dos seus mecanismos microbicidas, como o "*burst oxidativo*", a degranulação e a liberação de

<i>Neutrophil</i>	<i>Extracelular</i>	<i>Traps</i>	(NETs)
-------------------	---------------------	--------------	--------

(Brinkmann et al., 2004; Eric D. Carlsen et al., 2013; E. D. Carlsen, Y. Liang, et al., 2015; Mélanie Charmoy, Auderset, Allenbach, & Tacchini-Cottier, 2010; Benjamin P. Hurrell et al., 2015; Ritter, Frischknecht, & van Zandbergen, 2009).

Pacientes com LV podem desenvolver neutropenia, seja pelo mal funcionamento na geração de neutrófilos na medula óssea ou pela retenção dessas células em órgãos infectados (Rodrigues et al., 2016). Ainda não se sabe qual a implicação desse processo para a progressão da doença. Estudos em modelos animais mostram que a depleção de neutrófilos pode resultar no aumento da carga parasitária e na susceptibilidade durante a infecção por *L. donovani* (Emma McFarlane et al., 2008), mostrando que essas células exercem papel no *killing* do parasito. Já na LC, durante infecção por *L. mexicana* ou *L. major*, os neutrófilos exercem função importante em modular a resposta imune por impedir a formação de uma resposta imune protetora (Melanie Charmoy et al., 2015; B. P. Hurrell et al., 2015).

É possível que a neutropenia esteja relacionada com os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Analisando apenas os parâmetros sorológicos, pacientes com LV apresentam uma elevada concentração plasmática de citocinas e observa-se uma mistura de resposta imunológica durante a forma ativa da doença, a chamada “tempestade de citocinas”. Pacientes sintomáticos apresentam concentrações elevadas de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ IL-12), Th2 (IL-4 e IL-13), T regulador (Treg) (IL-10, IL-6, IL-27), Th17 (IL-17) e TNF quando comparados com os assintomáticos (A. S. Costa et al., 2012; C. H. Costa, Pereira, & Araujo, 1990; Duthie et al., 2014; Gama, Costa, Pereira, Gomes, & Corbett, 2004; Hailu, van der Poll, Berhe, & Kager, 2004; Khoshdel et al., 2009; Peruhype-Magalhaes et al., 2005).

1.4 Sinalização via IL-6

A produção da IL-6 é restrita a pouco tipos celulares. Essa citocina é produzida principalmente por hepatócitos e algumas células do sistema imune. Ao ser secretada, a IL-6 liga ao seu receptor- α (IL-6R) específico ligado à membrana celular. Além do IL-6R, faz-se necessário pelo menos uma

subunidade da glicoproteína transdutora de sinal 130, o β -receptor (gp130), para que o complexo de sinalização seja formado (Hunter & Jones, 2015).

A IL-6 pode sinalizar por meio de três diferentes vias de sinalização, que são elas: a Jak/Stat, MAPK e PI3K. Em contraste com o IL-6R, a gp130 é ubiquamente expressa por todos os tipos celulares como uma alternativa para células que não expressam o IL-6R. Os neutrófilos são capazes de clivar o receptor da membrana através da expressão de metaloproteinases, como a ADAM 10 e a ADAM 17 ou através de *splicing* e, assim, são capazes de sinalizar por um processo chamado de "trans-sinalização".

No processo de transsinalização, a geração do receptor solúvel da IL-6 (sIL-6R) medeia a formação do complexo de sinalização, sIL-6R/gp130. Por meio da homodimerização de gp130, ocorre a fosforilação de motivos tirosina quinases associados à receptores da família de Janus kinase (Jak). Uma vez fosforilados, os motivos de tirosina oferecem vários locais de ligação para diversas proteínas que contenham o domínio de homologia Src (SH2), assim, essas proteínas podem funcionar como mediadores de diversas vias de transdução de sinal sob os estímulos da IL-6 (Kinase et al., 2016; McLoughlin et al., 2004; Wolf, Rose-John, & Garbers, 2014).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, que apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias, com capacidade de modular a maioria dos aspectos do sistema imune inato. Através da trans-sinalização, a IL-6 induz a alteração do recrutamento de neutrófilos por monócitos por suprimir principalmente quimiocinas atraentes para polimorfonucleares como CXCL1, CXCL8 e CX3CL1 e aumentar a liberação de quimiocinas que recrutam monócitos, como CCL2, CCL8, CXCL5 e CXCL6 (Hurst et al., 2001). Além de seu papel no recrutamento, a IL-6 também induz a diferenciação de monócitos para macrófagos nos sítios de infecção por induzir a expressão do receptor de Fator estimulante de colônia monócito (M-CSF) por mecanismos dependentes de ERK (Chomarat, Banchereau, Davoust, & Palucka, 2000; Jenkins et al., 2004).

Outro papel da IL-6 é seu efeito sobre células T. Sob ativação de células apresentadoras de antígeno (APCs), a liberação de IL-6 induz a diferenciação de linfócitos T *naïve* para os perfis Th2 e Th17 (S. Diehl et al., 2002; Sofi, Li, Kaplan, & Chang, 2009). Também tem sido descrito que a IL-6 suprime a diferenciação

de células Treg induzida por TGF- β , pois a combinação de IL-6 com TGF- β induz a diferenciação de células Th17 por induzir a fosforilação de STAT3 e por inibir a expressão de SOCS3 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Assim, a supressão de SOCS3 *in vitro* em células T *naive* induz a expressão de ROR- γ t e não de FOXP3. Esses dados reforçam a ideia que a via de sinalização de IL-6 é necessária para suprimir a expressão de FOXP3 e induzir a diferenciação e manutenção de células Th17 (Kimura & Kishimoto, 2010).

A IL-6, junto com IL-1 β e TNF, induzem a produção de várias quimiocinas que levam a ativação de fagócitos. Ainda na fase inicial da infecção, IL-1 β e TNF apresentam-se como efetoras no controle da LV por induzir a ativação de macrófagos infectados resultando na produção de NO e ROs (R. J. Faleiro, R. Kumar, L. M. Hafner, & C. R. Engwerda, 2014; Soong, Henard, & Melby, 2012). Recentemente, IL-1 β foi apontada como citocina essencial no controle da infecção por *Leishmania* sp. por induzir a produção de NO em macrófagos de camundongos via ativação de inflamassoma (Lima-Junior et al., 2013). Entretanto, IL-1 β também induz a produção de IL-6 e, em conjunto, promovem o aumento de IL-8. Segundo Costa *et al.*, (2013) essa tríade (IL-1 β , IL-6 e IL-8) são responsáveis pelas alterações hemodinâmicas nos indivíduos com LV, visto que diminuem a expressão de albumina e outras moléculas envolvidas na cascata de coagulação (D. L. Costa et al., 2013).

A IL-6 está envolvida em muitos processos de regulação da imunidade inata e adaptativa. Recentemente, Santos, P. et al. (dos Santos et al., 2016), demonstraram a correlação entre o aumento dos níveis de IL-6 no soro de pacientes com o desenvolvimento e a gravidade da LV. Baseando-se nas recentes descobertas, a IL-6 tornou-se um alvo de destaque devido seu efeito modulador, e a sua participação na progressão de várias doenças (Katsuhiko Ishihara & Toshio Hirano, 2002; Markus F. Neurath & Susetta Finotto, 2011; Van Der Poll, Zijlstra, & Mevissen, 1995).

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1 Geral

Determinar o papel de IL-6 na resistência ou suscetibilidade a infecção experimental por *Leishmania infantum*

2.2 Específicos

- I. Avaliar a expressão de IL-6 durante a infecção por *L. infantum*.
- II. Caracterizar o infiltrado inflamatório (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e a produção de citocinas no baço e fígado durante a infecção por *L. infantum*.
- III. Avaliar a capacidade estimuladora da IL-6 na ativação e funções efetoras mediadas por neutrófilos infectados com *L. infantum*.
- IV. Investigar o perfil de quimiocinas que atuam no recrutamento dos neutrófilos durante a infecção por *L. infantum*.
- V. Identificar alterações gênicas relacionadas a via de sinalização da IL-6 em pacientes com LV.
- VI. Validar os genes alvos encontrados em pacientes com LV.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (*wild type/WT*) e camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes para IL-6 (*interleukin 6/ IL-6^{-/-}*), com 6 semanas de idade. Os animais pesando entre 18g e 22g foram mantidos em micro-isoladores em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) e receberam água e ração *ad libitum* no biotério do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP. Processo Nº 01912015-1.

3.2 Parasitos e Infecção

Os experimentos foram realizados com formas promastigotas de *Leishmania infantum* (isolado HU-USF 14) cedidos pelo prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida da Universidade Federal de Sergipe. Os parasitos foram mantidos a 25° C em meio Schneider (Sigma- 10 Aldrich, Saint Louis, MO, USA), suplementado com soro bovino fetal a 20% (GIBCO BRL), 2% de urina masculina, 1% de penicilina e estreptomicina e 2 mM de L-glutamina (ambos Sigma-10 Aldrich, Saint Louis, MO, USA) em garrafas de cultura estéreis (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA). Os camundongos foram infectados por via intravenosa (iv) através da veia do plexo orbital com 10⁷ formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* em PBS 1x estéril. Após 4 e 6 semanas de infecção, o fígado e o baço de camundongos WT e IL-6^{-/-} foram removidos, pesados e um fragmento da porção inferior do baço e do lóbulo esquerdo do fígado, foram triturados em um volume de 2 ml de meio de cultura Schneider 10%. O volume final será centrifugado a 3000 rpm, 25°C, 10 minutos e ressuspensionado em 1 ml de Schneider 10%. As diluições seriadas foram feitas em placas estéreis de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA), conforme a técnica de diluição limitante descrita anteriormente por (Titus, Marchand, Boon, & Louis, 1985). As contagens dos poços positivos foram realizadas

no dia 15 após a diluição nas placas, e o número de parasitos foi estimado como descrito por BUFFET et al., 1995 (Buffet, Sulahian, Garin, Nassar, & Derouin, 1995)

3.3 Separação e cultura de células do baço

As células do baço foram obtidas de camundongos *WT* e *IL6^{-/-}* após 4 e 6 semanas de infecção. O baço foi macerado em condições estéreis, com PBS 1x pH 7,2, e filtrado em *Cell strainer* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1500xrpm durante 10 min a 4°C e posteriormente incubada com tampão de lise de hemácias a temperatura ambiente durante 2 minutos. A reação foi bloqueada acrescentando-se meio PBS 1x estéril, e as células foram lavadas duas vezes em PBS 1x estéril e então ressuspensas em RPMI 5%. As células foram diluídas em Azul de Trypan para quantificação e análise de viabilidade com auxílio da Câmara de Neubauer. Após contagem, as células foram ajustadas na concentração de 1×10^7 células/mL. A cultura de células do baço foi realizada em placas de cultura com 48 poços (Corning, New York, USA) em uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células/poço em um volume final de 500µl, mantidas por um período de 24 horas em estufa de BOD, 5% de CO₂ a 37°C. Decorrido o período de incubação, o sobrenadante foi coletado para mensurar as concentrações de IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α e IFN-γ e determinadas através de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo “sandwich”, utilizando-se o kit comercial (DuoSet; R&D Systems, Minneapolis, MN) seguindo as recomendações do fabricante.

3.4 Citometria de fluxo

Os leucócitos obtidos à partir do baço de camundongos *WT* e *IL6^{-/-}* após 4 e 6 semanas de infecção foram quantificados com auxílio da Câmara de Neubauer, e tiveram a viabilidade determinada para fenotipagem através de citometria de fluxo. As células foram incubadas com 10% de soro de coelho para o bloqueio ligações inespecíficas por 30 minutos a 4°C. As células foram então marcadas com a utilização de anticorpos complexados a fluorocromos para os seguintes antígenos (todos os anticorpos BD Biosciences ou Biolegend, San Diego, CA), CD11b (M1/70)

, CD11c (N418), CD62L (MEL-14), Ly6G (1A8), F4/80 (BM8), MHC-II (2G9). Para marcação intracelular as células foram cultivadas com PMA (50 ng/mL) e ionomicina (500 ng/ml) (ambos Sigma) na presença de GolgiPlug (BD Biosciences) por 4 h. Subsequente ao período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x, por 1 minuto à 8000x rpm, e ressuspensas em 120µl de PBS-formol a 4% e então foram bloqueadas as ligações inespecíficas com 10% de soro de coelho, e permeabilizadas com Kit Cytofix/Cytoperm de acordo com as recomendações do fabricante e fenotipadas com anticorpos contra os seguintes antígenos CD3 (145-2C11), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), IFN-γ (XMG1.2), IL-17 (TC11-18H10), IL-10 (JES5-16E3). As células foram adquiridas pelo BD FACSCanto II e analisadas usando FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

3.5 Análise Histopatológica do Fígado

A análise histopatológica foi feita em amostras de tecido hepático e esplênico fixadas em formaldeído a 10%, por 48h, e álcool 70% até o processamento das amostras, onde foram submetidas à uma bateria de desidratação em soluções com concentrações crescentes de álcool e xilol, e então incluídas em parafina, cortadas com auxílio do micrómetro (5 µm de espessura) e dispostos em lâminas. As lâminas foram incubadas a 60°C para fixação do corte e em seguida lavadas em xilol para retirar o excesso de parafina, e hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 70%). Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratados com concentrações crescentes de álcool (do álcool 70% ao absoluto), lavados com xilol e montados em lamínula com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil).

3.6 Isolamento de Neutrófilos

Neutrófilos da medula óssea de camundongo WT e IL-6^{-/-} de animais infectados foram obtidos por meio de separação em gradiente constituído por soluções a 72% e 65% de Percoll (Percoll, Fiuka Biochemica, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Sweden.), 3ml cada. Cerca de 2ml do lavado do canal medular (fêmur e tíbia) foram colocados

sobre o gradiente de Percoll e centrifugados a 1200g, 20°C, com 0 m/s² de aceleração e desaceleração, durante 30 minutos. Em seguida, a camada de células mononucleares foi descartada e a de polimorfonucleares, sobre a solução a 72%, colocada em tubo plástico estéril de 15mL. Os polimorfonucleares obtidos foram lavados em meio RPMI-1640. As células foram diluídas em Líquido de Turk (NewProv. Paraná, Brasil) na concentração de (1:20) para quantificação e análise de viabilidade com auxílio da Câmara de Neubauer, então tiveram a concentração acertada para 10⁶ mL⁻¹ e foram ressuspensas em RPMI-1640 suplementado com 5% soro fetal bovino inativado (GIBCO BRL), 5% de penicilina e estreptomicina (ambos Sigma-10 Aldrich, Saint Louis, MO, USA). A determinação da pureza foi através da contagem diferencial em lâmina de vidro com auxílio de Cytospin (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA). Apenas as amostras com pureza acima de 90% foram consideradas nos ensaios.

