

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Papel da IL-18 na resposta inflamatória contra a infecção experimental por
*Leishmania infantum***

Alana Felix da Conceição



RIBEIRÃO PRETO - SP

2019

ALANA FELIX DA CONCEIÇÃO

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Carregaro Pereira

RIBEIRÃO PRETO - SP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Conceição, Alana Felix da

Papel da IL-18 na resposta inflamatória contra a infecção experimental por *Leishmania infantum*

Ribeirão Preto, 2019.78p.; Il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador(a): Pereira, Vanessa Carregaro.

1. Leishmaniose visceral. 2. IL-18 3. Infiltrado inflamatório 4. Resposta imune adaptativa 5. Células Th1.

Trabalho realizado no laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Capes/INCTV, CNPq e

FAPESP

ALANA FELIX DA CONCEIÇÃO

**Papel da IL-18 na resposta inflamatória contra a infecção experimental por
*Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Vanessa Carregaro Pereira

FMRP-USP

Nome: _____

Nome: _____

Dedico o presente trabalho aos meus pais, Rose e Fernando, por acreditarem em meus sonhos, por todo apoio e dedicação. Dedico especialmente ao meu tio Edson Felix (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Vanessa Carregaro pela orientação, pelos ensinamentos, e por todo apoio. Agradeço por acreditar em minha capacidade.

Ao professor Dr. João Santana da Silva pelo exemplo, pelos ensinamentos e por permitir o desenvolvimento desse trabalho em seu laboratório.

Aos demais professores do programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pelo convívio e ensinamentos.

Aos professores que compõem a banca, Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior e Prof. Dr. Roque Pacheco Almeida, pela disponibilidade concedida.

A todos do Laboratório de Imunoparasitologia, membros e visitantes, pelo conhecimento compartilhado, pelas reuniões ricas em conteúdo e pelos momentos de descontração.

À Dr^a Laís Sacramento pelo exemplo, pela paciência e por todo conhecimento transmitido. Obrigada pela parceria na realização dos experimentos.

Às alunas de iniciação científica Moira Daniel, Bruna Brioschi e Camila Rigo pela parceria no trabalho laboratorial. À Patrícia Évora pelo convívio.

Pela ajuda técnica no desenvolvimento desse trabalho agradeço: Vera Epifânio, Franciele Pioto, Cristiane Milanezi, Wander Ribeiro, Olinda Mara, Denise Ferraz e Rubilan Quioneiro.

À Ana Cristine pela dedicação e profissionalismo com que cuida da nossa pós-graduação.

Aos colegas da pós-graduação, especialmente à Silvia Ortigoza, Ana Carolina Monteleone e Vítor Gonçalves. Ao meu *room mate* Ms. Rômulo de Oliveira pelo convívio, pela amizade, conhecimentos e experiências compartilhadas.

A CAPES/INCT, CNPq, FAPESP e FAEPA pelo suporte financeiro oferecido.

Agradecimentos Especiais:

Aos meus pais, Rose Felix e Fernando da Conceição, por todo apoio, amor e dedicação, agradeço principalmente pelos esforços feitos em prol da minha educação profissional.

Aos meus irmãos, Cibele e Jean Lucas, por entenderem que a distância não diminui o amor.

Aos meus familiares, avó, tias, tios e primos pelo apoio e força.

Aos amigos da equipe do laboratório de sorologia do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de ribeirão Preto – USP por me incentivarem a lutar pelo sonho da pós-graduação. Especialmente a Kelin Cesarine e Fernanda Paschoal, por estarem presentes em momentos muito difíceis nesses dois anos.

Aos meus amigos Lucas Chaves e Valdemir Garrido, pela amizade e palavras de incentivo.

A todos meus ex-professores pela dedicação e inspiração.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust

RESUMO

CONCEIÇÃO, A.F. **Papel da IL-18 na resposta inflamatória contra a infecção experimental por *Leishmania infantum***. 2019. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A interleucina-18 (IL-18) é uma citocina pleiotrópica membro da família da IL-1 com múltiplas funções dependentes do contexto, que inclui funções compartilhadas com a IL-12. Neste trabalho, objetivamos avaliar o papel da interleucina-18 durante a Leishmaniose Visceral experimental induzida por *Leishmania infantum*. Nossos resultados demonstraram que a IL-18 confere resistência à infecção, visto que animais geneticamente deficientes para essa citocina apresentaram aumento de parasitos no baço e fígado. A susceptibilidade à infecção foi associada com alteração do infiltrado inflamatório nos órgãos-alvo. Animais geneticamente deficientes para IL-18 apresentaram menor infiltrado inflamatório no parênquima hepático. A fenotipagem das células inflamatórias demonstra que, em relação ao grupo controle, houve uma significativa redução na migração de neutrófilos (CD11b^{hi}Ly6G⁺), monócitos inflamatórios (CD11b^{hi}Ly6C^{hi}) e células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺F4/80) para o baço de camundongos IL-18^{-/-}. Além disso, observamos que a ausência da IL-18 durante a infecção interfere na produção de IFN- γ por células TCD4⁺ e T CD8⁺. Essa redução da produção de IFN- γ por linfócitos T está relacionada com o comprometimento da produção de IL-12p40 por células dendríticas diferenciadas da medula óssea de animais IL-18^{-/-} (BMDCs IL-18^{-/-}). Em conjunto, nossos resultados demonstram que a IL-18 induzida durante a infecção causada pelo parasito *L. infantum* participa na produção de IFN- γ por células TCD4⁺ e TCD8⁺ por promover a liberação de IL-12. Como consequência, há o recrutamento de células inflamatórias envolvidas no controle da replicação dos parasitos para o sítio de infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, IL-18, infiltrado inflamatório, resposta imune adaptativa, células Th1

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, A.F. **Role of IL-18 in the inflammatory response against the experimental infection by *Leishmania infantum***. 2019. 78f. Dissertation (Master's). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Interleukin-18 (IL-18) is a pleiotropic cytokine member of the IL-1 family with multiple functions depending on the context, including shared functions with IL-12. Herein, we aimed to evaluate the role of interleukin-18 during experimental visceral leishmaniasis induced by *Leishmania infantum*. Our results demonstrated that IL-18 confers resistance to the infection, since the animals genetically deficient for IL-18 presented enhanced parasite load in spleen and liver. The susceptibility to the infection was associated with alteration of the inflammatory infiltrate on the target organs. Genetically deficient mice for IL-18 presented smaller inflammatory infiltrate in the hepatic parenchyma. The phenotyping of inflammatory cells demonstrates that, in a comparison to the group control, there was a decreased migration of neutrophils (CD11b^{hi}Ly6G⁺), inflammatory monocytes (CD11b^{hi}Ly6C^{hi}) and dendritic cells (CD11b⁺CD11c⁺F4/80⁻) to the spleen in IL-18^{-/-} mice. Also, we observed that the absence of IL-18 during infection interferes with the production of interferon- γ by T CD4⁺ and TCD8⁺ cells. This reduction in the production of IFN- γ by T lymphocytes is related with the impaired production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) from IL-18^{-/-} mice. Taken together, these results demonstrate that IL-18 induced during the infection caused by the parasite *L. infantum* participates in the production of IFN- γ by TCD4⁺ and TCD8⁺ cells by promoting the release of IL-12. As a consequence, there is a recruitment of inflammatory cells involved in the control of the parasite replication to the site of infection.

Keywords: Visceral leishmaniasis, IL-18, inflammatory infiltrate, adaptive immune response, Th1 cells.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Cinética de expressão de IL-18 e sua função <i>in vivo</i> durante a infecção por <i>L. infantum</i> | 45 |
| FIGURA 2. IL-18 participa da inflamação neutrofílica no baço durante a LV..... | 47 |
| FIGURA 3. IL-18 interfere na migração de monócitos durante a LV..... | 50 |
| FIGURA 4. IL-18 está envolvida na manutenção do infiltrado de células dendríticas no baço..... | 53 |
| FIGURA 5. IL-18 interfere na população de linfócitos T durante a LV..... | 56 |
| FIGURA 6. IL-18 regula positivamente a produção de IFN- γ na LV..... | 58 |
| FIGURA 7. IL-18 estimula a produção de IL-12p40 durante a infecção <i>in vitro</i> por <i>L. infantum</i> | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real..... | 40 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Células apresentadoras de antígeno

BMDCs – Células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea

BMDMs – Macrófagos derivados de precursores da medula óssea

CCL – *Chemokine (C-C motif) ligand*

CCR – *Chemokine (C-C motif) receptor*

CD – *Cluster* de diferenciação

cDNA – DNA complementar

Células NK – Células *Natural Killer*

COX-2 – Cicloxigenase-2

CXCL – *Chemonkine (C-X-C motif) ligand*

CXCR – *Chemokine (C-X-C motif) Receptor*

DC – Célula dendrítica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

ELISA- *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

h – Hora

ICAM-I – *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IFN- γ – Interferon gamma

IGIF – IFN-gamma inductor factor

IKK β – *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*

IL – Interleucina

IL-18BP– *interleukin-18 binding protein*

IL-18R α – *Interleukin-18 receptor α chain*

IL-18R β – *Interleukin-18 receptor β chain*

iNOS – Oxido nítrico sintase induzível

IRAK – *Interleukin-1 receptor-associated kinase*

iv – intravenoso

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*

KC – *Keratinocyte-derived cytokine*

KO – *Knockout*

LC – Leishmaniose cutânea

LM – Leishmaniose mucocutânea

LPS – Lipopolissacarídeo

LV – Leishmaniose visceral

MAPK – *Mitogen-activated protein kinases*

MHC-II – *Major histocompatibility complex class II*

MIP – *Macrophage inflammatory protein*

MIP-2 – *Macrophage inflammatory protein-2*

MoDC – *Monocytes derived dendritic cells*

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NF- κ B – Nuclear factor- κ B

NI– Não infectado

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização mundial da saúde

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PMA– *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

RNA – Ácido ribonucleico

Spi – *semanas pós-infecção*

TGF- β – *transforming growth factor beta*

Th – Célula T *helper*

TIR – *Toll-like and IL-1 receptor*

TLR – *Toll-like Receptors*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRAF- 6 – *Tumor necrosis factor receptor associated factor-6*

WT- *Wild type*

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| RESUMO..... | IX |
| ABSTRACT..... | X |
| LISTA DE FIGURAS..... | XI |
| LISTA DE TABELAS..... | XII |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XIII |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 As Leishmanioses..... | 21 |
| 1.2 Interação entre parasito e hospedeiro..... | 23 |
| 1.3 Interleucina-18 | 25 |
| 1.4 Interleucina-18 e as Leishmanioses..... | 27 |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 31 |
| 2.2 Objetivos específicos | 31 |
| 3. METODOLOGIA..... | 33 |
| 3.1 Animais | 33 |
| 3.2 Parasitos e Infecção Experimental..... | 33 |
| 3.3 Carga Parasitária | 33 |
| 3.4 Antígeno particulado de <i>L. infantum</i> | 34 |
| 3.5 Análise histopatológica | 34 |
| 3.6 Isolamento de leucócitos de baço..... | 34 |
| 3.7 Cultura de leucócitos isolados de baço..... | 35 |
| 3.8 Fenotipagem dos leucócitos e citocina intracelular | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9 Detecção de citocinas por ELISA..... | 36 |
| 3.10 Diferenciação de Células Dendríticas | 36 |
| 3.11 Cultura de células dendríticas | 37 |
| 3.12 Extração de RNA e síntese de cDNA..... | 37 |
| 3.13 PCR em tempo real..... | 38 |
| 3.14 Análise Estatística..... | 39 |
| 4. RESULTADOS..... | 40 |
| 4.1 IL-18 confere resistência à infecção por <i>L. infantum</i> em animais C57BL/6..... | 41 |
| 4.2 IL-18 regula positivamente a migração de neutrófilos durante a LV | 45 |
| 4.3 IL-18 participa do recrutamento de monócitos CD11b ^{hi} Ly6C ^{hi} e CD11b ^{hi} Ly6C ^{low} durante a LV | 47 |
| 4.4 IL-18 está envolvida na manutenção da população de células dendríticas no baço | 50 |
| 4.5 IL-18 regula positivamente a produção de IFN- γ por células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ durante infecção por <i>L. infantum</i> | 53 |
| 4.6 A IL-18 induz a produção de IL-12 durante a LV | 58 |
| 5. DISCUSSÃO | 61 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 68 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

As Leishmanioses formam um complexo de doenças negligenciadas com transmissão vetorial, têm ampla distribuição pelo mundo estando presente em cerca de 88 países, sendo consideradas endêmicas na África, Ásia, Américas e região do Mediterrâneo. A Leishmaniose é considerada uma das sete principais doenças tropicais e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram, por ano, cerca de 700.000 a 1 milhão de novos casos e entre 26.000 e 65.000 mortes (Kaye and Scott 2011).

O seu agente etiológico é o protozoário do gênero *Leishmania spp*, um hemoparasita pertencente a ordem *Kinetoplastida*, e família *Trypanosomatidae*. Cerca de 20 espécies do parasito podem infectar humanos (Chappuis, Sundar et al. 2007) e essas estão divididas em dois subgêneros: o *Viannia*, presente no novo mundo, e o *Leishmania*, encontrado no novo e no velho mundo (Cotton 2017).

A *Leishmania sp* apresenta um ciclo biológico heteróxico, alternando a infecção entre um hospedeiro invertebrado (mosquito flebotomíneo) e um vertebrado (vários, dentre eles humanos, canídeos e roedores) (Walker, Oghumu et al. 2014). Para que essa transição ocorra, o parasito muda de forma evolutiva, adaptando-se para sobreviver no organismo hospedeiro (Rodrigues, Cordeiro-da-Silva et al. 2016). No vetor desenvolvem-se as formas promastigotas, extracelulares e flageladas, o que garante a motilidade para o seu ciclo de vida no mosquito, enquanto no mamífero o parasito assume a morfologia de amastigota, uma célula ovoide, intracelular obrigatória, responsável pela patologia (Bates 2008).