3.7 Cultura de neutrófilos

Neutrófilos derivados da medula óssea de camundongos WT e IL-6^{-/-} foram cultivados por, 2h, 4h e 24h em meio RPMI-1640 suplementado com 5% soro fetal bovino inativado (GIBCO BRL), 5% de penicilina e estreptomicina (ambos Sigma-10 Aldrich, Saint Louis, MO, USA), com promastigotas de *L. infantum* obtidas de culturas de fase estacionária de crescimento (da Silva & Sacks, 1987) (2 parasitos: 1 célula), mantidas em estufa de BOD, 5% de CO₂ a 37°C. Na presença de parasitos opsonizados ou não com 5% de soro fresco de camundongo WT *naïve* inativado pelo calor por 30 min a 24°C.

3.8 Quantificação da produção de ROS por quimioluminescência

Neutrófilos recém isolados da medula óssea foram cultivados em placa estéril e livre de LPS de cultura celular de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA) em meio RPMI 1640, suplementado com BSA 2%, sem fenol, numa concentração de 5x10⁵ células/ml em um volume final de 200µl. As células foram estimuladas com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* (5

parasitos : 1 célula) em estufa de BOD, 5% de CO₂ a 37°C. Decorrido o período de incubação, o metabolismo oxidativo de neutrófilos foi avaliado através da medida da produção total de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por Quimioluminescência (QL) dependente de luminol (QLlum), conforme metodologia adaptada de Andrade MF, et. al., 2013 (Andrade et al., 2013). As células foram então transferidas para placas de luminômetro de 96 poços (LB center model 960, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), e foi adicionado a sonda quimioluminescente luminol (100 µmol/L). Após incubação por 3 minutos a 37°C, foram adicionados os diferentes estímulos: PMA (10⁻⁷mol/L), em poços específicos para estimular as células e, imediatamente, foi medida a QL durante 2 horas a 37°C em luminômetro de microplacas (modelo LB 960 Centro, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha) e análise foi obtida através do cálculo da área integrada.

3.9 Produção de NO

A produção *in vitro* de NO foi analisada em sobrenadante coletado de cultura de neutrófilos, pré-estimulados ou não com 200 ng.ml⁻¹ de LPS ultrapuro (InvivoGen, tlrl-pekips) ou 10 ng.ml⁻¹ de IFN-γ (Invitrogen), 24hs após o período de infecção. A acumulação de NO₂⁻, foi usada como indicador da produção de NO, e foi mensurada usando o reagente de Griess (Miranda, Espey, & Wink, 2001). A reação foi lida imediatamente na densidade óptica (DO) de 540 nm em leitor de miniplacas (EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos em mM sendo determinados pela comparação com a curva-padrão, obtida pelo uso de nitrito de sódio (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil) em concentrações de 200 a 0,9 µM.

3.10 Produção de citocinas por ELISA

A produção de citocinas foram analisadas pela técnica enzimática do tipo *sandwich*, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante para as seguintes citocinas TNF-α, CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2) IL-6, IL-1α, IL-1β, IL-17, IL12p40, e IFN-γ (BD Biosciences e R&D Systems Minneapolis, MN, USA ou R&D Systems

Minneapolis, MN, USA). Amostras de tecido de fígado foram coletadas e os fragmentos foram pesados, e triturados em 1 mL de solução contendo *cocktel* de inibidores de protease, Complete (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A leitura da reação colorimétrica foi realizada a 450nm em leitor de microplacas (EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

3.11 Apoptose dos neutrófilos

Neutrófilos derivados da medula óssea de animais WT e IL-6^{-/-} foram distribuídos em placas estéreis e livre de LPS de cultura de 48 poços (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA). Foram plaqueadas 1x10⁶ células/poço em um volume total de 500 µL. As células mantidas em repouso durante 60 minutos, em estufa à 37 °C, e então infectadas com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* (5 parasitos:1 célula). Decorridas 18 horas as a placa foi lavada PBS 1x. As células foram incubadas com 10% de soro de coelho para o bloqueio de ligações inespecíficas por 30 minutos à 4°C. As células foram então marcadas com a utilizados anticorpos complexados a fluorocromos para os seguintes antígenos CD11b (M1/70), Ly6G (1A8) , Anexina-V e PI (BD Biosciences). As células foram adquiridas pelo BD FACSCanto II e analisadas usando FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

3.12 Extração de RNA e confecção do DNA complementar (cDNA)

O RNA foi extraído de fragmentos do baço e fígado coletados após 4 e 6 semanas de infecção e de animais controles não infectados. O método de extração RNA combinou a utilização do reagente TRIzol (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) seguida pela utilização parcial do Kit de extração Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Wilmington, DE), e submetido à confecção do DNA complementar (cDNA) sintetizado através de uma reação de transcrição reversa com a utilização da enzima Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) (200 U/µl), de acordo com as

especificações do fabricante. A análise relativa de transcritos dos genes alvos foi realizada por PCR em tempo real utilizando-se do cDNA confeccionado.

3.13 PCR em tempo real.

Subsequente reação de PCR em tempo real foi realizado usando o sistema SYBR Green (Invitrogen) no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA). Todos os resultados foram normalizados com GAPDH ou $\beta 2M$ constitutivamente expresso e analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold*) ou linha de corte. O ajuste dos valores foi feito utilizando a seguinte formula $2^{-(Ct_{target} - Ct_{\beta-actin})}$. O resultado foi calculado com a fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ da amostra} - \Delta Ct \text{ da amostra controle}$, onde $\Delta Ct = Ct \text{ gene estudado} - Ct \text{ GAPDH ou } \beta 2M$. O número de vezes de expressão diferencial do RNA mensageiro comparado com o controle foi definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os *primers* e sequências utilizados durante a reação de PCR em tempo real estão listados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Sequências		
Gene	Senso	Antisenso
GAPDH	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA	ATGTCA TCA TAC TTG GCA
$\beta 2M$	CACCCCCACTGAGACTGATACATA	TCACATGTCTCGATCCCAGTA
IL-6	TTCTACCCCAATTTCCAAT	CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC
CXCL1	CTTCCCTTGGACATTTTGTGTC	TTTGAACGTCTCTGTCCCGAG
CXCL2	CCCCTGGTTCAGAAAATCATCC	TCCCAGTCTCTTTCACTGT
AR	ACCAAGTTTCTTCAGCTTCCG	TTGTCCATCTTGTCTGCTTCG
HSPB1	GCGTGGCAGGTATCTTGT	GTAGTCGCATTGATGATCTGGA

3.14 Pacientes, indivíduos assintomáticos e controles.

Os indivíduos envolvidos no estudo são residentes no estado de Sergipe, área endêmica para LV causada por *L. infantum*. A seleção de pacientes, bem como

a coleta das amostras, foram realizadas pelos colaboradores Dr^o. Roque Pacheco de Almeida e Dr^a Amélia Maria de Jesus, ambos docentes do Departamento de Medicina do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. Todos os indivíduos do estudo, ou pra os responsáveis, foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes do início das coletas das amostras. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética, anexado à Plataforma Brasil, parecer nº 681.184 em 06 de junho de 2014. Sendo um total de 24 pacientes divididos em 4 grupos: indivíduos sintomáticos na fase ativa da doença com LV clássica (G1), os mesmos indivíduos após 180 dias de tratamento G2, indivíduos DTH positivos e que não desenvolveram a doença (G3), e indivíduos controles saudáveis (G4) **Tabela 1**. Foram excluídos do estudo indivíduos com Diabetes Mellitus, Hepatites virais, portadores do vírus HIV, imunosuprimidos e gestantes.

Tabela 2: Pacientes e sujeitos controles envolvidos no estudo.

Grupo	N	F	M	Idade em anos (Média ± DP)
G1: LV	6	3	3	18,8 ± 11
G2: Curados/Tratados	6	3	3	16,8 ± 11
G3: Assintomáticos	7	4	3	15,5 ± 12,6
G4: Controles	5	5	-	23,0 ± 6,3

LV: Leishmaniose viscera; M: masculino; F: feminino; DP: desvio padrão.

3.15 Amostras de Sangue Periférico Total Humano, e obtenção de leucócitos para RNA-seq.

As amostras de sangue dos indivíduos incluídos no estudo foram coletadas com seringas estéreis e descartáveis, a vácuo, em tubos *PAXgene Blood RNA* (PreAnalytix, Suíça). Após a coleta, o sangue foi diluído em igual volume de PBS1X, aplicado em gradiente de Ficoll (BD Biosciences) e centrifugado a 400xg por 30 min, à temperatura ambiente. A interface obtida, contendo o PBMC, foi coletada, centrifugada por 10 min a 400xg e lavada duas vezes, o sedimento formado foi ressuspenso em 3 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (GIBCO BRL) e os leucócitos quantificados em câmara de Neubauer.

3.16 Extração de RNA de Sangue Total Humano.

A extração de RNA de sangue total (amostras de 2,5 mL) foi realizada com o kit *PAXgene RNA Blood* (PreAnalytix, Suíça) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Wilmington, DE) e a integridade analisada por meio de eletroforese capilar em chip com o instrumento 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). O RNA depletado de rRNA e enriquecido de RNA mensageiros codificadores foram utilizados conforme as instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA).

3.17 RNA-seq, bioinformática e análise de dados.

Os dados brutos do sequenciamento de cada biblioteca contidos nos arquivos .fastq foram processados para a análise qualitativa por meio dos programas FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) e Trimmomatic (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014). Após serem filtrados de sequências de baixa qualidade, os arquivos .fastq foram submetidos à etapa de mapeamento de *reads* no genoma humano (versão GRCh37, Ensembl) através do programa TopHat2 (Kim et al., 2013). A quantificação das *reads* mapeadas foi realizada com o programa HTSeq (<http://www.huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html>), cujos arquivos de saída (*output*) contendo a contagem das *reads* mapeadas em cada gene foram usadas como arquivos de entrada (*input*) no pacote EdgeR (Robinson, McCarthy, & Smyth, 2010), para cálculo da expressão gênica diferencial. O *heatmap* foi criado no software R (*The R project for statistical Computing*).

3.18 Análise estatística

Os resultados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (DP). As diferenças nos valores obtidos entre dois diferentes grupos foram determinadas pelo teste t de *Student* não pareado. Para comparações de múltiplos grupos, a análise de variância (ANOVA) foi utilizada seguida pelo pós-teste de Bonferroni. As análises foram realizadas através do programa GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego

CA, EUA) e consideradas estatisticamente significativas quando os valores de p eram iguais ou menores a 0,05.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 A infecção por *L. infantum* induz a expressão de IL-6.

Já foi demonstrado que o aumento de IL-6 pode estar relacionado à cronicidade e a progressão de diferentes patologias (Fonseca, Santos, Canhão, & Choy, 2009; Mauer, Denson, & Brünig, 2015; Park et al., 2010; Wunderlich et al., 2012). Dados obtidos por nosso grupo mostram que, durante a infecção por *L. infantum*, pacientes que apresentam concentrações elevadas de IL-6 no soro durante a fase ativa da doença são irresponsivos ao tratamento convencional com Glucantime® (Antimoniato de N-metilglucamina), anfotericina B versus anfotericina B lipossomal. Ainda, pacientes que exibiram níveis séricos acima de 200 pg/ml dessa citocina foram a óbito (dos Santos et al., 2016).

Para entender a significância dessa observação e definir o papel da IL-6 na LV, avaliamos se a infecção por *L. infantum*, em nosso modelo experimental, induz a expressão de IL-6. Para isso, animais C57BL/6 foram infectados com 1×10^7 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (isolado HU-USF 14) por via plexo orbital. Decorrido quatro e seis semanas pós-infecção, fragmentos dos órgãos alvo, baço e fígado, foram coletados para quantificação da expressão relativa de mRNA (Figura 1A-B), e para dosagem da proteína, foi feita uma cultura de células do baço, as células foram reestimuladas com antígeno de leishmania, e mantidas em cultura por 72h (Figura 1D).

Como esperado, observamos um aumento expressivo de IL-6 no baço, com pico na 4ª semana pós-infecção nos animais infectados por *L. infantum*. Uma vez que o perfil de expressão de IL-6 foi determinado, e sabendo que a produção de IL-6 por neutrófilos (Tecchio, Micheletti, & Cassatella, 2014) é importante para mediar diversos mecanismos efetores nessas células (G. Kaplanski, V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani, & C. Farnarier, 2003), avaliamos se a infecção por *L. infantum* é capaz de induzir a expressão de mRNA para IL-6 por polimorfonucleares. Para esse propósito, 1×10^6 neutrófilos isolados da medula óssea de animais WT, foram infectados com formas promastigotas na proporção de (5:1) parasito: célula, e mantidos em cultura por 24hs. De maneira interessante, os neutrófilos infectados

com o parasito induzem a expressão de IL-6 (Figura 1C), demonstrando que a infecção por *L. infantum* modula, de maneira positiva, a produção de IL-6 tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Figura 1: A expressão de IL-6 é regulada positivamente durante a infecção por *L. infantum*. Expressão de mRNA para IL-6 no baço (A) e fígado (B) de animais WT infectados na 4ª e 6ª semanas pós-infecção (s.p.i) analisada por qPCR. Neutrófilos derivados da medula óssea de animais WT foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* (5:1) ou LPS (100ng/ml) por 24h em a 37°C e a expressão de mRNA para IL-6 foi mensurado por qPCR (C). Em D, a produção de IL-6 foi determinada no sobrenadante de células do baço de animais WT reestimuladas *in vitro* com antígeno de *L. infantum* (50µg/ml) por 72 horas pela técnica de ELISA (C). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, #P <0,05 comparado ao grupo controle WT; *P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

4.2 Animais IL-6^{-/-} são incapazes de controlar o parasitismo nos tecidos alvo.

O aumento da IL-6 sistêmica tem sido relacionada com a amplificação da resposta inflamatória e com a evolução da doença para um estado inflamatório crônico (K. Ishihara & T. Hirano, 2002; M. F. Neurath & S. Finotto, 2011). Para o estabelecimento de uma resposta imune protetora na LV, é necessário que haja o desenvolvimento de uma resposta inflamatória capaz de eliminar o parasito, e ao mesmo tempo, essa resposta deve ser controlada, para que o dano tecidual associado à inflamação seja evitado.

Para determinar o papel da IL-6 na modulação da resposta imune e sua influência no padrão de resistência ou suscetibilidade à LV, animais geneticamente deficientes para IL-6 (IL-6^{-/-}) e selvagens (WT) foram infectados com 1×10^7 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento por via plexo

orbital. Inicialmente, avaliamos na 4ª e 6ª semana pós-infecção o número de parasitos no baço (Figura 2A) e no fígado (Figura 2B) pela técnica de diluição limitante (Titus et al., 1985), bem como a inflamação através preparação de lâminas histológicas do tecido por coloração de H&E (Figura 2E). A lesão hepática foi determinada nos mesmos períodos por meio do acompanhamento do peso do órgão dos animais, no baço (Figura 2C) e no fígado (Figura 2D), e pela quantificação das proteínas de fase aguda, aminotransferase de alanine (ALT) (Figura 2F) e aminotransferase de aspartate (AST) (Figura 2G), e proteínas totais do soro (Figura 2H). Observamos que na ausência da IL-6, os animais são mais suscetíveis à infecção, apresentando maior carga parasitária no baço (Figura 2A) e no fígado (Figura 2B) quando comparados com WT na 4ª semana pós-infecção. Tendo em vista que a resposta imune na LV é órgão-específica e o controle da replicação de parasitos no fígado está associado ao desenvolvimento de granulomas, investigamos a presença do infiltrado inflamatório no fígado desses animais.