A doença é classificada em três manifestações clínicas: a Leishmaniose Cutânea (LC), a Leishmaniose Mucocutânea (LM) e a Leishmaniose Visceral (LV) (Chappuis, Sundar et al. 2007, Rodrigues, Cordeiro-da-Silva et al. 2016). A Leishmaniose Cutânea é a mais comum, causa lesões na pele, principalmente úlceras na face e em extremidades. Essas lesões apresentam fundo purulento, geralmente são indolores e podem ser localizadas ou difusas (Iddawela, Vithana et al. 2018). Geralmente a lesão se forma no local da picada, mas pode haver disseminação por vasos linfáticos. A OMS estima que ocorram entre 600.000 e 1 milhão de novos casos anualmente, com 95% distribuídos entre Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque e Síria. As

espécies causadoras da LC são *Leishmania major*, *Leishmania amazonenses* e *Leishmania braziliensis* (Olekhnovitch, Ryffel et al. 2014)

A Leishmaniose Mucocutânea é marcada pelo surgimento de lesões destrutivas e desfigurantes em regiões de mucosa, como em cavidades orais e nasais, podendo atingir orofaringe e traqueia (Reithinger, Dujardin et al. 2007). Ocorre geralmente após a aparente resolução de uma infecção cutânea. Em países em que a LC é endêmica, a porcentagem de casos que evoluem para Leishmaniose Mucocutânea é de 2 a 5%, mas pode chegar a 20% em algumas regiões. A maioria dos casos são causados por *L. braziliensis*, mas as espécies *L. guyanensis* e *L. amazonenses* também estão relacionadas a forma mucocutânea (Handler MZ 2015).

Dentre as Leishmanioses, a LV ou calazar é a forma mais grave da doença devido ao seu caráter crônico e sistêmico, que resulta em um maior índice de morbimortalidade (Singh and Sundar 2015). As espécies causadoras da LV são a *L. donovani* na Ásia e no leste da África e a *L. infantum* na bacia do mediterrâneo e América do Sul. Estima-se que ocorra cerca de 50.000 a 90.000 novos casos por ano em todo o mundo (<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>).

O tropismo visceral dessas espécies permite que os parasitos sobrevivam e se proliferem no fígado, baço e medula óssea (McCall, Zhang et al. 2013). Os sintomas iniciais da infecção são febre intermitente e mal-estar. A doença após estabelecida, caracteriza-se por sintomas de infecção sistêmica (febre prolongada, falta de apetite, fadiga, perda de peso, fraqueza) esplenomegalia acentuada, acompanhada ou não por hepatomegalia, pancitopenia, e hipergamaglobulinemia policlonal (Chappuis, Sundar et al. 2007, Kumar and Nysten 2012, Rodrigues, Cordeiro-da-Silva et al. 2016).

Apesar das diferentes formas clínicas, a transmissão natural da Leishmaniose para humanos e outros vertebrados ocorre através do repasto sanguíneo de mosquito fêmea infectado, pertencente aos gêneros *Phlebotomus spp.* no velho mundo e *Lutzomyia spp.* no novo mundo. Os ciclos de transmissão da doença adaptaram-se ao ambiente peridomiciliar, atingindo áreas que não eram endêmicas, como resultado do desmatamento, substituição da flora natural por áreas de agricultura e urbanização, aliados ao oferecimento de animais domésticos e humanos como potenciais reservatórios (Reithinger, Dujardin et al. 2007, Abdeladhim, Kamhawi et al. 2014).

O ciclo biológico do parasito inicia-se quando o vetor fêmea alimenta-se de sangue do hospedeiro mamífero contendo células do sistema fagocítico mononuclear

infectadas por *Leishmania* na forma amastigota. No tudo digestório do artrópode, as amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas, as quais se multiplicam por divisão binária. Essas transformam-se em nectomoadas e leptomonadas e passam por um segundo ciclo de multiplicação. Ao chegar ao estágio infectante de promastigotas metacíclicas, o parasito é encontrado atrás da válvula estomodeal. Essa forma é altamente adaptada para uma transmissão efetiva, e é regurgitada no hospedeiro vertebrado juntamente com saliva, em uma poça de sangue gerada pela laceração de capilares da pele (Kamhawi 2006, Bates 2008).

1.2 Interação entre parasito e hospedeiro

Apesar da gravidade da LV, a maioria dos pacientes infectados com espécies que causam Leishmaniose Visceral são assintomáticos. Indivíduos podem apresentar desde infecção subclínica até manifestações graves que podem levar ao óbito, se não houver tratamento (Desjeux 2004, Nylén and Sacks 2007).

É sabido que a saliva do mosquito contém componentes farmacológicos que facilitam a alimentação do inseto e inibem a inflamação através da ação de imunomoduladores, como adenosina e adenosina monofostato (Carregaro, Ribeiro et al. 2015). Uma vez inoculados na derme, os parasitos induzem o recrutamento localizado de leucócitos (Locksley, Heinzl et al. 1988) e interagem com diversos subtipos celulares, dentre eles neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Recentemente foi demonstrado que a microbiota do mosquito inoculada juntamente com a saliva tem papel na visceralização da Leishmaniose, pois ativa inflamassoma e leva a rápida produção de IL-1 β , que induz o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local do repasto sanguíneo, o que leva a disseminação dos parasitos para órgãos internos (Dey, Joshi et al. 2018).

A resposta imunológica eficaz contra a *Leishmania* é dependente do desenvolvimento de uma resposta de padrão TH1 (Nylén and Sacks 2007). Através da apresentação antigênica adequada, com os co-estímulos necessários e produção de IL-12 por célula dendrítica, é induzida a diferenciação de linfócito TH0 em TH1, secretor de interferon gama (IFN- γ) (Brodskyn, Beverley et al. 2000). O IFN- γ secretado ativa os macrófagos, potencializando sua capacidade de destruir o

patógeno fagocitado por mecanismos microbicidas, como a ativação da oxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2), enzima que leva à ativação do aminoácido L-arginina e subsequente produção de citrulina e óxido nítrico (NO) (Bogdan, Gessner et al. 1996). A citocina TNF- α é produzida por macrófagos e age em sinergismo com IFN- γ aumentando a ativação de iNOS e, assim, levando a morte mediada por óxido nítrico (Körner Donhauser, Röllinghoff et al. 2001). Juntamente com linfócitos T CD4⁺, células NK e T CD8⁺ também são fontes importantes de INF- γ . Antes do desenvolvimento das células Th1, células natural killer (NK) no linfonodo drenante produzem IFN- γ e aumentam a produção de IL-12 pelas células dendríticas (Scharton and Scott 1993).

Enquanto a produção de IL-12 leva a diferenciação para Th1, um microambiente com predomínio de IL-4, IL-10 e IL-13 marca uma resposta do padrão Th2, associada com a suscetibilidade à infecção, devido à desativação de respostas protetoras, como a ativação de macrófagos, e a produção de espécies reativas de nitrogênio por eles (Sacks and Noben-Trauth 2002). Em contraste com a ativação clássica, a ativação induzida por citocinas do perfil TH2 leva a produção de poliaminas, que favorece o crescimento do parasito (Liu and Uzonna 2012).

Outra citocina que regula negativamente a ativação clássica de macrófagos é a IL-10. Pacientes com doença ativa apresentam elevados níveis de IL-10 no soro. Essa citocina, de caráter regulador, é produzida por células T e B, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais (Nylen and Sacks 2007). Durante a LV, a IL-10 desativa mecanismos leishmanicidas dos macrófagos, diminuindo a produção de TNF- α e NO e a função de apresentação de antígeno de macrófagos e células dendríticas (do inglês: *dendritic cells* - DCs) através da redução da expressão de moléculas coestimuladoras e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (do inglês: *major histocompatibility complex class II* - MHC-II) e inibição da produção de IL-12 (Nylen and Sacks 2007). O TGF- β também está implicado na patologia da Leishmaniose, garantindo suscetibilidade ao parasito (Barral-Netto, Barral et al. 1992). Camundongos resistentes à *L. infantum* tornam-se mais suscetíveis quando inoculados com vetor viral expressando TGF- β (Anderson, Lira et al. 2008).

Outro subtipo de células T é o produtor de IL-17 (Th17), citocina que potencializa a inflamação e doenças autoimunes. O efeito proinflamatório da citocina

é resultado da ativação de iNOS, TNF- α , IL-6 IL-8 e várias quimiocinas (Goncalves-de-Albuquerque, Pessoa et al. 2017). Nosso grupo demonstrou que a IL-17 é uma citocina importante para o controle da infecção por *L. infantum*, pois atua em sinergismo com o IFN- γ ativando macrófagos e aumentando a produção de NO (Nascimento, Carregaro et al. 2015).

Durante o estágio inicial da infecção, células do sistema imune inato tem papel crítico no controle do parasita e em determinar a natureza da resposta imune adaptativa subsequente. Macrófagos residentes e células dendríticas reconhecem produtos do patógeno e produzem citocinas e quimiocinas que recrutam neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção(Liu and Uzonna 2012) O papel protetor dos neutrófilos está ligado à sua capacidade de migrar para o foco da infecção, fagocitar e matar os micro-organismos. Porém, como o neutrófilo tem uma vida curta, acredita-se que tais células sirvam com hospedeiro intermediário. Recentemente foi proposto que os neutrófilos atuam como “cavalo de Tróia” para os parasitos, que são internalizados por macrófagos de maneira silenciosa(Laskay, van Zandbergen et al. 2003). Investigando o papel de neutrófilos na LV induzida por *L. infantum*, nosso grupo demonstrou que essas células são importantes para o controle da infecção, visto que a depleção dessas células em animais C57BL/6 promove o aumento de parasitos em órgãos-alvo da doença (Sacramento, Trevelin et al. 2015).

1.3 Interleucina-18

A inflamação é uma resposta altamente complexa iniciada pelo hospedeiro em resposta a vários tipos de estímulos, como lesões celulares e a presença de patógenos. A resposta imunológica faz uso de diversos fatores solúveis, sendo as citocinas as moléculas mais estudadas. Um desequilíbrio nessas citocinas pode gerar um excesso de inflamação e piora da patologia (Keyel 2014). Interleucina-1 é a citocina pró-inflamatória prototípica e um dos principais pilares da resposta inflamatória (Mayer-Barber and Yan 2017). A família da interleucina-1 compreende algumas das citocinas mais estudadas: a própria IL-1, que recebe esse nome por ser a primeira a ser descrita, e mais 6 ligantes (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ), três antagonistas de receptores (IL-1R α , IL-36R α e IL-38) e uma citocina anti-inflamatória (IL-37). Interleucina-1 inicia respostas imunológicas, como febre, síntese

de prostaglandina, influxo e ativação de neutrófilos, ativação de linfócitos T e B, proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (Dinarello 2011)

Interleucina-18, outro componente dessa família, foi primeiramente descrita como Fator Indutor de IFN- γ (do inglês: *IFN-gamma inducitor factor IGIF*) em camundongos estimulados com *Propionibacterium acnes* e lipopolisacarídeo (Nakamura, Okamura et al. 1989). Em 1995, após purificação e clonagem, foi rebatizada com seu nome atual (Ushio, Namba et al. 1996). IL-18, assim como IL-1 β , é sintetizada como um precursor inativo, no caso de IL-18 uma proteína (pró-IL-18) de 24-kDa que por não apresentar um peptídeo sinal permanece intracelular. Apenas após a clivagem de pró-IL-18 pela caspase-1 na região Asp³⁵-Asn³⁶ é gerada e secretada a forma biologicamente ativa com 18-kDa (Gu, Kuida et al. 1997). De modo semelhante à caspase-1, a granzima B também pode clivar pró-IL-18 em IL-18 (Omoto, Yamanaka et al. 2010).

Diferente de IL-1 β , cujo gene não é expresso em homeostase, IL-18 tem seu gene constitutivamente expresso em monócitos sanguíneos e células epiteliais de todo o trato gastrointestinal de humanos (Dinarello, Novick et al. 2013). Em camundongos, IL-18 é expressa por macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, células do epitélio intestinal e queratinócitos (Stoll, Müller et al. 1997, Stoll, Jonuleit et al. 1998). Nessas células, antes mesmo do estímulo inflamatório como, por exemplo, a ativação de receptores do tipo Toll (do inglês: *Toll-like receptors* - TLRs) e receptores citocinas, há um montante de pró-IL-18 pronta para ser ativada e secretada (Novick, Kim et al. 2013, Tsutsumi, Kimura et al. 2014, Zhu and Kanneganti 2017).

Assim como outros membros da família IL-1R, IL-18R é composto por duas cadeias: a induzível IL-18R α , ligante para IL-18, e IL-18R β , constitutivamente expressa, chamada de proteína co-receptora (Torigoe, Ushio et al. 1997). A sinalização da IL-18 inicia-se através da sua ligação à cadeia alfa do receptor. Essa ligação recruta a cadeia beta do receptor, responsável pela sinalização, que se liga à cadeia IL-18R α à esquerda em relação à sua superfície côncava de reconhecimento, o que se chama de *left binding mode* (Tsutsumi, Kimura et al. 2014), e assim é formado um tricomplexo de alta afinidade (Dinarello and Fantuzzi 2003, Tsutsumi, Kimura et al. 2014).

Com a ligação da citocina, os domínios TIR na porção intracelular das cadeias do receptor aproximam-se e isso permite a ligação de MyD88 (do inglês: *myeloid differentiation primary response gene 88*). A fosforilação dessa molécula adaptadora leva ao recrutamento de IRAK-4 (do inglês: *Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) e ativação de IRAK-1 (do inglês: *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) que interage com TRAF-6 (do inglês: *Tumor necrosis factor receptor associated factor-6*) e IKK β (do inglês: *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*), culminando com a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (do inglês: *Nuclear Factor- κ B*) e transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, ocorre a ativação das cascatas JNK (do inglês: *c-Jun N-terminal kinase*) e MAPKp38 (do inglês: *Mitogen-activated protein kinases*) (Matsumoto, Tsuji-Takayama et al. 1997, Robinson, Shibuya et al. 1997, Wald, Commane et al. 2001). Em células epiteliais A549 transfectadas com a cadeia β do receptor de IL-18 (IL-18R β), a transdução de sinal de IL-18 via MAPK p38 parece ser a principal, e não NF- κ B, o que poderia explicar ausência de cicloxigenase-2 (COX-2) e falha da citocina em causar febre (Lee, Kim et al. 2004).