Observamos que o aumento de parasitos no fígado de animais IL-6^{-/-} na 4ª semana de infecção (Figura 2B) foi acompanhado com menor presença de infiltrado inflamatório nesse órgão na 4ª e 6ª semana pós-infecção (Figura 2E).

Pela mensuração das proteínas de fase aguda no soro de animais WT e IL-6^{-/-} infectados, observamos um aumento significativo na produção de ALT (Figura 2F) no fígado de animais WT na 6ª semana pós-infecção. Enquanto que animais IL-6^{-/-} apresentam uma redução não significativa da produção dessa proteína (Figura 2F), quando comparado ao WT infectado nessa mesma semana. A mensuração de AST (Figura 2G) e de proteínas totais (Figura 2H) no soro desses mesmos animais infectados pelo parasito, mostrou que não há diferenças na quantidade dessa transaminase e de proteínas no soro entre os animais WT e IL-6^{-/-}. Nossos resultados demonstram que a IL-6 possui papel importante no controle da infecção por *L. infantum*.

Figura 2: Animais IL-6^{-/-} são susceptíveis a infecção por *L. infantum*. Carga parasitária de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a s.p.i. no baço (**A**) e no fígado (**B**) determinada pela técnica de diluição limitante. Quantificação do peso dos órgãos alvo, baço (**C**) e fígado (**D**) de animais WT e IL-6^{-/-} infectados. Cortes histológicos do fígado de animais WT e IL-6^{-/-} em diferentes períodos pós infecção. As lâminas foram confeccionadas em parafina e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), as fotos foram tiradas com a magnitude de 200x (**E**). A concentração de transaminases (**F-G**) e proteínas totais (**H**) no soro de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a s.p.i. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, #P <0,05 comparado ao grupo controle WT; *P <0,05 comparado ao grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

4.3 Animais deficientes para IL-6 não interferem com a quantidade de macrófagos e células dendríticas no infiltrado inflamatório.

A função dos macrófagos como principais células hospedeiras e efetoras durante a LV já é amplamente estudada (Contreras et al., 2014; Naderer & McConville, 2008; Podinovskaia & Descoteaux, 2015; Soong, 2008). Como a IL-6 atua no recrutamento dessas células para o sítio de infecção, avaliamos as populações de macrófagos, identificadas pela expressão dos marcadores CD11b⁺F4/80⁺, e populações de células dendríticas, pela marcação de CD11b⁺CD11c⁺, no baço de animais WT e IL-6^{-/-} infectados na 4^a e a 6^a semanas pós-infecção por citometria de fluxo.

Observamos que não há diferença na porcentagem de MØs (Figura 3A;C) e de DCs (Figura 3E) em ambos períodos analisados. Quanto ao número absoluto de células, com relação aos MØs (Figura 3B), não foi observado diferença significativa entre os grupos. Já com relação as DCs (Figura 3E), observamos uma redução significativa na 6^a semana pós-infecção nos animais IL6^{-/-} em comparação com aos animais WT, coincidindo com a diminuição da carga parasitária (Figura 2). Quando avaliado o estado de ativação dessas populações celulares, observamos que não há diferença entre os grupos com relação a expressão de MHC-II, tanto em MØs (Figura 3D), quanto em DCs (Figura 3H).

Figura 3: Animais deficientes para IL-6 não interferem com a quantidade de MØs e DCs no infiltrado inflamatório. Células do baço de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a (s.p.i) foram marcadas com F4/80, CD11b, CD11c e MHC-II, e foram avaliadas por citometria de fluxo. Os gráficos de barra representam a porcentagem (**A;E**) e o número absoluto (**B;F**) de macrófagos e células dendríticas, respectivamente, determinada no *gate* F4/80⁺CD11b⁺, e CD11c⁺CD11b⁺. Os dot plots representam a frequência de macrófagos (**C**) e de células dendríticas (**G**). A ativação dessas populações foram avaliadas pela expressão de MHC-II, dentro do *gate* F4/80⁺CD11b⁺ para macrófagos, e CD11c⁺CD11b⁺ para Células dendríticas. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, #P <0,05 comparado ao grupo controle WT; *P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

4.4 Animais deficientes para IL-6 apresentam maior quantidade de neutrófilos no baço após infecção por *L. infantum*.

Sabe-se que os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local de infecção nas leishmanioses (Ribeiro-Gomes & Sacks, 2012). Diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* apontam diferentes papéis para essas células (Eric D. Carlsen et al., 2015; E. D. Carlsen, Y. Liang, et al., 2015; B. P. Hurrell et al., 2015; Nathan C. Peters, 2008). Já é descrito que a IL-6 é uma das citocinas com capacidade de ativar os polimorfonucleares e mediar suas funções efetoras. Sendo assim, avaliamos o papel dos neutrófilos durante a infecção por *L. infantum*.

Para esse fim, animais WT e IL-6^{-/-} foram infectados via intravenosa pelo plexo orbital com 1×10^7 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum*. Decorrido 4 e 6 semanas pós-infecção, o infiltrado inflamatório foi avaliado por citometria de fluxo. Observamos que animais IL-6^{-/-}, na 4ª semana pós-infecção, apresentaram aumento significativo na porcentagem da população de neutrófilos no baço, caracterizados como Ly6G⁺CD11b⁺ (Figura 5A) em relação aos animais WT. O mesmo não foi observado para o número absoluto de células (Figura 5B). Porém na sexta semana pós-infecção, há diminuição do número absoluto desse infiltrado neutrofílico nos animais IL-6^{-/-} quando comparados ao WT (Figura 5A-B).

Para determinar o estado de ativação dos neutrófilos, analisamos no baço a expressão de CD62L nas populações Ly6G⁺CD11b⁺ (Figura 4D-E). O CD62L é uma L-selectina importante durante o rolamento dos neutrófilos. Assim, a perda de expressão dessa molécula permite avaliar o estado de ativação dessas células (Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007). De acordo com a figura 5D, a porcentagem de células que expressam CD62L⁺ está aumentada em neutrófilos de animais IL-6^{-/-} na 4ª, e 6ª semana pós-infecção em comparação com neutrófilos de animais WT, indicando que essas células estão em um estado menos ativadas. Para confirmar esse resultado, utilizamos neutrófilos derivados da medula óssea de animais IL6^{-/-} e WT e avaliamos a ativação dessas células após a infecção *in vitro* com *L. infantum*. Como controle positivo foi utilizado o LPS (Figura 4F-G).

É possível observar que a população Ly6G⁺CD11b⁺ de animais IL6^{-/-} apresentam um aumento na expressão de CD62L⁺ em comparação ao WT quando

estimulados com *L. infantum* ou com *L. infantum*+LPS (Figura 5F). Confirmamos assim, que a IL-6 atua no controle do infiltrado neutrofílico e na ativação dessas células durante a LV

.

Figura 4: Animais deficientes para IL-6 apresentam maior infiltrado neutrofílico no baço após infecção por *L. infantum*. Células do baço de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a s.p.i foram marcadas com Ly6G, CD11b, e CD62L, foram avaliadas por citometria de fluxo. Os gráficos de barra representam a porcentagem (**A**) e o número absoluto (**B**) de neutrófilos, determinada no *gate* Ly6G⁺CD11b⁺. Os dot plots representam a frequência de neutrófilos (**C**). A ativação de neutrófilos foi avaliada pela expressão de CD62L dentro do *gate* Ly6G⁺CD11b⁺ (**D-E**). 1x10⁶ neutrófilos derivados da medula óssea de animais WT e IL-6^{-/-} foram cultivados com formas promastigotas de *L. infantum* (5:1) parasito:célula, à 37 °C por 4h, e estimulados ou não com 100ng/ml de LPS. As células foram marcadas para Ly6G, CD11b, e CD62L, a média de fluorescência da expressão de CD62L dentro do *gate* Ly6G⁺CD11b⁺ está representada no gráfico de barras (**F**), e a frequência em (**G**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, #P <0,05 comparado ao grupo controle WT; *P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

4.5 As funções leishmanicidas dos neutrófilos são afetadas na ausência da IL-6.

A produção de ROS e NO são de suma importância no combate ao parasito leishmania, principalmente por mediar a morte dos mesmos dentro do fagolisossomo (Green, Crawford, Hockmeyer, Meltzer, & Nacy, 1990; Murray & Nathan, 1999a; Roma et al., 2016). Os neutrófilos são células que agem na eliminação de microrganismos, sendo a primeira célula do sistema imune a ser recrutada durante uma infecção, e atua no controle dos microorganismos utilizando-se do seu principal mecanismo de morte, a produção de ROS e NO (Winterbourn & Kettle, 2013).

Como visto anteriormente, os neutrófilos de animais IL6^{-/-} estão em um estado menos ativado (Figura 5). Sendo assim avaliamos se a ausência da IL-6 interfere nos mecanismos microbicidas desempenhados por essas células. Para isso, utilizamos 2x10⁵ neutrófilos isolados da medula óssea de animais IL6^{-/-} e WT. Após o isolamento utilizando a formação de gradiente com o reagente Percoll™, as células foram infectadas com *L. infantum* na proporção de (5:1) parasito:célula e cultivadas por 24h a 37 °C. A produção de NO foi dosada no sobrenadante coletado da cultura através do método de Griess.

Verificamos que neutrófilos oriundos de animais IL-6^{-/-} apresentam uma menor produção de NO quando infectados com *L. infantum*, em comparação com neutrófilos de animais WT (Figura 5-A). Esse fenômeno também foi observado quando essas células foram infectadas com *L. infantum* +LPS.

Para averiguar a produção de ROS, 2x10⁵ células foram infectadas com formas promastigotas de *L. infantum* opsonizadas com soro de animais WT naive na proporção de (2:1) parasito:célula. Decorrido 2h, a quantificação de ROS foi quantificada pelo método de quimiluminescência.

A produção de ROS é diminuída nos neutrófilos deficientes para IL-6 em relação ao WT, quando infectados com *L. infantum*. Interessante que, mesmo sob estímulo máximo com PMA, a produção de ROS ainda manteve-se comprometida em neutrófilos IL-6^{-/-} (Figura 5B-C). Em conjunto, os dados apresentados até o

presente demonstram que na LV, a via de sinalização mediada por IL-6 atua tanto na ativação quanto nos efeitos microbicidas dos neutrófilos.

Figura 5: As funções leishmanicidas dos neutrófilos são alteradas na ausência da IL-6. 2×10^5 neutrófilos derivados da medula óssea de animais WT e IL-6^{-/-} foram cultivados com formas promastigotas de *L. infantum*. Após 24h à 37 °C na concentração de (5:1) parasito:célula, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a dosagem de NO através do método de Griess. Para a mensuração de ROS por Quimioluminescência, 2×10^5 neutrófilos derivados da medula óssea foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* opsonizadas com 5% de soro inativado de animais WT *naive*. Após 2h à 37 °C na concentração (2:1) parasito:célula. Os gráficos de barras representam a quantidade de NO produzida pelos neutrófilos estimulados ou não com LPS (100ng/ml) (A), e a quantidade de ROS produzida estimulados com PMA (10^{-7} M) (B). O gráfico de linhas representa a contagem de fótons por minutos relativa a quantificação de ROS (C). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, #P <0,05 comparado ao grupo controle WT; *P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

4.6 Infecção por *L. infantum* aumenta a sobrevivência de neutrófilos deficientes para IL-6.

Ainda é questão de debate se a IL-6 tem como função induzir, atrasar, ou não exerce nenhum efeito sobre a apoptose dos polimorfonucleares (Asensi et al., 2004; Chalaris et al., 2007). Sendo assim, buscamos entender se a alteração do infiltrado neutrófilo observada em animais IL-6^{-/-} infectados (Figura 5) seria em decorrência de morte celular por apoptose. Para esse fim, utilizamos 1×10^6 neutrófilos isolados da medula óssea de animais IL-6^{-/-} e WT e infectamos com formas promastigotas de *L. infantum* na proporção de (5:1) parasito:célula. Após 18h

de cultura, a apoptose foi avaliada pela marcação positiva para Anexina-V na população LY6G⁺CD11b⁺ por citometria de fluxo.

Verificamos que neutrófilos deficientes para IL-6, na presença do parasito, apresentam maior sobrevivida, quando analisada a expressão de Anexina-V na população LY6G⁺CD11b⁺Anexina-V⁺PI⁻, quando comparado ao controle WT

infectado (Figura 6A). Foi possível analisar também a população LY6G⁺CD11b⁺Anexina-V⁺PI⁺, para apoptose tardia ou necrose. Constatamos que nos animais IL-6^{-/-}, os neutrófilos infectados por *L. infantum* tem a sobrevivida aumentada em relação ao controle não infectado, mas não difere em relação ao WT infectado (Figura 6B). Assim, durante a LV, a via de sinalização da IL-6, além de propiciar a ativação e efeitos microbicidas, também está envolvida com a apoptose dos neutrófilos infectados.

Figura 6: Infecção por *L. infantum* aumenta a sobrevivida de neutrófilos deficientes para IL-6. Neutrófilos derivados da medula óssea de animais WT e IL-6^{-/-} foram cultivados com formas promastigotas de *L. infantum* (5:1) parasito:célula, após incubação à 37 °C por 18h, as células foram marcadas para Ly6G, Anexina-V e PI e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são representados pelos gráficos de barra para a porcentagem de Apoptose (A), e para Apoptose tardia/ Necrose (B). Os dot plots representam a frequência das populações Anexina-V⁺PI⁻ e Anexina-V⁺PI⁺ dentro do gate Ly6G⁺ CD11b⁺. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, [#]P <0,05 comparado ao grupo controle WT; *P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

4.7 A migração de neutrófilos em animais deficientes para IL-6 é dependente da quimiocina CXCL-2.

Tendo em vista que as quimiocinas IL-8 (CXCL-1/KC) e MIP-2 (CXCL-2) são os principais mediadores envolvidos no recrutamento de neutrófilos para o sitio de infecção (Ribeiro-Gomes & Sacks, 2012) e a via de sinalização mediada por

IL-6 regula o recrutamento de leucócitos para o sítio infeccioso (Kaplanski, 2003), avaliamos se o aumento do infiltrado neutrofílico observado em animais IL-6^{-/-} (Figura 5) poderia ser em decorrência de alteração da liberação dos mediadores quimiotáticos para neutrófilos. Nesse sentido, animais WT e IL-6^{-/-} foram infectados com 1x10⁷ formas promastigotas em fase estacionária de crescimento por via plexo orbital, e na 4ª e 6ª semana pós-infecção mensuramos a produção de CXCL-1 e CXCL-2 no fígado pela método Elisa (Figura 7A-B) e a expressão relativa de mRNA para as mesmas quimiocinas foi determinada no baço desses animais (Figura 7C-D).