Um mecanismo de controle da atividade inflamatória de citocinas é a ocorrência natural de receptores solúveis que as neutralizam. A sinalização de IL-18 é regulada pelo efeito inibidor da proteína ligante de IL-18 (IL-18BP) (Novick, Kim et al. 1999). Ao contrário de outras proteínas ligantes de citocinas, IL18-BP não é derivada de subunidades do IL-18R. Trata-se de uma proteína solúvel com apenas um domínio Ig constitutivamente secretada, com afinidade pela IL-18 superior à apresentada pela cadeia alfa do receptor de IL-18 (IL-18R α). Essa alta afinidade implica numa baixa taxa de dissociação, o que contraria a hipótese de que essa tenha papel de proteína carreadora. O vírus *Molluscum contagiosum* inibe a produção de IFN- γ induzida por IL-18 codificando uma proteína homóloga a IL-18BP (Xiang and Moss 2001, Dinarello, Novick et al. 2013). Outro modo de inibir a ativação celular dependente de IL-18R é a citocina anti-inflamatória IL-37, que se liga à cadeia alfa de IL-18R (IL18R α), mas não recruta o mesmo correceptor, IL-18R β , e sim IL-1R8. Porém, IL-37 não é considerada antagonista de IL-18R, porque o aumento da concentração de IL-37 não resulta em maior inibição de IL-18 (Nold-Petry, Lo et al. 2015).

1.4 Interleucina-18 e as Leishmanioses

IL-18 tem papel crítico nas respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro contra patógenos que apresentam crescimento intracelular (García, Uyemura et al. 1999), em que a produção de IFN- γ é conhecidamente importante, como as bactérias *Mycobacterium tuberculosis* (Sugawara, Yamada et al. 1999, Schneider, Korbel et al. 2010), *Burkholderia pseudomallei* (Wiersinga, Wieland et al. 2007) e *Listeria monocytogenes* (Neighbors, Xu et al. 2001); os fungos *Cryptococcus neoformans* (Kawakami, Qureshi et al. 1997) e *Candida albicans* (Mencacci, Bacci et al. 2000). IL-18 é inicialmente produzida por macrófagos e células dendríticas que entram em contato com o patógeno invasor. Em sinergia com IL-12, IL-18 induz a produção de IFN- γ por células NK e células TH1 (Dinarello, Novick et al. 2013)

Durante a fase inicial da infecção por *Leishmania sp*, a ativação das células NK em camundongos requer a produção de IL-12 por DC, dependente de TLR-9, a produção de IL-2 por células T e a presença de IL-18, pois o *priming* dado por esta citocina aumenta a tradução do RNAm de IFN- γ (Liese, Schleicher et al. 2007, Chaix, Tessmer et al. 2008). Para a ativação de célula NK humana em resposta à presença de leishmania, é necessária a transapresentação de IL-18 por monócitos infectados a célula NK e a produção de IL-12 por DCs (Messlinger, Sebald et al. 2018).

O desenvolvimento de uma resposta do padrão Th1 ou Th2 pode mudar o desfecho da infecção por *Leishmania sp* (SCOTT et al., 1988). Dentro desse contexto, o papel de IL-18 é dual, sendo demonstrado que pode induzir uma resposta de padrão Th1 ou Th2 dependendo do microambiente de citocinas em que se encontra. IL-18 é mais conhecida por agir em sinergismo com IL-12 ou IL-15 para induzir a produção de IFN- γ por linfócitos T (Tominaga, Yoshimoto et al. 2000). No entanto, IL-18 não induz a produção de IFN- γ por células T *per se*. Células T *naïve* apresentam baixa expressão de IL-18R α , sendo necessária a presença de IL-12 ou de IL-15 para amplificação da resposta do tipo Th1 através do aumento da expressão de IL-18R α (Yoshimoto, Takeda et al. 1998).

Por outro lado, a existência de poucas cadeias IL-18R α em células T *naïves* permite que, na ausência de IL-12 e IL-15, a citocina IL-18 em conjunto com IL-2 estimule a expressão de CD40L, aumento de IL-13 e uma produção discreta de IL-4 por essas células (Hoshino, Wiltrot et al. 1999). Quando adicionado o estímulo anti-CD3, a capacidade de produzir citocinas de padrão TH2 é aumentada. Células *naïves*

estimuladas com esse mesmo protocolo mas adicionando anti-IL-4 desenvolvem-se em células TH1, indicando que IL-18 induz TH2 de maneira dependente de IL-4 (Wild and Sur 2000, Nakanishi, Yoshimoto et al. 2001). IL-18 em conjunto com IL-23 na ausência de anti-CD3 também estimula a produção inata de IL-17 por células $\gamma\delta$ e células T CD4⁺. A deleção de IL-18Ra confere resistência ao desenvolvimento de EAE, indicando que IL-18 e IL-23 levam à conseqüente expansão das células TH17 (Lalor, Dungan et al. 2011).

Relativo ao papel de IL-18 durante a infecção por espécies de *Leishmania*, sabe-se que essa citocina pode contribuir para a proteção ou exacerbação da doença, dependendo do *background* genético do camundongo e espécie de *Leishmania* utilizada (Gurung, Karki et al. 2015). Em modelo experimental de LC por *L. major* foi demonstrado que IL-18 induz resistência à infecção no animal DBA/1 (moderadamente resistente à *L. major*), visto que os animais IL-18^{-/-} apresentam suscetibilidade à infecção (Wei, Leung et al. 1999). Na linhagem C57BL/6 (resistente à *L. major*), IL-18 apresenta papel secundário, visto que animais IL-18^{-/-} apresentam maiores lesões no início da infecção, porém conseguem controlar a infecção através de uma resposta Th1 eficiente (Monteforte, Takeda et al. 2000). Em outro extremo, no *background* BALB/c (suscetível à *L. major*) a citocina IL-18 endógena está relacionada ao desenvolvimento de uma resposta Th2: animais NLRP3^{-/-}, não produtores de IL-18, e animais WT sob neutralização da IL-18 apresentam proteção contra a LC e menor expressão de IL-4, relacionada a diminuição da expressão dos fatores de transcrição GATA 3 e cMAF em células TCD4 ativadas (Gurung, Karki et al. 2015). A IL-18 também induz a suscetibilidade durante a infecção de animais BALB/c por *L. mexicana* (Bryson, Wei et al. 2008) e na infecção de C57BL/6 por *L. amazonensis* (Sousa, Carneiro et al. 2015).

No que se refere à LV, é demonstrado que IL-18 confere resistência durante a infecção causada por *L. donovani* tanto em C57BL/6 (Murray, Tsai et al. 2006) quanto em Balb/c (Mullen, Lawrence et al. 2006), uma vez que animais geneticamente deficientes para essa citocina apresentam maior carga parasitária que a apresentada pelo grupo controle. Entretanto, a participação IL-18 durante a LV induzida por *L. infantum* ainda não é conhecida. Nesse sentido, torna-se necessário determinar o papel de IL-18 no direcionamento da resposta adaptativa que pode conferir proteção ao hospedeiro ou propiciar a disseminação dos parasitos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o papel da IL-18 no controle da infecção por *L. infantum*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a expressão de IL-18 durante a infecção de DCs *in vitro* por *L. infantum*;
- ✓ Determinar o papel da IL-18 na resistência ou susceptibilidade durante a infecção *in vivo* por *L. infantum*;
- ✓ Avaliar o papel da IL-18 na formação do infiltrado inflamatório no baço dos animais infectados
- ✓ Determinar o papel da IL-18 na modulação da resposta do tipo Th1 durante a infecção *in vivo* no baço durante a LV;

Material e Métodos

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeos C57BL/6 selvagens (do inglês *wild type/ WT*) e deficientes para IL-18 (*Il18^{-/-}*), com idades entre 7 e 8 semanas. Os camundongos, pesando entre 18 e 22 g, foram mantidos no biotério do departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, em gaiolas em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) e recebendo água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP (Protocolo Nº 044/2019).

3.2 Parasitos e Infecção Experimental

Os camundongos foram infectados por via intravenosa com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* da cepa HU-UFS 14, mantidas à 25°C em meio Schneider (Sigma-Co, Saint Louis, EUA) suplementado com soro bovino fetal à 20% (Cultilab, Campinas, SP - Brasil), 2% de urina humana masculina, 2 mM de L-glutamina, e 20 µg/mL de gentamicina (Schneider 20%) em garrafas de cultura estéreis (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA).

3.3 Carga Parasitária

Para quantificação de parasitos nos órgãos, o fígado e baço foram retirados sob condições estéreis, pesados, e a porção inferior do baço e um fragmento do lóbulo esquerdo do fígado foram pesados e triturados em um volume de 10 mL de tampão fosfato salino (PBS). Após centrifugação à 3000 rpm, 25°C por 10 minutos, o pellet foi ressuspendido em 1 mL de Schneider 20%. A partir dessa concentração, foram realizadas diluições seriadas em placas estéreis de 96 poços de fundo chato, conforme a técnica de diluição limitante descrita anteriormente por TITUS et al. 1985 (Titus, Marchand et al. 1985). A contagem de poços positivos para o crescimento de parasitos foi realizada 15 dias após o início da cultura e o número de parasitos

presentes no órgão total foi estimado conforme descrito anteriormente (Buffet, Sulahian et al. 1995).

3.4 Antígeno particulado de *L. infantum*

As culturas do parasito, como descrito acima, foram mantidas conforme descrito anteriormente. Os parasitos foram coletados e, ao atingirem a fase estacionária de crescimento, foram submetidos à 10 ciclos de congelamento (-196°C em nitrogênio líquido) e descongelamento (56°C em banho-maria). O extrato protéico foi submetido à quantificação através do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada espectrofotômetro Spectramax190.

3.5 Análise histopatológica

As amostras de tecido hepático e do baço foram fixadas em formaldeído à 10%, por 48 horas, e em álcool 70% até o processamento das amostras, que consiste em uma bateria de desidratação em soluções de álcool e xilol, e então embebidas em parafina. Foram feitos cortes seriados do tecido com 5 µm de espessura com auxílio do micrômetro. Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina. As imagens foram analisadas através da contagem do número total de núcleos, utilizando o programa ImageJ Tool (NIH, MacBiophotonics, Boston, USA).

3.6 Isolamento de leucócitos de baço

Baço de camundongos foram removidos sob condições estéreis. O órgão foi macerado em RPMI 1640 (Sigma) incompleto, lavado e centrifugado (10 min, 300 x g a 4°C). As hemácias presentes foram lisadas por choque osmótico e, imediatamente após, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI completo. Os leucócitos obtidos foram quantificados com auxílio de câmara de Neubauer em microscópio óptico comum (aumento de 40x), através da contagem de alíquotas diluídas em Tripán Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na proporção de 1:100.

3.7 Cultura de leucócitos isolados de baço

Para marcação intracelular de IFN- γ e IL-17, a cultura de células do baço foi realizada em placas de cultura com 48 poços (Corning, New York, USA) numa concentração de $2,5 \times 10^6$ céls. /poço em um volume final de 500 μ l meio RPMI 1640. As células foram estimuladas com acetato de miristato de forbol (PMA) (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) na presença de GolgiPlug (BD Biosciences) durante 4h ou com o antígeno específico (antígeno bruto de *L. infantum*) (50 μ g/ml) por um período de 72 horas em estufa de BOD, 5% de CO₂ à 37°C.

3.8 Fenotipagem dos leucócitos e citocina intracelular

Com o objetivo de caracterizar o infiltrado celular, as células obtidas do baço foram ressuspensas numa concentração de 2×10^6 células/tubo. Subsequente, foram adicionados 50 μ L de soro de coelho 10% para bloqueio durante 30 minutos, a 4°C. Após o período de incubação, foram adicionados os anticorpos monoclonais de superfícies. Para fenotipar células mielóides, como monócitos inflamatórios, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos foram utilizados anticorpos anti-CD11b, CD11c, F4/80, LY6G e LY6C, conjugados com PECY5, PECY7, APCCY7 e APC, respectivamente. Para avaliar a ativação de células dendríticas, foram utilizados anticorpos anti-CD11c conjugado PEcy7, anti-CD11b conjugado com APCcy7, anti-MHC-II conjugado com FITC, anti-CD40 conjugado com APC e anti-CD86 conjugado com PE.

Para marcação intracelular de citocinas, as células (2×10^6 células/poço, volume final de 500 μ L) foram estimuladas com PMA (50 ng/mL) e ionomicina (500 ng/mL) na presença de GolgiPlug (BD Biosciences). Após 4h de cultura, as células foram permeabilizadas com Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante, e marcadas com anticorpo anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e IFN- γ conjugados com APC-CY7, FITC, PERCP, APC, respectivamente. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (FACS-CANTOII; Becton Dickinson). As análises foram feitas usando o programa FlowJo (FlowCytometry Analysis Software vs10) o qual permite analisar todas as células adquiridas (200.000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (“Gates”)

estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

3.9 Detecção de citocinas por ELISA

A produção de citocinas foi determinada pela técnica enzimática do tipo *sandwich*, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). Amostras de tecido de fígado foram coletadas e os fragmentos foram pesados e triturados em 1 mL de solução contendo cocktail de inibidores de protease, Complete (Roche Diagnostics). A concentração de IL-10 foi mensurada no sobrenadante da cultura de células do baço após o estímulo de 72h com antígeno de *L. infantum*, conforme descrito anteriormente. A leitura da reação colorimétrica foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas (EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). A concentração das citocinas foi determinada a partir dos valores.

3.10 Diferenciação de Células Dendríticas

A geração de células dendríticas *in vitro* foi realizada a partir de precursores da medula óssea (do inglês: *bone marrow-derived dendritic cells* - BMDC) de camundongos WT, IL-18^{-/-} como descrito anteriormente por Carregaro et al., 2008 (Carregaro, Valenzuela et al. 2008). Brevemente, as células foram distribuídas em placas de Petri (Falcon 1029 placas; BD Discovery Labware) numa concentração de 1×10^6 células/placa e cultivadas com meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, 2Mm de L-glutamina, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina, 0.05 mM de 2-ME) acrescido de 20 ng/ml do recombinante murino GM-CSF (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO, USA). No 3º dia de cultura, outros 20ng/ml de rGM-CSF foram adicionados na cultura e as células foram cultivadas por mais 3 dias. A avaliação por citometria de fluxo das células CD11c⁺ diferenciadas apresentou 85-90% de positividade para CD11c.