Observamos que não há diferenças na produção de CXCL1 (Figura 7A), e CXCL2 (Figura 7B) no fígado entre os grupos avaliados. Com relação a expressão de mRNA no baço para CXCL-1, esta encontra-se diminuída no baço de animais IL-6^{-/-} na 4ª semana pós-infecção quando comparada ao WT infectado (Figura 7D). Enquanto que a expressão de CXCL-2 é aumentada em animais IL-6^{-/-} tanto na 4ª quanto na 6ª semana pós-infecção (Figura 7D).

Buscamos então, analisar o perfil de quimiocinas que é produzido no momento inicial da infecção por LV. Para isso, animais WT e IL-6^{-/-} foram infectados com 1x10⁷ formas promastigotas em fase estacionária de crescimento via peritoneal. Decorrido 18h, foi realizado o lavado peritoneal e a coleta do sobrenadante para quantificação das quimiocinas por ELISA (Figura 7E-F).

Observamos que a infecção por *L. infantum* induz a produção de CXCL-1 em animais WT e que animais deficientes para IL-6 essa produção é drasticamente reduzida em comparação com o controle WT (Figura 7E). O mesmo não ocorre para a produção de CXCL-2 (Figura 7F). Este mediador encontra-se elevado em animais IL-6^{-/-} em comparação ao controle WT. Dessa maneira, concluímos que a via de sinalização da IL-6 é importante para a indução da produção de CXCL-1, porém a produção de CXCL-2 não é afetada por essa citocina e parece mediar o recrutamento dos neutrófilos durante a LV em animais IL6^{-/-}.

Figura 7: A migração de neutrófilos em animais deficientes para IL-6 é dependente de CXCL-2. Fragmentos do fígado de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a s.p.i. foram triturados e o sobrenadante foi utilizado para a mensuração de proteínas pelo método ELISA. Os gráficos de barra representam a quantidade total de KC (A); MIP-2 (B). Os resultados representam a expressão de mRNA no baço de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a s.p.i., KC (C), e MIP-2 (D). Quantificação de proteínas no lavado peritoneal de animais infectados com 1×10^7 *L. infantum* após 18h, o gráfico de barras representam a quantidade de KC (E), e MIP-2 (F). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, #P <0,05 comparado ao grupo controle WT; & P <0,05 comparado ao grupo controle IL6^{-/-}; *P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

4.8 A via de sinalização de IL-6 não altera respostas Th1 e Th17 durante a LV.

Uma vez que o perfil de produção de citocinas pró inflamatórias é importante para o estabelecimento de uma resposta imune protetora no hospedeiro na LV (Rebecca J. Faleiro et al., 2014), nós avaliamos a produção das principais citocinas que poderiam atuar diretamente nos mecanismos efetores responsáveis

pelo controle da replicação do parasito. Logo, quantificamos a produção de IL-12p40 (Figura 8A), TNF- α (Figura 8B), IL-1 α (Figura 8C), IL-1 β (Figura 8D), IL-17 (Figura 8E) e IFN- γ (Figura 8F) no fígado de animais IL-6^{-/-} e WT infectados.

De acordo com a figura 8, observamos que não há diferença significativa na produção de todas as citocinas mencionadas entre os grupos avaliados em todos os períodos avaliados, sugerindo que a ausência da IL-6 não interfere na produção de citocinas do perfil Th1 e Th17 .

Figura 8: A via de sinalização de citocinas pró inflamatórias nos animais deficientes para IL-6 não é comprometida. Fragmentos do fígado de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a s.p.i. foram triturados e o sobrenadante utilizado para a mensuração de proteínas através do método ELISA. Os gráficos de barra representam a quantidade total das proteínas IL12-p40 (A); TNF- α (B); IL-1 α (C); IL-17a (D), e IFN- γ (E). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, [#]P <0,05 comparado ao grupo controle WT; & P <0,05 comparado ao grupo controle IL6^{-/-}; *P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

Corroborando a essa hipótese, animais IL-6^{-/-} tem a capacidade de gerar uma resposta Th1 similar ao encontrado no baço de animais WT, tanto em porcentagem (Figura 9A-C) quanto no número absoluto (Figura 9B) dessas células. Observamos também o mesmo fenômeno para a população de células T CD8⁺ IFN-γ⁺ (Figura 9D-F).

Figura 9: *L. infantum* induz a produção de IFN-γ em animais deficientes para IL-6. Células do baço de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a s.p.i foram reestimuladas in vitro com PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) por 4h e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos de barra representam a porcentagem (A/D) e o número absoluto (B/E) de células produtoras de IFN-γ, determinada dentro do *gate* CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺. Os dot plots representam a frequência da produção de IFN-γ por células T CD4⁺ (C) e por T CD8⁺ (F). Os resultados são representativos de três experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, * P < 0,05 comparado aos respectivos grupos controle. (Análise por one-way ANOVA com pós test de Bonferroni).

A IL-17 é uma citocina importante no combate ao parasito por agir sinergicamente com o IFN-γ e assim potencializar a resposta imune contra o parasito (Nascimento et al., 2015). Além de atuar na proliferação dos outros subtipos de células T, a IL-6 juntamente com o TGF-β já está estabelecida como uma citocina chave para a diferenciação de células Th17 (Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, & Rose-John, 2011).

Sendo assim, procuramos analisar a produção de IL-17 pela população de células Th17 no baço de animais IL-6^{-/-} e WT. Verificamos que a produção de IL-17 por células CD3⁺CD4⁺ é diminuída em número absoluto na 4^a semana de infecção (Figura 10B), não havendo diferença significativa para a porcentagem dessa população no mesmo período (Figura 10A;C) em relação ao WT. Porém na 6^a semana pós-infecção, não observamos diferenças significativas para nenhuma das subpopulações, tanto em porcentagem quanto em número absoluto, concluindo que a IL-6 não interfere na resposta de células Th1 e parece influenciar na geração de resposta Th17, conforme esperado, mas somente em períodos iniciais de infecção.

Figura 10: Animais deficientes para IL-6 tem uma alteração da resposta Th17. Células do baço de animais WT e IL-6^{-/-} na 4^a e 6^a s.p.i foram restimuladas in vitro com PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) por 4h e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos de barra representam a porcentagem (A/D) e o número absoluto (B/E) de células produtoras de IL-17, determinada dentro do gate CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺. Os dot plots representam a frequência da produção de IL-17 por células T CD4⁺ (C) e por T CD8⁺ (F). Os resultados são representativos de três experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, [#]P <0,05 comparado aos respectivos grupos controle; ^{*}P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós test de Bonferroni).

4.9 A produção de IL-10 por células CD3⁺CD4⁺ é regulada positivamente em animais deficientes para IL-6.

A IL-10 é uma citocina reguladora da resposta imune e sua produção durante a LV contribui para o estabelecimento da infecção. Isso ocorre pela IL-10 regular a resposta Th1, favorecendo a replicação do parasito nos tecidos alvo (Loeuillet, Bañuls, & Hide, 2016). Como observamos que animais deficientes para a IL-6 conseguem estabelecer uma resposta do tipo Th1 (Figura 9), mas são susceptíveis à infecção por *L. infantum* (Figura 2), então investigamos a produção de IL-10 por células T CD4 no baço de animais WT e IL-6^{-/-} infectados com o parasito.

Verificamos que animais IL-6^{-/-} tem maior produção de IL-10 na 4ª semana pós-infecção quando comparado aos animais WT infectados (Figura 11A-C), fato esse que pode estar relacionado com um aumento na carga parasitária em órgãos-alvo de infecção, e uma diminuída resposta efetora mediada por L Th1.

Figura 11: Animais deficientes para IL-6 tem uma alteração de células TCD4 produtoras IL-10. Células do baço de animais WT e IL-6^{-/-} na 4ª e 6ª s.p.i foram restimuladas in vitro com PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) por 4h e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos de barra representam a porcentagem (A) e o número absoluto (B) de células produtoras de IL-10, determinada dentro do *gate* CD3⁺CD4⁺. Os dot plots representam a frequência da produção de IL-10 por células T CD4⁺ (C). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, #P <0,05 comparado ao grupo controle WT; & P <0,05 comparado ao grupo controle IL6^{-/-}; *P <0,05 comparado o grupo infectado. (Análise por one-way ANOVA com pós test de Bonferroni).

4.10 Análise transcriptômica em pacientes, e identificação de genes diferencialmente expressos na via de sinalização da IL-6 durante a LV.

Para determinar a abundância relativa de mRNA de genes únicos relacionados à via de sinalização da IL-6 em pacientes com a doença ativa, utilizamos a técnica de RNA-Seq. As amostras utilizadas, para este fim, foram obtidas a partir de sangue total de pacientes infectados com *L. infantum* antes (P0) e após o tratamento (P180). Indivíduos assintomáticos (A) e indivíduos saudáveis (C), todos residentes em Aracajú, foram utilizados como controles. A identificação dos genes relacionados à via de sinalização da IL-6 foi realizada através da construção de *networks* de acordo com as seguintes plataformas de bases de dados disponíveis online, *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (<http://www.genome.jp/kegg/>), *NetPath* (<http://www.netpath.org/>), *InnateDB: Systems Biology of the Innate Immune Response*, (<http://www.innatedb.ca/>) e *ImmuNet* (<http://immunet.princeton.edu/>).

Selecionamos todos os transcritos encontrados para as interações entre os genes, como representado na figura 12A. A análise dos genes diferencialmente expressos foi realizada pelo software EdgeR e, para considerá-los diferencialmente expressos entre todas as comparações, foi utilizado o *cutoff* de $p \leq 0.01$ e absoluto ($\log_2\text{foldchange}$) = 1 (Figura 12B).

Como o resultado da análise, podemos observar no heatmap (Figura 12B) que os genes AR (receptor de andrógeno) e o gene HSPB1 (small heat shock protein 1) estão up-regulados nos pacientes doentes em relação aos controles saudáveis e aos indivíduos assintomáticos.

Feita a análise de enriquecimento, através do *Gene ontology* (<http://www.geneontology.org/>) (Figura 12C), verificamos que esses dois novos possíveis alvos da via de sinalização da IL-6 estão relacionados a importantes processos biológicos, principalmente processos que envolvem o sistema imune. A HSPB1 é uma chaperona citoprotetora com função de proteger as células durante o estresse e respostas inflamatórias. Suas funções podem incluir sinalização de estresse, angiogênese, migração celular pela indução de CXCL1 e modulação e regulação do sistema imune (Bakthisaran, Tangirala, & Rao, 2015; Crowe et al.,

2013; Giuliano, Lahni, Wong, & Wheeler, 2011; Huang, Min, Masters, Mivechi, & Moskophidis, 2007; Katsogiannou, Andrieu, & Rocchi, 2014; Morrow, Hightower, & Tanguay, 2015; Okuno, Adachi, Kozawa, Shimizu, & Yasuda, 2016). Já o AR, pode agir através de sinais independentes de andrógeno, e modular o sistema imune inato e adaptativo principalmente para promover a diferenciação de neutrófilos na medula óssea (K.-H. Chuang et al., 2009; J.-J. Lai et al., 2012; T. Ueda, Bruchovsky, & Sadar, 2002). A IL-6 usa de diferentes vias de sinalização e, assim, pode regular diferencialmente a fosforilação de HSPB1 via ativação da cascata de sinalização MAPK/p-38, ou PI3K. Ambos fatores transcripcionais, quando ativados, promove a ativação da HSPB1 que resulta em mudança conformacional, conduzindo a dissociação oligomérica e, subsequente perda da atividade de chaperona (Pratt & Toft, 2011). Sendo assim, HSPB1 pode formar um complexo com AR que resulta em sua transativação e transcrição de genes dependentes dessas moléculas (Zoubeidi et al., 2007). A ativação da transcrição de genes associados ao AR e HSPB1 pode estar relacionada com a gravidade e o desenvolvimento da neutropenia em pacientes com LV.

4.11 Validação em pacientes dos possíveis alvos encontrados no RNAseq.

Como observado anteriormente (Figura 12), os pacientes com a forma ativa da doença apresentam uma maior expressão dos genes AR e HSPB1 (Figura 12B). Para validar esses dados utilizamos da técnica de PCR em tempo real para confirmar a expressão desses dois genes nas amostras de pacientes controles, assintomáticos, doentes e tratados, todos residentes em Aracajú. Em concordância com os dados do RNAseq, porém de forma não significante, o gene HSPB1 está aumentado em paciente doentes quando comparado com os outros grupos analisados (Figura 13A). O mesmo não foi observado para o gene AR (Figura 13B), onde os indivíduos assintomáticos e doentes mostram um aumento, também não significativo quando comparados aos indivíduos controles e tratados. Corroborando a nossa hipótese, o aumento da expressão de HSPB1 e AR, pode estar relacionada com a gravidade da LV.

Figura 13: Validação em pacientes dos possíveis alvos encontrados no RNAseq. Expressão de mRNA extraído do sangue total de indivíduos infectados por *L. infantum* com a doença ativa, e indivíduos após 180 dias de tratamento, indivíduos controles e assintomáticos, para a expressão relativa ao gene endógeno GAPDH. Os gráficos de barras mostram a expressão relativa dos genes HSPB1 (A) AR (B) para todos os indivíduos envolvidos nesse estudo, a análise de expressão foi feita pelo método de qPCR. Os resultados são representativos estão expressos como média $\pm$ DP *P <0,05 utilizado para todas as comparações. (Análise por one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni).

5. Discussão

5. Discussão

O entendimento acerca dos mecanismos necessários para a indução de um padrão de resposta imunológica adequada durante a LV já está bem estabelecido. A produção de citocinas pró inflamatórias relacionadas com o perfil Th1, como a IL-12, o TNF- α , e o INF- γ , por macrófagos e outras células do sistema imune, é crucial para o hospedeiro progredir para a cura (Wilson, Jeronimo, & Pearson, 2005). Outro subconjunto de células que é conhecido por atuar sinergicamente com linfócitos Th1 e contribuir para uma resposta eficiente durante a LV são os linfócitos Th17 (L. A. Sacramento, Cunha, de Almeida, da Silva, & Carregaro, 2014). A IL-6 é uma citocina importante para a polarização desse perfil Th17, e atua juntamente com um microambiente rico em IL-1- β , e TGF- β para a indução desse padrão de resposta imune (Zou & Restifo, 2010).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, que apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias, com capacidade de modular a maioria dos aspectos do sistema imune inato e adaptativo (Hunter & Jones, 2015; Scheller et al., 2011). Recentemente, Santos, P. et al. (dos Santos et al., 2016), demonstraram que pacientes com a forma ativa da LV apresentam níveis significativamente elevados de IL-6 sistêmica, de maneira que pacientes que exibiram níveis acima de 200 pg/ml no soro dessa citocina foram a óbito. Confirmando a correlação entre o aumento dos níveis de IL-6 no soro de pacientes com o desenvolvimento e a gravidade da LV (D. L. Costa et al., 2013). Este mesmo evento pode ser observado em outros trabalhos, onde o aumento da IL-6 sistêmica tem sido relacionado à amplificação da inflamação e a evolução para um estado inflamatório crônico em diversas patologias (Markus F. Neurath & Susetta Finotto, 2011), além de estar ligada ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Katsuhiko Ishihara & Toshio Hirano, 2002).

Atualmente o desenvolvimento de terapias baseadas no bloqueio total da via de sinalização da IL-6 (Nishimoto & Kishimoto, 2008) já são frequentemente usados em pacientes, como o tratamento para artrite (Calabrese & Rose-John, 2014; Fonseca et al., 2009) e outras doenças inflamatórias crônicas. Novos estudos vêm mostrar a eficácia do bloqueio seletivo da IL-6 em diferentes patologias (Barkhausen

et al., 2011; Jones, Scheller, & Rose-john, 2011; Kraakman et al., 2015; Le et al., 2014; Wunderlich et al., 2012) evidenciando a sua importância.

Embora a IL-6 esteja relacionada com a patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas, nossos resultados mostram que a IL-6 desempenha papel importante na imunidade a LV. Nós demonstramos que há uma regulação positiva da IL-6 durante a infecção *in vivo* por *L. infantum*, tanto por células do fígado quanto por células do baço, mesmo após o reestímulo com antígeno de leishmania.

Considerando a ausência de informações consistentes acerca desta citocina na leishmaniose visceral, nesse trabalho, nós buscamos então entender um dos possíveis caminhos que podem estar relacionados com função protetora dessa citocina, uma vez que a deficiência para a IL-6 levou a uma maior carga parasitária nos órgãos-alvo da infecção, o baço e o fígado.

Na LV a resposta imune é órgão-específico, sendo que, nas primeiras semanas de infecção a replicação do parasito é intensa no fígado. A formação de granulomas maduros é de suma importância para restringir a proliferação da leishmania, pois permitem a concentração das células de kupfer, que quando ativadas usam dos seus mecanismos leishmanicidas para eliminar os parasitos, e ao mesmo tempo limitam a inflamação no órgão (Rodrigues et al., 2016).

No granuloma a produção de citocinas e quimiocinas permite a migração de outros leucócitos, principalmente linfócitos T, que contribuem para a maturação do mesmo, e para a resolução da infecção no fígado, enquanto que no baço, o parasito persiste cronicamente (McElrath, Murray, & Cohn, 1988). Observamos em nossos resultados a presença de menor acumulação leucocitária, com uma inflamação mais contida em uma menor área em animais deficientes para a IL6, mostrando a incapacidade de gerar uma resposta inflamatória capaz de eliminar o parasito nesses animais.

Na sexta semana após a infecção, quando observamos estruturas granulomatosas mais robusta e maior infiltrado inflamatório, tanto nos animais deficientes para IL-6, quanto para animais WT, vimos também que ocorre a diminuição da carga parasitária em ambos os grupos, mais evidente nos WT, corroborando à hipótese de que a ausência de inflamação no fígado pode levar ao aumento da replicação do parasito em animais deficientes para a IL-6.

Enquanto que a infecção por *L. donovani*, animais deficientes para a IL-6, conseguem controlar rapidamente a infecção através do aumento na produção de INF- γ , e pela formação de formação granulomatosa robusta, o que acarreta na diminuição da carga de parasitos nos órgãos alvos (Murray, 2008). Corroborando com nossos resultados, estudos anteriores mostraram o papel protetor que a IL-6 desempenha em outras doenças infecciosas, como por exemplo, mediando a expansão máxima de uma resposta de células T CD4⁺ de memória em uma segunda resposta ao vírus da Influenza (Strutt et al., 2016); atuando na proteção contra infecções bacterianas por *L. monocytogenes* (Hoge et al., 2013); e através do seu efeito negativo no controle da expansão de células CD25⁻FOXP3⁻IL-10⁺CD4⁺, pela produção de IL-6 por DCs infectadas por *L. donovani* (Cd et al., 2009).

A defesa contra os parasitos do gênero *Leishmania* é mediada principalmente pelos macrófagos, mas, após a inoculação dos parasitos pela picada do flebótomo, as primeiras células que migram para o local da infecção são os neutrófilos (Peters et al., 2008). Os neutrófilos são infectados pelas formas promastigotas, que sobrevivem dentro do fagolisossomo dessas células, porém não se diferenciam em amastigotas (Laufs et al., 2002). Sendo então, os macrófagos as células hospedeiras que contribuem para o estabelecimento da infecção e persistência do parasito (Handman & Bullen, 2002; Podinovskaia & Descoteaux, 2015).

O principal mecanismo que os macrófagos utilizam para matar o parasito é através da geração de RNS e ROS, que ocorre via indução de iNOS. Assim, tanto a intensificação da produção de NO dos fagócitos, quanto a geração de ROS são importante mediadores que controlam a proliferação do parasito na LV (Bogdan, Röllinghoff, & Diefenbach, 2000; Murray & Nathan, 1999b). Carneiro e colaboradores mostraram que quando a produção de ROS é inibida em cultura de monócitos infectados por *L. braziliensis*, ocorre a proliferação de promastigotas viáveis no sobrenadante na cultura (Carneiro et al., 2016).

A presença dos macrófagos e o estado de ativação dessas células nos órgãos alvos foram avaliados em nosso modelo, e nossos resultados mostram que não há diferenças na percentagem entre os animais WT e deficientes para IL-6. Mostrando que apesar da IL-6 ser importante em induzir a migração de monócitos para o sítio inflamatório através da indução de quimiocinas como CCL2, CCL8,

CXCL5 e CXCL6 (Gilles Kaplanski, Valérie Marin, Félix Montero-Julian, Alberto Mantovani, & Catherine Farnarier, 2003), durante a infecção por LV essa citocina não mostrou ser de principal importância para o recrutamento dessas células. Mostramos também, que não há diferenças no perfil de ativação e na migração dessas células entre os animais WT e deficientes para IL-6.

Observamos que na sexta semana após a infecção há uma diminuição de DCs no baço de animais IL-6^{-/-}, e diminuição da carga parasitária nesse mesmo órgão. Sendo que, há uma lacuna na literatura no que se diz aos efeitos da via de sinalização da IL-6 nas DCs. Um recente trabalho publicado por Ohno e colaboradores mostra que a IL-6 atua negativamente nas Dcs, regulando a expressão de MHC-II e diminuindo a produção de IL-12, incapacitando a polarização das células TCD4⁺ antígenos específicas a combater o tumor, isso ocorre pela dramática redução da produção de INF- γ pelos linfócitos no microambiente tumoral. (Ohno et al., 2016). Porém, nossos resultados mostram que a expressão de MHC-II não é alterada na ausência da IL-6 na LV

Já o papel dos neutrófilos na patogênese das leishmanioses ainda não é bem definido. Na leishmaniose cutânea, os neutrófilos são encontrados em grandes quantidades nos tecidos infectados de camundongos e em lesões de pacientes (Daboul, 2010; Falcao et al., 2015). Na infecção por *L. braziliensis*, Conceição et. al. mostrou que neutrófilos humanos contribuem para o estabelecimento de um ambiente inflamatório através da produção de ROS, e de mediadores responsáveis pelo recrutamento de células T, porém, podem não contribuir para o *clearance* do parasito (Conceicao et al., 2016). Em contrapartida, trabalhos que utilizam da mesma espécie de leishmania, devido aos distintos perfis de resposta desenvolvidos pelo hospedeiro apresentam resultados divergentes (Hurrell et al., 2016). Como é possível encontrar estudos também com infecção por *L. brasiliensis*, em que mostram que o neutrófilo de camundongo ativado é capaz de matar o parasito e mediar o *clearance* (E. D. Carlsen, Z. Jie, et al., 2015; Falcao et al., 2015). O mesmo já não é observado em infecções por *L. amazonensis*, onde a ativação de neutrófilos de camundongos infectados não resulta na morte do parasito por essas células (E. D. Carlsen et al., 2013).

Charmoy et. al. demonstrou que durante a infecção por *L. major*, neutrófilos de camundongos resistentes (C57BL/6) ou susceptíveis (BALB/c) a LC desenvolvem respostas diferentes que influenciam no desenvolvimento da resposta imune específica a *L. major* (M. Charmoy et al., 2007).

No que se refere à LV, McFarlane e colaboradores demonstraram que ao depletar neutrófilos de camundongos infectados por *L. donovani*, ocorre o aumento da carga parasitária, sugerindo assim, um papel protetor para os neutrófilos na resposta a LV (E. McFarlane et al., 2008).

Outra questão relativa ao papel dos polimorfonucleares, pouco esclarecida na imunidade à LV, é que durante a infecção por *L. infantum*, ou *L. donovani*, pacientes que apresentam a forma ativa da doença desenvolvem neutropenia, que é caracterizada pela diminuição expressiva de neutrófilos no sangue (Haddy, Rana, & Castro, 1999), porém, não se sabe ainda o impacto que isso causa no desenvolvimento da doença.

Nossos resultados mostram que durante a infecção por *L. infantum*, na ausência da IL-6, há um aumento antecipado do infiltrado neutrofílico no baço na quarta semana pós-infecção, o que coincide com a fase de proliferação do parasito e com o pico de parasitemia nesse órgão. Interessante que a percentagem dessas células mantém-se elevada até a resolução da infecção.

Avaliamos o perfil de ativação dos polimorfonucleares pela expressão de CD62L. O CD62L é uma L-selectina expressa de maneira constitutiva na superfície do polimorfo e participa ativamente dos mecanismos de rolamento e adesão ao endotélio, uma vez que, a clivagem do CD62L tem sido associado a ativação celular (Hafezi-Moghadam, Thomas, Prorock, Huo, & Ley, 2001; von Andrian et al., 1993), buscamos avaliar a expressão de CD62L nos neutrófilos do baço e em culturas de neutrófilos derivados da medula óssea. Na ausência da IL-6, os neutrófilos de animais IL-6^{-/-} são menos ativados em comparação com os WT. A via de sinalização da IL-6 é importante para a ativação de neutrófilos e por mediar funções efetoras dessas células (Borish, Rosenbaum, Albury, & Clark, 1989).

Nossos resultados mostram que a ausência da IL-6 interfere com a ativação, e com uma das importantes funções microbidas dos neutrófilos, o *burst* respiratório. Como mencionado acima, a geração de ROS e RNS é o principal

mecanismo utilizado por macrófagos para mediar a morte das formas amastigotas de leishmania. Na ausência da IL-6 vimos que a produção de ROS e NO é significativamente diminuída. Apesar do número elevado de polimorfonucleares, essas células encontram-se em um estado menos ativado, e o principal mecanismo leishmanicida está prejudicado, indicando que o parasito é beneficiado quando os neutrófilos encontram-se incapacitados, o que suporta a proliferação das formas promastigotas e subsequente estabelecimento da infecção.

Os neutrófilos usam de outros mecanismos microbicidas, como a liberação de NETs, um processo de morte celular, onde ocorre a liberação de uma rede de DNA rica em histonas e proteínas derivadas dos grânulos, que apesar de ser eficaz na morte de bactérias e fungos (Brinkmann et al., 2004; Brinkmann & Zychlinsky, 2012), não é capaz de matar algumas espécies de leishmania, como a *L. donovani*. Na infecção por essa espécie de leishmania, a liberação de NET é eficaz somente para conter o parasito e facilitar a fagocitose por macrófagos, e não medeia diretamente a morte dos mesmos (Gabriel, McMaster, Girard, & Descoteaux, 2010). Já na LC, a *L. amazonensis* é susceptível à liberação de NET e contribui para a diminuição da carga parasitária (Guimarães-Costa et al., 2009).

Outra forma de morte que pode atuar na patogênese da LV é a apoptose dos neutrófilos, sendo que a infecção dessas células por formas promastigotas de leishmania é transitória, e devido ao seu tempo de vida curta, os neutrófilos entram em apoptose rapidamente (Krysko, D'Herde, & Vandenabeele, 2006; T. Laskay, G. van Zandbergen, & W. Solbach, 2003).

Na tentativa de esclarecer o papel dos neutrófilos nas leishmanioses, vários autores abordam a interação dos neutrófilos apoptóticos infectados com diferentes espécies de leishmania, e também com as outras células do sistema imune, assim, o processo de apoptose dos neutrófilos pode ajudar a conter a infecção em um primeiro momento, ou pode ajudar a disseminar o parasito pela rápida e subsequente infecção de macrófagos (Falcao et al., 2015; Prates et al., 2011; Ribeiro-Gomes & Sacks, 2012; Sarkar et al., 2013; van Zandbergen et al., 2004).

As informações acerca da participação da IL-6 na apoptose de neutrófilos também são inconsistentes (Afford, Pongracz, Stockley, Crocker, & Burnett, 1992; Chalaris et al., 2007; Wright, Cross, Edwards, & Moots, 2014). Aqui nós mostramos

que a infecção por *L. infantum* induz a apoptose em neutrófilos, e que na ausência da IL-6 ocorre o atraso na apoptose dessas células, sem interferência no processo de necrose entre os grupos estudados. Biffi e colaboradores, mostram que a indução de apoptose em neutrófilos humanos via IL-6 é concentração dependente, ou seja, em um ambiente com mais neutrófilos a IL-6 é capaz de inibir a apoptose dessas células, o mesmo não é observado quando encontra-se baixas concentrações dessas células (Biffi, Moore, Moore, & Barnett, 1995).

Em nosso modelo, a IL-6 contribui para a ativação dos neutrófilos, estimula a produção de NO e ROS, e auxilia na indução de apoptose, assim podemos observar que o efeito direto da IL-6 nos neutrófilos contribui para os mecanismos efetores dessas células mediando a proteção do hospedeiro durante a LV.

A sinalização da IL-6, induz a alteração no recrutamento de neutrófilos, principalmente por induzir a troca do perfil de produção de quimiocinas quimioatraentes para polimorfonucleares, como o CXCL1 e CXCL2, por quimiocinas que favorecem a migração de monócitos, como o CCL2, CCL8, CXCL5 e CXCL6 (Kaplanski, 2003).

A migração dos neutrófilos, é estimulada pela sinalização do receptor solúvel da IL-6 nessas células. No neutrófilo, a clivagem do IL-6R libera o sIL-6R, que vão atuar como alarminas e promover a trans-sinalização da IL-6 nas células vizinhas, que passam a produzir CXCL1, sendo assim, o gatilho inicial de uma potencial resposta inflamatória é acionado. A produção de CXCL1 afeta diretamente o recrutamento dos neutrófilos, pois seus receptores de CXCL1 podem ser dessensibilizado mediante o excesso na produção dessa quimiocina (Hurst et al., 2001). Vimos que camundongos IL-6^{-/-} apresentam elevado infiltrado neutrofílico durante a infecção por LV. Já a migração dos polimorfos nos animais deficientes para a IL-6, está associada ao aumento na expressão de CXCL2, sendo a expressão de CXCL1 intensamente afetada pela ausência da IL-6, o mesmo pode ser visto no modelo de choque endotóxico, onde animais deficientes para a IL-6 apresentam o mesmo fenótipo e a migração é governada principalmente pelo aumento de CXCL2 (Xing et al., 1998). Esse fenótipo de produção de quimiocinas observado, pode ser resultado de um mecanismo compensatório mediado pela IL-6, onde a produção de CXCL2

compensa a produção de CXCL1 quando essa quimiocina encontra-se em baixas concentrações.