3.11 Cultura de células dendríticas

Decorrido a diferenciação, as células foram coletadas e plaqueadas em placa de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA), utilizando meio RPMI suplementado com 10% de SBF, e incubadas com formas promastigotas de *L. infantum* (1 célula: 5 parasitos) ou LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (200 ng/ml) com meio em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. As células dendríticas (1 x 10⁶ células/ml, num volume final de 500 µl) foram mantidas por 24h em cultura para quantificação de IL-12p40, IL-10, IL-1α e IL-1β no sobrenadante da cultura e as células foram coletadas para análise da ativação de acordo com a expressão de moléculas de superfície como MHC-II e CD86 por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo CD11c conjugado com Pcy7, MHC-II conjugado com FITC e CD86 conjugado com APC (BD Bioscience e eBioscience, San Diego, CA, EUA). Para avaliar a expressão de mRNA para *IL-18*, *IL-1α* e *IL-1β* por qPCR, as células dendríticas (2 x 10⁶ células/poço) foram mantidas por 4h em cultura em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

3.12 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das culturas de BMDCs e controles e de fragmentos do fígado e baço de camundongos após 6 semanas de infecção e de controles não infectados. O método de extração combinou a utilização de TRIzol (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) seguida pela utilização parcial do kit de extração Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Alemanha). Resumidamente, após coleta do órgão, um fragmento de aproximadamente 100 mg de tecido foi armazenado em 500 µL de reagente TRIzol a -70°C até o momento da extração. O tecido foi então descongelado e triturado com auxílio de haste homogeneizadora livre de RNase seguido da adição de mais 500 µL de TRIzol e 5 minutos de repouso a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e a solução foi agitada durante 15 segundos e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. A porção aquosa superior foi removida e utilizada para prosseguimento da extração pelo *kit* Illustra RNAspin Mini de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após extração, o RNA foi quantificado e avaliado quanto a pureza e qualidade com auxílio do NanoDrop™ 2000. O RNA extraído foi submetido à confecção do cDNA. Para isso, inicialmente todas as amostras foram diluídas para concentrações semelhantes e conhecidas e depois foi

adicionado 1 μL de Oligo (dT)12-18 à 2 μg do RNA mais H₂O livre de RNase para completar um volume final de 13 μL . Esse volume foi então incubado a 65°C por 5 minutos em termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, EUA) seguido por uma incubação no gelo por 1 minuto. À reação foi adicionado um mix contendo 4 μL de tampão da enzima, 1 μL de DTT 0,1 mM, 1 μL de dNTP 10 mM e 1 μL da enzima Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) (200 U/ μL), totalizando 20 μL de volume final. A reação foi incubada a 50°C por 60 minutos e depois a 70°C por 10 minutos. O cDNA foi diluído 10 vezes em água estéril e foi armazenado a -70°C até o momento do uso.

3.13 PCR em tempo real

A análise relativa de transcritos de genes alvos foi realizada por PCR em tempo real utilizando-se do cDNA confeccionado a partir das amostras supracitadas. A reação foi realizada com 6,5 μL de SYBER Green Mix (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA), 0,5 μL de cada primer (senso e antisenso) a 10 μM , 5 μL do cDNA sintetizado a partir de 2 μg de RNA extraído e água destilada estéril suficiente para completar o volume final para 15 μL . A reação foi feita em aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA) compreendendo 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C – 30 segundos a 58°C - 30 segundos a 72°C. Um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregado para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação. Todas as reações foram feitas em duplicatas, os resultados foram normalizados com o GAPDH ou RPL13a constitutivamente expresso e analisados com base no valor de Ct (cycle threshold) ou linha de corte. O resultado foi calculado com a fórmula $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct da amostra} - \Delta\text{Ct da amostra controle}$, onde $\Delta\text{Ct} = \text{Ct gene estudado} - \text{Ct GAPDH}$. O número de vezes de expressão diferencial do RNA mensageiro comparado com o controle foi definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Os primers e sequências utilizados durante a reação de PCR em tempo real estão listados na Tabela 1.

3.14 Análise Estatística

Significância em comparações simples entre dois grupos foi avaliada pelo Teste t Student. Comparações de múltiplos grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Tratando-se de uma amostragem com distribuição fora da normalidade, os dados foram analisados pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para comparação entre medianas (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentarem valores de $p < 0,05$.

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

| GENE (Accession number) | Sequência (+) | Sequência (-) |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| IL-18 | TAGAGCTGGAAGACCAGAGACA | CATCACACTAGACCAAAGGGC |
| RPL13a | GGAGGAGAAACGGAAGGAAAAG | TTTCCGTAACCTCAAGATCTGCTT |

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 IL-18 confere resistência à infecção por *L. infantum* em animais C57BL/6

A fim de determinar o papel de IL-18 na Leishmaniose Visceral, primeiramente investigamos se a infecção por *L. infantum* induz a expressão de IL-18 *in vitro*. Para isso, BMDCs de camundongos C57BL/6 WT foram infectadas na proporção de 5:1 (parasito:célula) promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, e a expressão do mRNA para IL-18 foi avaliada nos tempos 2h, 6h, 12h e 24h.

Conforme mostrado na **figura 1A**, observamos que a infecção aumenta a expressão de RNAm de IL-18 aproximadamente 2 vezes após 6h de infecção, quando comparada às BMDCs não infectadas. A expressão se mantém aumentada após 12 e 24 horas de infecção. Esse dado demonstra que a citocina IL-18 é regulada positivamente durante a infecção por *L. infantum*, indicando possível envolvimento na Leishmaniose Visceral.

É descrito que a citocina IL-18 confere resistência à infecções por patógenos intracelulares (Garcia, Uyemura et al. 1999), mas em relação às leishmanioses, seu papel parece divergir entre as distintas espécies de *Leishmania* e background genético dos camundongos (Gurung and Kanneganti 2015). A fim de avaliar o papel de IL-18 no perfil de suscetibilidade ou resistência à infecção por *L. infantum*, animais C57BL/6 WT e geneticamente deficientes para IL-18 foram infectados por via intravenosa com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum*. O número de parasitos presentes nos órgãos-alvo da infecção, baço e fígado, foi determinado pela técnica de diluição limitante (Titus, Marchand et al. 1985). Como a hepatoesplenomegalia está relacionada com a infecção crônica na VL (Stanley and Engwerda 2007, Loeuillet, Banuls et al. 2016), foi determinado o peso dos órgãos.

De maneira interessante, animais geneticamente deficientes para IL-18 (IL-18 KO) foram mais susceptíveis à infecção, apresentando quantidades significativamente maiores de parasitos no baço e no fígado, quando comparados aos animais WT (**Fig.1B**). Em relação aos animais WT, o peso dos órgãos foi significativamente menor nos animais IL-18^{-/-} (**Fig.1C**), sugerindo que a citocina pode contribuir para a hepatoesplenomegalia observada durante a LV (Stanley and Engwerda 2007).