A ineficiência em gerar uma resposta inflamatória durante a fase inicial da LV, já era esperada na ausência da IL-6, pois uma das funções dessa citocina, é mediar a síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos no fígado, após o dano tecidual associado a inflamação (Kopf et al., 1994; Schmidt-Arras & Rose-John, 2016). Isso ocorreria, porque a IL-6 é semelhante ao fator estimulador de hepatócitos 2, que é responsável pela indução da produção das proteínas. Assim a produção de IL-6 pelos macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e hepatócitos, leva a síntese também de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α que agem induzindo a síntese e liberação de mais IL-6, o que mantém um ambiente pró inflamatório (Gauldie, Richards, Harnish, Lansdorp, & Baumann, 1987; Schmidt-Arras & Rose-John, 2016). Como vimos em nossos dados, a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-1 α , e o TNF- α não estão afetadas, sendo assim, nenhum dessas citocinas poderiam atuar compensando o fenótipo observado nos animais deficientes para a IL-6, confirmando então, que a incapacidade em gerar uma resposta inflamatória no fígado, é devido somente a ausência da IL-6.

No que se refere à imunidade adaptativa na LV, o efeito da IL-6 sobre células T parece não estar relacionado diretamente com o comprometimento das linhagens Th1 ou Th2, mas com o controle da proliferação e sobrevivência dessas células (Sean Diehl & Rincón, 2002). Surpreendentemente, camundongos IL-6^{-/-} tem a capacidade de montar uma resposta Th1, visto que a produção de INF- γ por células T CD4⁺ no baço desses animais parece estar aumentada, mas não de forma significativa. Sobre esse possível aumento de INF- γ e a relação de susceptibilidade observada em animais IL6^{-/-} durante a infecção por *L. infantum*, nós hipotetizamos, uma vez que algumas funções estão afetadas em neutrófilos deficientes de IL-6, essas células poderiam também não responder aos estímulos do INF- γ , porém, quando estimulados com anticorpo recombinante de INF- γ , os neutrófilos ausentes da sinalização da IL-6 são ativados normalmente e não tem a produção de ROS diminuída, dados não mostrados. O que nos levou a descartar essa hipótese, e sugerir que haja possíveis interações entre os neutrófilos e as outras células do sistema imune, importantes na montagem de uma resposta imune protetora.

Por ser uma das citocinas chave para a polarização de resposta de padrão Th17, observamos que na ausência da IL-6 há uma diminuição, não significativa, de células T CD4⁺ produtoras de IL-17. A IL-17 vem sendo associada a proteção contra o parasito, mediando o controle da proliferação do parasita (Nascimento et al., 2015; Terrazas et al., 2015). Nossos resultados mostram a importância da IL-6 na polarização dos linfócitos Th17 e na manutenção do sinergismo entre esses dois tipos de respostas, Th1 e Th17 para a eficácia da eliminação do parasito.

Um outro aspecto que pode estar relacionado com a susceptibilidade dos animais IL-6^{-/-} é a regulação dos sistemas inato e adquirido pela citocina IL-10. A IL-10 também é uma citocina com efeito pleiotrópico, e sua produção é associada à susceptibilidade à diferentes espécies de leishmania (Groux et al., 1999; Kane & Mosser, 2001; Murphy, Wille, Villegas, Hunter, & Farrell, 2001; Salhi et al., 2008; Yamakami et al., 2002). Mostramos que na ausência da IL-6 há um aumento da produção de IL-10 por células T CD4⁺, em relação aos WT infectados. Assim, a regulação positiva dessa citocina pode ser um dos fatores determinantes na regulação da inflamação, o que favorece a susceptibilidade dos camundongos *Knockouts*, uma vez que a IL-10 é associada a regulação da resposta imunológica e por auxiliar na redução da lesão tecidual (Fiorentino, Bond, & Mosmann, 1989; Mosmann, 1991).

A via de sinalização da IL-6 comumente ocorre via ativação do fator de transcrição STAT3, mas já é descrito que outras vias podem ser requeridas, como a via PI3k, e MAPK, e assim controlar distintos processos fisiológicos (Eulenfeld et al., 2012; Heinrich et al., 2003). As células podem seguir os dois mecanismos de ativação, pois já que expressam a subunidade gp130, parte essencial do complexo de sinalização dessa citocina, a associação de Jak leva à fosforilação de resíduos de tirosina na porção intracelular da gp130, o que abre possibilidade de ativar vias alternativas, pois domínios SHP2 também são fosforilados e medeiam a ativação das vias PI3k e MAPK (Hemmman et al., 1996; Takahashi-Tezuka et al., 1998).

Desde que expressem o receptor transmembrana (IL-6R) as células podem seguir a sinalização "clássica", caso não expressem, a IL-6 ainda pode sinalizar

através da trans-sinalização, que é mediada pelo receptor solúvel (sIL-6R), que ao ser clivada pelo processo de *splicing*, ou por metaloproteinases como a DAM10 e a ADAM17 permite que haja sinalização pela IL-6 nessas células.

Os neutrófilos constituem uma das principais células que fazer a clivagem do IL6R em sIL6R, e como não expressam o receptor de membrana, a IL-6 é sinalizada apenas via trans-sinalização (Heinrich et al., 2003). A IL-6 é descrita como tendo efeitos pró e anti-inflamatórios, e essas funções antagônicas vem sendo atribuída aos seus dois distintos mecanismos de ativação (Scheller et al., 2011; Wolf et al., 2014). A busca pela elucidação dos mecanismos envolvidos que levam o hospedeiro a proteção ou a susceptibilidade na LV, vem aumentando o número de estudos que utilizam da tecnologia de sequenciamento de nova geração. Uma ferramenta capaz de mostrar as alterações a nível gênico, que a infecção por leishmania induz no hospedeiro e assim, possibilita a identificação de novas moléculas alvo.

Com o uso da técnica RNAseq, mostramos através do sequenciamento de amostras do sangue total de pacientes, que pacientes com a forma ativa da LV apresentam dois genes diferencialmente expressos, são eles, *androgen receptor* (AR), e *small heat shock protein beta-1* (Hspb1/Hsp27).

O AR é um receptor de andrógeno, expresso em várias linhagens celulares, inclusive em neutrófilos (Mantalaris et al., 2001), nessas células, o AR parece estimular a produção de neutrófilos através do aumento da sinalização do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), sendo que camundongo deficientes para esse receptor são neutropenicos, e exibem reduzida migração de neutrófilos em resposta às quimiocinas ligantes do receptor de CXCR2, a CXCL1 e CXCL2, além de serem suscetíveis a infecções bacterianas (K. H. Chuang et al., 2009; J. J. Lai et al., 2012).

Suspeita-se que, tanto em animais como em seres humanos, os hormônios sexuais masculinos possam modular o desenvolvimento e a função do sistema imunológico (J. J. Lai et al., 2012). Os machos apresentam maior risco de desenvolver algumas patologias, inclusive a leishmaniose (Liu et al., 2005; Roberts, Satoskar, & Alexander, 1996), em parte, essa susceptibilidade observada pode estar associada ao efeito dos hormônios masculinos sobre os neutrófilos.

O HSPB1 é uma chaperona citoprotetora com função de proteger as células durante o estresse e respostas inflamatórias (Bakthisaran et al., 2015; Morrow et al., 2015). Dentre suas funções, podem incluir a sinalização de estresse, angiogênese, migração celular, morte celular, e a modulação e regulação do sistema imune (Bakthisaran et al., 2015). Assim como o AR, a HSPB1 é expressa em diversos tipos celulares, inclusive nos neutrófilos, e é descrita por regular funções efetoras, e a migração dessas células (Jog et al., 2007). Sendo que a via de sinalização de p-38 MAPK já é descrita não só por mediar a quimiotaxia de neutrófilos, mas como também a ativação, e algumas funções efetoras dessas células (Coxon, Rane, Powell, Klein, & McLeish, 2000; Coxon et al., 2003; Nick et al., 2002; Ward, Nakamura, & McLeish, 2000).

Com a análise de enriquecimento funcional das vias biológicas que esses genes podem estar envolvidos, observamos que eles podem ser ativados pela IL-6 através das vias PI3k e MAPK (T. Ueda et al., 2002; Takeshi Ueda, Mawji, Bruchofsky, & Sadar, 2002; Wu et al., 2007; Yang et al., 2003), assim, podem regular diferencialmente a fosforilação de HSPB1, que é um importante membro da cascata de sinalização MAPK via p-38 (Niwa et al., 2003), fazendo com que a HSPB1 resulte em mudança conformacional, o que conduz a dissociação oligomérica dessa proteína e subsequente perda da atividade de chaperona. Sendo assim, HSPB1 pode formar um complexo com AR e resultar na transativação de AR e transcrição de genes (Zoubeidi et al., 2007).

Assim, hipotetizamos que o aumento da produção de IL-6 durante a infecção por *L. infantum* em humanos, de alguma forma, leva à sinalização pelas vias de PI3K e p38-MAPK nos neutrófilos infectados. Vias que são responsáveis pela ativação de HSPB1, que uma vez ativado, pode interagir com o AR, e resultar na transcrição de genes que vão regular a homeostase da medula óssea, a migração dos neutrófilos para os tecido infectados, a retenção dessas células nos órgãos alvo e a ativação de funções efetoras. Sendo assim, esses genes poderiam mediar a neutropenia em pacientes durante a LV.

6. Conclusão

6. Conclusão

Juntos, os dados do presente trabalho permitem concluir que a via de sinalização da L-6 é importante para proteção do hospedeiro durante a infecção experimental por *Leishmania infantum*. O mecanismo protetor parece decorrente da liberação de quimiocinas o que promovem o recrutamento e funções efetoras de neutrófilos. Consequentemente, há o controle da replicação dos parasitos em órgãos alvo da doença.

7. Referências

7. Referências

- Afford, S. C., Pongracz, J., Stockley, R. A., Crocker, J., & Burnett, D. (1992). The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21612-21616.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., . . . Boer, M. D. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671-e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Andrade, M. F., Kabeya, L. M., Azzolini, A. E., Santos, E. O., Figueiredo-Rinhel, A. S., Paris, M. R., . . . Lucisano-Valim, Y. M. (2013). 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. *International Immunopharmacology*, 15(2), 387-394. doi:10.1016/j.intimp.2013.01.001
- Asensi, V., Valle, E., Meana, A., Fierer, J., Celada, A., Alvarez, V., . . . Arribas, J. M. (2004). In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect Immun*, 72(7), 3823-3828. doi:10.1128/IAI.72.7.3823-3828.2004
- Bacellar, O., & M.Carvalho, E. (2005). Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. *Gazeta Médica da Bahia*, 75.
- Badaro, R., Jones, T. C., Carvalho, E. M., Sampaio, D., Reed, S. G., Barral, A., . . . Johnson, W. D. (1986a). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 154(6), 1003-1011. doi:10.1093/infdis/154.6.1003
- Badaro, R., Jones, T. C., Carvalho, E. M., Sampaio, D., Reed, S. G., Barral, A., . . . Johnson, W. D., Jr. (1986b). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 154(6), 1003-1011.
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., & Rao, C. M. (2015). Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(4), 291-319. doi:10.1016/j.bbapap.2014.12.019
- Barkhausen, T., Tschernig, T., Rosenstiel, P., van Griensven, M., Vonberg, R.-P., Dorsch, M., . . . Waetzig, G. H. (2011). Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Critical Care Medicine*, 39(6), 1407-1413. doi:10.1097/CCM.0b013e318211ff56
- Bates, P. A. (2007). Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097-1106. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- Belo, V. S., Struchiner, C. J., Barbosa, D. S., Nascimento, B. W., Horta, M. A., da Silva, E. S., & Werneck, G. L. (2014). Risk factors for adverse prognosis and death in American visceral leishmaniasis: a meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e2982. doi:10.1371/journal.pntd.0002982
- Belo, V. S., Werneck, G. L., Barbosa, D. S., Simoes, T. C., Nascimento, B. W., da Silva, E. S., & Struchiner, C. J. (2013). Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(4), e2182. doi:10.1371/journal.pntd.0002182
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., . . . Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235-238. doi:10.1038/nature04753
- Biffl, W. L., Moore, E. E., Moore, F. A., & Barnett, C. C., Jr. (1995). Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leukoc Biol*, 58(5), 582-584.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., & Diefenbach, a. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current opinion in immunology*, 12(1), 64-76.

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Borish, L., Rosenbaum, R., Albury, L., & Clark, S. (1989). Activation of neutrophils by recombinant interleukin 6 (Vol. 121, pp. 280-289).
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657-670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Brasil. (2006). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. *Brasília: Editora do Ministério da Saúde*.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1532-1535. doi:10.1126/science.1092385
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology*, 198(5), 773-783. doi:10.1083/jcb.201203170
- Buffet, P. A., Sulahian, A., Garin, Y. J., Nassar, N., & Derouin, F. (1995). Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(9), 2167-2168.
- Calabrese, L. H., & Rose-John, S. (2014). IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nature reviews. Rheumatology*, 10(12), 720-727. doi:10.1038/nrrheum.2014.127
- Carlsen, E. D., Hay, C., Henard, C. A., Popov, V., Garg, N. J., & Soong, L. (2013). *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect Immun*, 81(11), 3966-3974. doi:10.1128/IAI.00770-13
- Carlsen, E. D., Hay, C., Henard, C. A., Popov, V., Garg, N. J., & Soong, L. (2013). *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect Immun*, 81(11), 3966-3974. doi:10.1128/IAI.00770-13
- Carlsen, E. D., Jie, Z., Liang, Y., Henard, C. a., Hay, C., Sun, J., . . . Soong, L. (2015). Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance. *Journal of Innate Immunity*. doi:10.1159/000373923
- Carlsen, E. D., Jie, Z., Liang, Y., Henard, C. A., Hay, C., Sun, J., . . . Soong, L. (2015). Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance. *J Innate Immun*, 7(4), 354-363. doi:10.1159/000373923
- Carlsen, E. D., Liang, Y., Shelite, T. R., Walker, D. H., Melby, P. C., & Soong, L. (2015). Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clinical & Experimental Immunology*, 182(2), 109-118. doi:10.1111/cei.12674
- Carneiro, P. P., Conceicao, J., Macedo, M., Magalhaes, V., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2016). The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Plos One*, 11(2), e0148084. doi:10.1371/journal.pone.0148084
- Carregaro, V., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G., Souza-Júnior, D. L., Costa, D. L., Oliveira, C. J. F., . . . Silva, J. S. (2015). Nucleosides Present on Phlebotomine Saliva Induce Immunosuppression and Promote the Infection Establishment. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(4), e0003600-e0003600. doi:10.1371/journal.pntd.0003600
- Cd, I., Stäger, S., Maroof, A., Zubairi, S., Sanos, S. L., Kopf, M., & Kaye, P. M. (2009). Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+CD4+ T Cells. 36(7), 1764-1771. doi:10.1002/eji.200635937.Distinct
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., . . . Scheller, J. (2007). Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*, 110(6), 1748-1755. doi:10.1182/blood-2007-01-067918

- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., . . . Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), S7-S16. doi:10.1038/nrmicro1748
- Charmoy, M., Auderset, F., Allenbach, C., & Tacchini-Cottier, F. (2010). The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by leishmania parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 2-9. doi:10.1155/2010/719361
- Charmoy, M., Hurrell, B. P., Romano, A., Lee, S. H., Ribeiro-Gomes, F., Riteau, N., . . . Sacks, D. L. (2015). The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a non-healing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *Eur J Immunol*, n/a-n/a. doi:10.1002/eji.201546015
- Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C., Monnat, K., . . . Tacchini-Cottier, F. (2007). *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol*, 82(2), 288-299. doi:10.1189/jlb.0706440
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., & Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*, 1(6), 510-514. doi:10.1038/82763
- Chuang, K.-H., Altuwaijri, S., Li, G., Lai, J.-J., Chu, C.-Y., Lai, K.-P., . . . Chang, C. (2009). Neutropenia with impaired host defense against microbial infection in mice lacking androgen receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(5), 1181-1199. doi:10.1084/jem.20082521
- Chuang, K. H., Altuwaijri, S., Li, G., Lai, J. J., Chu, C. Y., Lai, K. P., . . . Chang, C. (2009). Neutropenia with impaired host defense against microbial infection in mice lacking androgen receptor. *J Exp Med*, 206(5), 1181-1199. doi:10.1084/jem.20082521
- Conceicao, J., Davis, R., Carneiro, P. P., Giudice, A., Muniz, A. C., Wilson, M. E., . . . Bacellar, O. (2016). Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(5), e0004715. doi:10.1371/journal.pntd.0004715
- Contreras, I., Estrada, J. A., Guak, H., Martel, C., Borjian, A., Ralph, B., . . . Olivier, M. (2014). Impact of *Leishmania mexicana* infection on dendritic cell signaling and functions. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(9), e3202. doi:10.1371/journal.pntd.0003202
- Control of the leishmaniasis: Report of a WHO expert committee*. (1990). Paper presented at the World Health Organization - Technical Report Series, Geneva.
- Costa, A. S., Costa, G. C., Aquino, D. M., Mendonca, V. R., Barral, A., Barral-Netto, M., & Caldas Ade, J. (2012). Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(6), 735-739.
- Costa, C. H., Pereira, H. F., & Araujo, M. V. (1990). [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piaui, Brazil, 1980-1986]. *Rev Saude Publica*, 24(5), 361-372.
- Costa, D. L., Rocha, R. L., Carvalho, R. M., Lima-Neto, A. S., Harhay, M. O., Costa, C. H., . . . Barral, A. P. (2013). Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health*, 107(2), 78-87. doi:10.1179/2047773213Y.0000000078
- Coxon, P. Y., Rane, M. J., Powell, D. W., Klein, J. B., & McLeish, K. R. (2000). Differential mitogen-activated protein kinase stimulation by Fc gamma receptor IIa and Fc gamma receptor IIIb determines the activation phenotype of human neutrophils. *J Immunol*, 164(12), 6530-6537.
- Coxon, P. Y., Rane, M. J., Uriarte, S., Powell, D. W., Singh, S., Butt, W., . . . McLeish, K. R. (2003). MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils. *Cell Signal*, 15(11), 993-1001.
- Crowe, J., Aubareda, A., McNamee, K., Przybycien, P. M., Lu, X., Williams, R. O., . . . Dean, J. L. E. (2013). Heat shock protein B1-deficient mice display impaired wound healing. *PLoS One*, 8(10), e77383-e77383. doi:10.1371/journal.pone.0077383

- da Silva, R., & Sacks, D. L. (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun*, 55(11), 2802-2806.
- Daboul, M. W. (2010). Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J*, 16(10), 1055-1058.
- de Oliveira, S., Rosowski, E. E., & Huttenlocher, A. (2016). Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*, 16(6), 378-391. doi:10.1038/nri.2016.49
- Diehl, S., Chow, C. W., Weiss, L., Palmetshofer, A., Twardzik, T., Rounds, L., . . . Rincon, M. (2002). Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *J Exp Med*, 196(1), 39-49.
- Diehl, S., & Rincón, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1 / Th2 differentiation (Vol. 39, pp. 531-536).
- dos Santos, P. L., de Oliveira, F. A., Santos, M. L. B., Cunha, L. C. S., Lino, M. T. B., de Oliveira, M. F. S., . . . de Almeida, R. P. (2016). The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1-16. doi:10.1371/journal.pntd.0004375
- Duthie, M. S., Guderian, J., Vallur, A., Bhatia, A., Lima dos Santos, P., Vieira de Melo, E., . . . Reed, S. G. (2014). Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33(4), 639-649. doi:10.1007/s10096-013-1999-1
- Eulendorf, R., Dittrich, A., Khouri, C., Müller, P. J., Mütze, B., Wolf, A., & Schaper, F. (2012). Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs. *European Journal of Cell Biology*, 91(6-7), 486-495. doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.010
- Falcao, S. A., Weinkopff, T., Hurrell, B. P., Celes, F. S., Curvelo, R. P., Prates, D. B., . . . de Oliveira, C. I. (2015). Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(3), e0003601. doi:10.1371/journal.pntd.0003601
- Faleiro, R. J., Kumar, R., Hafner, L. M., & Engwerda, C. R. (2014). Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2914-e2914. doi:10.1371/journal.pntd.0002914
- Faleiro, R. J., Kumar, R., Hafner, L. M., & Engwerda, C. R. (2014). Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e2914. doi:10.1371/journal.pntd.0002914
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6), 2081-2095.
- Fonseca, J. E., Santos, M. J., Canhão, H., & Choy, E. (2009). Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity Reviews*, 8(7), 538-542. doi:10.1016/j.autrev.2009.01.012
- Gabriel, C., McMaster, W. R., Girard, D., & Descoteaux, A. (2010). *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(7), 4319-4327. doi:10.4049/jimmunol.1000893
- Gama, M. E., Costa, J. M., Pereira, J. C., Gomes, C. M., & Corbett, C. E. (2004). Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 37(1), 129-136.
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., & Baumann, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(20), 7251-7255.
- Ghalib, H. W., Whittle, J. A., Kubin, M., Hashim, F. A., el-Hassan, A. M., Grabstein, K. H., . . . Reed, S. G. (1995). IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *J Immunol*, 154(9), 4623-4629.

- Giuliano, J. S., Lahni, P. M., Wong, H. R., & Wheeler, D. S. (2011). Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *The open inflammation journal*, 4, 49-60. doi:10.2174/1875041901104010049
- Goto, H., & Lauletta Lindoso, J. A. (2012). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*, 26(2), 293-307. doi:10.1016/j.idc.2012.03.001
- Goto, H., & Lindoso, J. A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8(4), 419-433. doi:10.1586/eri.10.19
- Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S., & Nacy, C. A. (1990). Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 145(12), 4290-4297.
- Groux, H., Cottrez, F., Rouleau, M., Mauze, S., Antonenko, S., Hurst, S., . . . Coffman, R. L. (1999). A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J Immunol*, 162(3), 1723-1729.
- Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Froment, G. S., Soares, R. P. P., Morgado, F. N., Conceição-Silva, F., & Saraiva, E. M. (2009). Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16), 6748-6753. doi:10.1073/pnas.0900226106
- Haddy, T. B., Rana, S. R., & Castro, O. (1999). Benign ethnic neutropenia: what is a normal absolute neutrophil count? *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 133(1), 15-22. doi:10.1053/lc.1999.v133.a94931
- Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Huo, Y., & Ley, K. (2001). L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med*, 193(7), 863-872.
- Hailu, A., van der Poll, T., Berhe, N., & Kager, P. A. (2004). Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 71(5), 561-567.
- Handman, E., & Bullen, D. V. R. (2002). Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 18(8), 332-334. doi:10.1016/S1471-4922(02)02352-8
- Harhay, M. O., Oliaro, P. L., Costa, D. L., & Costa, C. H. (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*, 27(9), 403-409. doi:10.1016/j.pt.2011.04.001
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*, 374(Pt 1), 1-20. doi:10.1042/BJ20030407
- Hemann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grotzinger, J., . . . Horn, F. (1996). Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J Biol Chem*, 271(22), 12999-13007.
- Hoge, J., Yan, I., Janner, N., Schumacher, V., Chalaris, A., Steinmetz, O. M., . . . Mittrucker, H. W. (2013). IL-6 controls the innate immune response against Listeria monocytogenes via classical IL-6 signaling. *J Immunol*, 190(2), 703-711. doi:10.4049/jimmunol.1201044
- Huang, L., Min, J.-N., Masters, S., Mivechi, N. F., & Moskopidis, D. (2007). Insights into function and regulation of small heat shock protein 25 (HSPB1) in a mouse model with targeted gene disruption. *genesis*, 45(8), 487-501. doi:10.1002/dvg.20319
- Hunter, C. a., & Jones, S. a. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Publishing Group*, 16(5), 448-457. doi:10.1038/ni.3153
- Hurrell, B. P., Regli, I. B., & Tacchini-Cottier, F. (2016). Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends in Parasitology*, xx(5), 1-10. doi:10.1016/j.pt.2016.02.003
- Hurrell, B. P., Schuster, S., Grün, E., Coutaz, M., Williams, R. A., Held, W., . . . Yousefi, S. (2015). Rapid Sequestration of Leishmania mexicana by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. *PLoS Pathog*, 11(5), e1004929-e1004929. doi:10.1371/journal.ppat.1004929

- Hurrell, B. P., Schuster, S., Grun, E., Coutaz, M., Williams, R. A., Held, W., . . . Tacchini-Cottier, F. (2015). Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. *PLoS Pathog*, 11(5), e1004929. doi:10.1371/journal.ppat.1004929
- Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., . . . Jones, S. a. (2001). IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*, 14(6), 705-714. doi:10.1016/S1074-7613(01)00151-0
- Ishihara, K., & Hirano, T. (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(4-5), 357-368.
- Ishihara, K., & Hirano, T. (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(4-5), 357-368. doi:10.1016/S1359-6101(02)00027-8
- Jenkins, B. J., Grail, D., Inglese, M., Quilici, C., Bozinovski, S., Wong, P., & Ernst, M. (2004). Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of c-fms expression. *Mol Cell Biol*, 24(4), 1453-1463.
- Jog, N. R., Jala, V. R., Ward, R. A., Rane, M. J., Haribabu, B., & McLeish, K. R. (2007). Heat Shock Protein 27 Regulates Neutrophil Chemotaxis and Exocytosis through Two Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology*, 178(4), 2421-2428. doi:10.4049/jimmunol.178.4.2421
- John, B., & Hunter, C. a. (2008). Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), 917-918. doi:10.1126/science.1162914
- Jones, S. a., Scheller, J., & Rose-john, S. (2011). Science in medicine Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6 / gp130 signaling. *Cell*, 121(9), 3375-3383. doi:10.1172/JCI57158
- Kamhawi, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection*, 2(14), 1765-1773. doi:10.1016/S1286-4579(00)01331-9
- Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*, 166(2), 1141-1147.
- Kaplanski, G. (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*, 24(1), 25-29. doi:10.1016/S1471-4906(02)00013-3
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., & Farnarier, C. (2003). IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*, 24(1), 25-29. doi:10.1016/S1471-4906(02)00013-3
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., & Farnarier, C. (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*, 24(1), 25-29.
- Katsogiannou, M., Andrieu, C., & Rocchi, P. (2014). Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Frontiers in genetics*, 5, 346-346. doi:10.3389/fgene.2014.00346
- Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8), 604-615. doi:10.1038/nrmicro2608
- Khoshdel, A., Alborzi, A., Rosouli, M., Taheri, E., Kiany, S., & Javadian, M. H. (2009). Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis*, 13(1), 44-46.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 279-289. doi:10.1016/S0738-081X(99)00046-2
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 14(4), R36. doi:10.1186/gb-2013-14-4-r36

- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*, 40(7), 1830-1835. doi:10.1002/eji.201040391
- Kinase, J., Giordano, V., Falco, G. D., Chiari, R., Pelicci, P. G., Bartholomew, L., . . . Scala, G. (2016). Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., . . . Köhler, G. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, 368(6469), 339-342. doi:10.1038/368339a0
- Kraakman, Michael J., Kammoun, Helene L., Allen, Tamara L., Deswaerte, V., Henstridge, Darren C., Estevez, E., . . . Febbraio, Mark A. (2015). Blocking IL-6 trans-Signaling Prevents High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue Macrophage Recruitment but Does Not Improve Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 21(3), 403-416. doi:10.1016/j.cmet.2015.02.006
- Krysko, D. V., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2006). Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 11(10), 1709-1726. doi:10.1007/s10495-006-9527-8
- Kumar, R., Singh, N., Gautam, S., Singh, O. P., Gidwani, K., Rai, M., . . . Nylén, S. (2014). Leishmania Specific CD4 T Cells Release IFN γ That Limits Parasite Replication in Patients with Visceral Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(10), e3198-e3198. doi:10.1371/journal.pntd.0003198
- Lai, J.-J., Lai, K.-P., Zeng, W., Chuang, K.-H., Altuwaijri, S., & Chang, C. (2012). Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice. *The American journal of pathology*, 181(5), 1504-1512. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.008
- Lai, J. J., Lai, K. P., Zeng, W., Chuang, K. H., Altuwaijri, S., & Chang, C. (2012). Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice. *Am J Pathol*, 181(5), 1504-1512. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.008
- Laskay, T., van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 11(5), 210-214.
- Laskay, T., van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends in microbiology*, 11(5), 210-214.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., . . . Laskay, T. (2002). Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*, 70(2), 826-835.
- Le, T. T. T., Karmouty-Quintana, H., Melicoff, E., Weng, T., Chen, N. Y., Pedroza, M., . . . Blackburn, M. R. (2014). Blockade of IL-6 Trans Signaling Attenuates Pulmonary Fibrosis. *The Journal of Immunology*, 193(7), 3755-3768. doi:10.4049/jimmunol.1302470
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 678-689. doi:10.1038/nri2156
- Lima-Junior, D. S., Costa, D. L., Carregaro, V., Cunha, L. D., Silva, A. L., Mineo, T. W., . . . Zamboni, D. S. (2013). Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nat Med*, 19(7), 909-915. doi:10.1038/nm.3221
- Liu, L., Benten, W. P., Wang, L., Hao, X., Li, Q., Zhang, H., . . . Qiao, Z. (2005). Modulation of Leishmania donovani infection and cell viability by testosterone in bone marrow-derived macrophages: signaling via surface binding sites. *Steroids*, 70(9), 604-614. doi:10.1016/j.steroids.2005.02.020
- Loeuillet, C., Bañuls, A.-L., & Hide, M. (2016). Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasites & Vectors*, 9(1), 144-144. doi:10.1186/s13071-016-1413-9

- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., . . . Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231-234. doi:10.1038/nature04754
- Mantalaris, A., Panoskaltsis, N., Sakai, Y., Bourne, P., Chang, C., Messing, E. M., & Wu, J. H. (2001). Localization of androgen receptor expression in human bone marrow. *J Pathol*, 193(3), 361-366. doi:10.1002/1096-9896(0000)9999:9999<::AID-PATH803>3.0.CO;2-W
- Mantovani, A., Cassatella, M. a., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 11(8), 519-531. doi:10.1038/nri3024
- Mauer, J., Denson, J. L., & Brünig, J. C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol*, 36(2), 92-101. doi:10.1016/j.it.2014.12.008
- Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. a. (2013). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual review of pathology*, 9, 181-218. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023
- McConville, M. J., & Naderer, T. (2011). Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania. *Annual review of microbiology*, 65, 543-561. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102913
- McElrath, M. J., Murray, H. W., & Cohn, Z. A. (1988). The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *J Exp Med*, 167(6), 1927-1937.
- McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K. C., Alexander, J., & Tacchini-Cottier, F. (2008). Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with Leishmania donovani. *Infect Immun*, 76(2), 532-541. doi:10.1128/IAI.01388-07
- McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K. C., Alexander, J., & Tacchini-Cottier, F. (2008). Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with Leishmania donovani. *Infect Immun*, 76(2), 532-541. doi:10.1128/IAI.01388-07
- McLoughlin, R. M., Hurst, S. M., Nowell, M. A., Harris, D. A., Horiuchi, S., Morgan, L. W., . . . Jones, S. A. (2004). Differential Regulation of Neutrophil-Activating Chemokines by IL-6 and Its Soluble Receptor Isoforms. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5676-5683. doi:10.4049/jimmunol.172.9.5676
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Biology and Chemistry*, 5(1), 62-71. doi:10.1006/niox.2000.0319
- Mócsai, A., Walzog, B., & Lowell, C. A. (2015). Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovascular research*, 107(3), 373-385. doi:10.1093/cvr/cvv159
- Morrow, G., Hightower, L. E., & Tanguay, R. M. (2015). Small heat shock proteins: big folding machines. *Cell stress & chaperones*, 20(2), 207-212. doi:10.1007/s12192-014-0561-0
- Mosmann, T. R. (1991). Regulation of immune responses by T cells with different cytokine secretion phenotypes: role of a new cytokine, cytokine synthesis inhibitory factor (IL10). *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94(1-4), 110-115.
- Mukhopadhyay, D., Dalton, J. E., Kaye, P. M., & Chatterjee, M. (2014). Post kala-azar dermal leishmaniasis: An unresolved mystery. *Trends in Parasitology*, 30(2), 65-74. doi:10.1016/j.pt.2013.12.004
- Murphy, M. L., Wille, U., Villegas, E. N., Hunter, C. A., & Farrell, J. P. (2001). IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection. *Eur J Immunol*, 31(10), 2848-2856. doi:10.1002/1521-4141(2001010)31:10<2848::AID-IMMU2848>3.0.CO;2-T
- Murray, H. W. (2008). Accelerated Control of Visceral Leishmania donovani Infection in Interleukin-6-Deficient Mice. *Infect Immun*, 76(9), 4088-4091. doi:10.1128/IAI.00490-08

- Murray, H. W., & Nathan, C. F. (1999a). Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med*, 189(4), 741-746.
- Murray, H. W., & Nathan, C. F. (1999b). Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *The Journal of experimental medicine*, 189(4), 741-746.
- Naderer, T., & McConville, M. J. (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol*, 10(2), 301-308. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x
- Nascimento, M. S. L., Carregaro, V., Lima-Junior, D. S., Costa, D. L., Ryffel, B., Duthie, M. S., . . . da Silva, J. S. (2015). Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. *Journal of Infectious Diseases*, 211(6), 1015-1026. doi:10.1093/infdis/jiu531
- Nathan C. Peters, J. G. E. N. S. A. D. N. K. S. K. P. L. M. P. F. R. N. G. D. S. (2008). In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science*, 321(August), 970-974.
- Neurath, M. F., & Finotto, S. (2011). IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer (Vol. 22, pp. 83-89).
- Neurath, M. F., & Finotto, S. (2011). IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22(2), 83-89. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.02.003
- Nick, J. A., Young, S. K., Arndt, P. G., Lieber, J. G., Suratt, B. T., Poch, K. R., . . . Worthen, G. S. (2002). Selective suppression of neutrophil accumulation in ongoing pulmonary inflammation by systemic inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*, 169(9), 5260-5269.
- Nishimoto, N., & Kishimoto, T. (2008). Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handbook of experimental pharmacology*(181), 151-160. doi:10.1007/978-3-540-73259-4_7
- Niwa, M., Hotta, K., Kanamori, Y., Hatakeyama, D., Hirade, K., Katayama, M., . . . Kozawa, O. (2003). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in heat shock protein 27 induction in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*, 466(3), 245-253. doi:10.1016/S0014-2999(03)01571-1
- Ohno, Y., Kitamura, H., Takahashi, N., Ohtake, J., Kaneumi, S., Sumida, K., . . . Taketomi, A. (2016). IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 65(2), 193-204. doi:10.1007/s00262-015-1791-4
- Okuno, M., Adachi, S., Kozawa, O., Shimizu, M., & Yasuda, I. (2016). The Clinical Significance of Phosphorylated Heat Shock Protein 27 (HSPB1) in Pancreatic Cancer. *International journal of molecular sciences*, 17(1). doi:10.3390/ijms17010137
- Olekhnovitch, R., & Bousso, P. (2015). Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. *Trends in Parasitology*, 31(12), 653-664. doi:10.1016/j.pt.2015.08.001
- Olliaro, P., Vaillant, M. T., Sundar, S., & Balasegaram, M. (2012). More efficient ways of assessing treatments for neglected tropical diseases are required: innovative study designs, new endpoints, and markers of effects. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5), e1545. doi:10.1371/journal.pntd.0001545
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69, S10-S18. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.016
- Park, E. J., Lee, J. H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R. G., . . . Karin, M. (2010). Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell*, 140(2), 197-208. doi:10.1016/j.cell.2009.12.052
- Peruhype-Magalhaes, V., Martins-Filho, O. A., Prata, A., Silva Lde, A., Rabello, A., Teixeira-Carvalho, A., . . . Correa-Oliveira, R. (2005). Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis

- of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand J Immunol*, 62(5), 487-495. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01686.x
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., . . . Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), 970-974. doi:10.1126/science.1159194
- Peters, N. C., & Sacks, D. L. (2009). The impact of vector mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cellular microbiology*, 11(9), 1290-1296. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01348.x
- Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. (2015). Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol*, 10(1), 111-129. doi:10.2217/fmb.14.103
- Prates, D. B., Araújo-Santos, T., Luz, N. F., Andrade, B. B., França-Costa, J., Afonso, L., . . . Barral, A. (2011). Lutzomyia longipalpis saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J Leukoc Biol*, 90(3), 575-582. doi:10.1189/jlb.0211105
- Pratt, W. B., & Toft, D. O. (2011). Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones1. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.18.3.0303>.
- Ready, P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical epidemiology*, 6, 147-154. doi:10.2147/CLEP.S44267
- Reithinger, R. (2016). Global burden of cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 16(9), 1004-1005. doi:10.1016/S1473-3099(16)30195-5
- Ribeiro-Gomes, F. L., & Sacks, D. (2012). The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 59-59. doi:10.3389/fcimb.2012.00059
- Ritter, U., Frischknecht, F., & van Zandbergen, G. (2009). Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? *Trends in Parasitology*, 25(11), 505-510. doi:10.1016/j.pt.2009.08.003
- Roberts, C. W., Satoskar, A., & Alexander, J. (1996). Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitol Today*, 12(10), 382-388.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- Rodrigues, V., Cordeiro-da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R., & Estaquier, J. (2016). Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites & Vectors*, 9(1), 118-118. doi:10.1186/s13071-016-1412-x
- Roma, E. H., Macedo, J. P., Goes, G. R., Gonçalves, J. L., Castro, W. d., Cisalpino, D., & Vieira, L. Q. (2016). Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in Leishmania amazonensis infection. *Parasites & Vectors*, 9(1), 193-193. doi:10.1186/s13071-016-1472-y
- Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis.
- Sacramento, L., Trevelin, S. C., Nascimento, M. S., Lima-Júnior, D. S., Costa, D. L., Almeida, R. P., . . . Carregaro, V. (2015). Toll-like receptor 9 signaling in dendritic cells regulates neutrophil recruitment to inflammatory foci following Leishmania infantum infection. *Infect Immun*, 83(12), 4604-4616. doi:10.1128/IAI.00975-15
- Sacramento, L. A., Cunha, F. Q., de Almeida, R. P., da Silva, J. S., & Carregaro, V. (2014). Protective Role of 5-Lipoxygenase during Leishmania infantum Infection Is Associated with Th17 Subset. *BioMed Research International*, 2014, 1-12. doi:10.1155/2014/264270
- Salhi, A., Rodrigues, V., Jr., Santoro, F., Dessein, H., Romano, A., Castellano, L. R., . . . Dessein, A. (2008). Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with Leishmania braziliensis. *J Immunol*, 180(9), 6139-6148.

- Sarkar, A., Aga, E., Bussmeyer, U., Bhattacharyya, A., Möller, S., Hellberg, L., . . . Laskay, T. (2013). Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Medical microbiology and immunology*, 202(1), 25-35. doi:10.1007/s00430-012-0246-1
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(5), 878-888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol*, 64(6), 1403-1415. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.004
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, 16(9), 581-592. doi:10.1038/nri.2016.72
- Scott, P., Pearce, E., Cheever, A. W., Coffman, R. L., & Sher, A. (1989). Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunological Reviews*, 112(112), 161-182.
- Séguin, O., & Descoteaux, A. (2016). *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cellular Immunology*. doi:10.1016/j.cellimm.2016.08.004
- Snider, H., Lezama-Davila, C., Alexander, J., & Satoskar, A. R. (2009). Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation*, 16(2), 106-113. doi:10.1159/000180265
- Sofi, M. H., Li, W., Kaplan, M. H., & Chang, C. H. (2009). Elevated IL-6 expression in CD4 T cells via PKC θ and NF- κ B induces Th2 cytokine production. *Mol Immunol*, 46(7), 1443-1450. doi:10.1016/j.molimm.2008.12.014
- Soong, L. (2008). Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol*, 180(7), 4355-4360.
- Soong, L., Henard, C. A., & Melby, P. C. (2012). Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol*, 34(6), 735-751. doi:10.1007/s00281-012-0350-8
- Strutt, T. M., McKinstry, K. K., Kuang, Y., Finn, C. M., Hwang, J. H., Dhume, K., . . . Swain, S. L. (2016). Direct IL-6 Signals Maximize Protective Secondary CD4 T Cell Responses against Influenza. *J Immunol*, 197(8), 3260-3270. doi:10.4049/jimmunol.1600033
- Sundar, S., Gupta, L. B., Rastogi, V., Agrawal, G., & Murray, H. W. (2000). Short-course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94(2), 200-204. doi:10.1016/S0035-9203(00)90277-3
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., . . . Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, 18(7), 4109-4117.
- Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol*, 5, 508. doi:10.3389/fimmu.2014.00508
- Terrazas, C., Varikuti, S., Kimble, J., Moretti, E., Boyaka, P. N., & Satoskar, A. R. (2015). IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. doi:10.1096/fj.15-277202
- Titus, R. G., Marchand, M., Boon, T., & Louis, J. a. (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology*, 7(5), 545-555. doi:10.1111/j.1365-3024.1985.tb00098.x
- Ueda, T., Bruchovsky, N., & Sadar, M. D. (2002). Activation of the Androgen Receptor N-terminal Domain by Interleukin-6 via MAPK and STAT3 Signal Transduction Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7076-7085. doi:10.1074/jbc.M108255200

- Ueda, T., Mawji, N. R., Bruchovsky, N., & Sadar, M. D. (2002). Ligand-independent Activation of the Androgen Receptor by Interleukin-6 and the Role of Steroid Receptor Coactivator-1 in Prostate Cancer Cells *. 277(41), 38087-38094. doi:10.1074/jbc.M203313200
- Van Der Poll, T., Zijlstra, E. E., & Mevissen, M. (1995). Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 77(1), 111-114. doi:10.1016/0090-1229(95)90144-2
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J Immunol*, 173(11), 6521-6525.
- von Andrian, U. H., Chambers, J. D., Berg, E. L., Michie, S. A., Brown, D. A., Karolak, D., . . . Butcher, E. C. (1993). L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. *Blood*, 82(1), 182-191.
- Ward, R. A., Nakamura, M., & McLeish, K. R. (2000). Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *J Biol Chem*, 275(47), 36713-36719. doi:10.1074/jbc.M003017200
- Wilson, M. E., Jeronimo, S. M., & Pearson, R. D. (2005). Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. *Microb Pathog*, 38(4), 147-160. doi:10.1016/j.micpath.2004.11.002
- Winterbourn, C. C., & Kettle, A. J. (2013). Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal*, 18(6), 642-660. doi:10.1089/ars.2012.4827
- Wolf, J., Rose-John, S., & Garbers, C. (2014). Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. doi:10.1016/j.cyto.2014.05.024
- World Health Organization- WHO. (2016). *Leishmaniasis*. WHO 2016.
- Wright, H. L., Cross, A. L., Edwards, S. W., & Moots, R. J. (2014). Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (Oxford)*, 53(7), 1321-1331. doi:10.1093/rheumatology/keu035
- Wu, R., Kausar, H., Johnson, P., Montoya-Durango, D. E., Merchant, M., & Rane, M. J. (2007). Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *The Journal of biological chemistry*, 282(30), 21598-21608. doi:10.1074/jbc.M611316200
- Wunderlich, C. M., Delic, D., Behnke, K., Meryk, a., Strohle, P., Chaurasia, B., . . . Wunderlich, F. T. (2012). Cutting Edge: Inhibition of IL-6 Trans-Signaling Protects from Malaria-Induced Lethality in Mice. *The Journal of Immunology*, 188(9), 4141-4144. doi:10.4049/jimmunol.1102137
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F., & Achong, M. K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation*, 101(2), 311-320. doi:10.1172/JCI1368
- Yamakami, K., Akao, S., Tadakuma, T., Nitta, Y., Miyazaki, J., & Yoshizawa, N. (2002). Administration of plasmids expressing interleukin-4 and interleukin-10 causes BALB/c mice to induce a T helper 2-type response despite the expected T helper 1-type response with a low-dose infection of Leishmania major. *Immunology*, 105(4), 515-523.
- Yang, L., Wang, L., Lin, H.-K., Kan, P.-Y., Xie, S., Tsai, M.-Y., . . . Chang, C. (2003). Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), 462-469. doi:10.1016/S0006-291X(03)00792-7
- Zijlstra, E. E. (2016). The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasites & Vectors*, 9(1), 464-464. doi:10.1186/s13071-016-1721-0
- Zou, W., & Restifo, N. P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 10(4), 248-256. doi:10.1038/nri2742

Zoubeidi, A., Zardan, A., Beraldi, E., Fazli, L., Sowery, R., Rennie, P., . . . Gleave, M. (2007). Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Research*, 67(21), 10455-10465. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2057