Tendo em vista que a inflamação é de grande importância para o controle do parasito durante a LV (Stanley and Engwerda 2007), avaliamos o infiltrado inflamatório no fígado. Para isso, fragmentos do fígado dos animais C57BL/6 (WT) e IL-18KO na 6ª semana pós-infecção foram coletados e foi realizada análise histopatológica. Tecido hepático de animais C57BL/6 e IL-18^{-/-} não infectados foram utilizados como grupos controle. Os fragmentos foram devidamente processados, cortados e corados por H&E, conforme descrito em Material e Método. Os cortes histológicos tiveram o seu infiltrado inflamatório quantificado com auxílio do software ImageJ (NIH, MacBiophotonics, Boston, USA).

Observamos que a infecção com o parasito aumentou o infiltrado inflamatório no tecido hepático tanto no animal WT quanto IL-18^{-/-} após 6 semanas de infecção, em relação aos animais não infectados. No entanto, camundongos IL-18^{-/-} infectados apresentaram redução significativa no número de células inflamatórias presentes no fígado quando comparados aos dos animais WT infectados (**Fig.1D** e **Fig.1E**). A fim de associar com o caráter de susceptibilidade encontrado em animais IL-18^{-/-}, as células inflamatórias presentes no baço foram fenotipadas por citometria de fluxo.

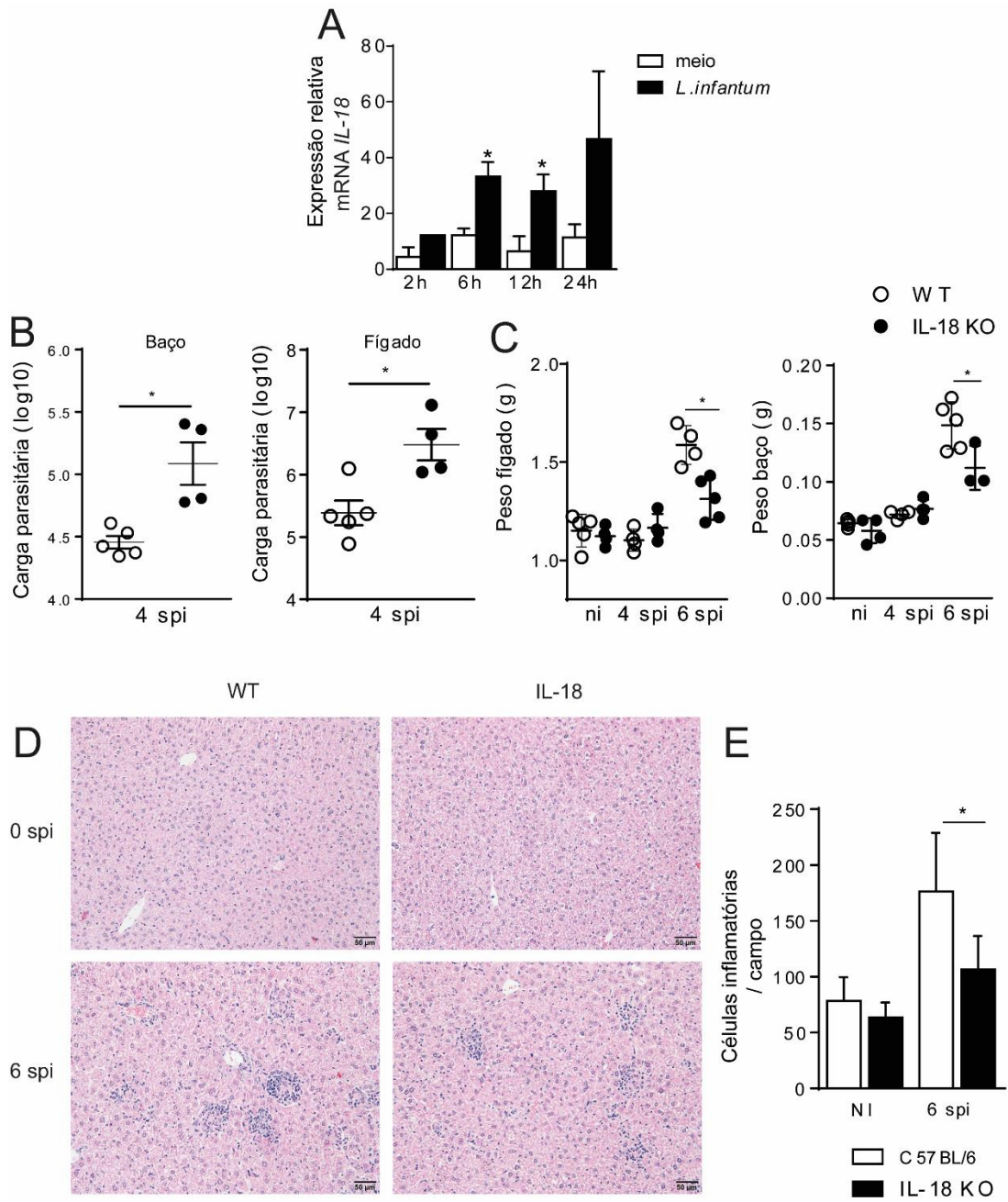


Figura 1: cinética de expressão de IL-18 e sua função *in vivo* durante a infecção por *L. infantum*. (A) BMDCs de camundongos WT foram infectadas na proporção de 5:1 (parasito:célula) formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum*. Após 2, 6, 12 e 24h, as células foram coletadas para avaliação da expressão do mRNA de IL-18 por q-PCR. Camundongos WT e IL-18 KO foram infectados por 10^7 formas promastigotas de *L. infantum* via i.v. e na 4^a e 6^a semana pós-infecção foi determinada a carga parasitária (B) e peso (C) de fígado e baço pela técnica de diluição limitante. (D) Fragmentos do fígado de animais WT e IL-18 KO não infectados e na 6^a semana pós-infecção foram incluídos em parafina, cortados em micrótomo e corados por H&E. (E) O infiltrado inflamatório foi quantificado através do software ImageJ. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média \pm DP, N=4-5 *P < 0,05 (teste *t Student*) comparado com o grupo controle WT infectado.

4.2 IL-18 regula positivamente a migração de neutrófilos durante a LV

Considerando que neutrófilos desempenham papel importante no controle da LV (McFarlane, Perez et al. 2008, Sacramento, Trevelin et al. 2015), avaliamos se o recrutamento de polimorfonuclear é dependente de IL-18. Para isso, isolamos leucócitos do baço de camundongos WT e IL-18^{-/-} após 4 e 6 semanas de infecção e analisamos a população de neutrófilos, caracterizada como CD11b^{hi}Ly6G⁺, de acordo com a estratégia de *gate* apresentada (**Fig. 2A**).

Tanto na 4^a como na 6^a semana pós-infecção, a frequência de neutrófilos no órgão foi semelhante à do grupo WT (**Fig.2B** e **Fig.2C**). No entanto, os animais geneticamente deficientes para IL-18 apresentaram número absoluto de neutrófilos esplênicos significativamente menor quando comparados aos animais WT na 6^a semana pós-infecção. Essa redução foi de aproximadamente 50% quando comparada ao grupo WT infectado (**Fig.2E**). Esses dados sugerem que IL-18 participa no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção, e esses participam do controle da replicação dos parasitos (Sacramento, Trevelin et al. 2015).

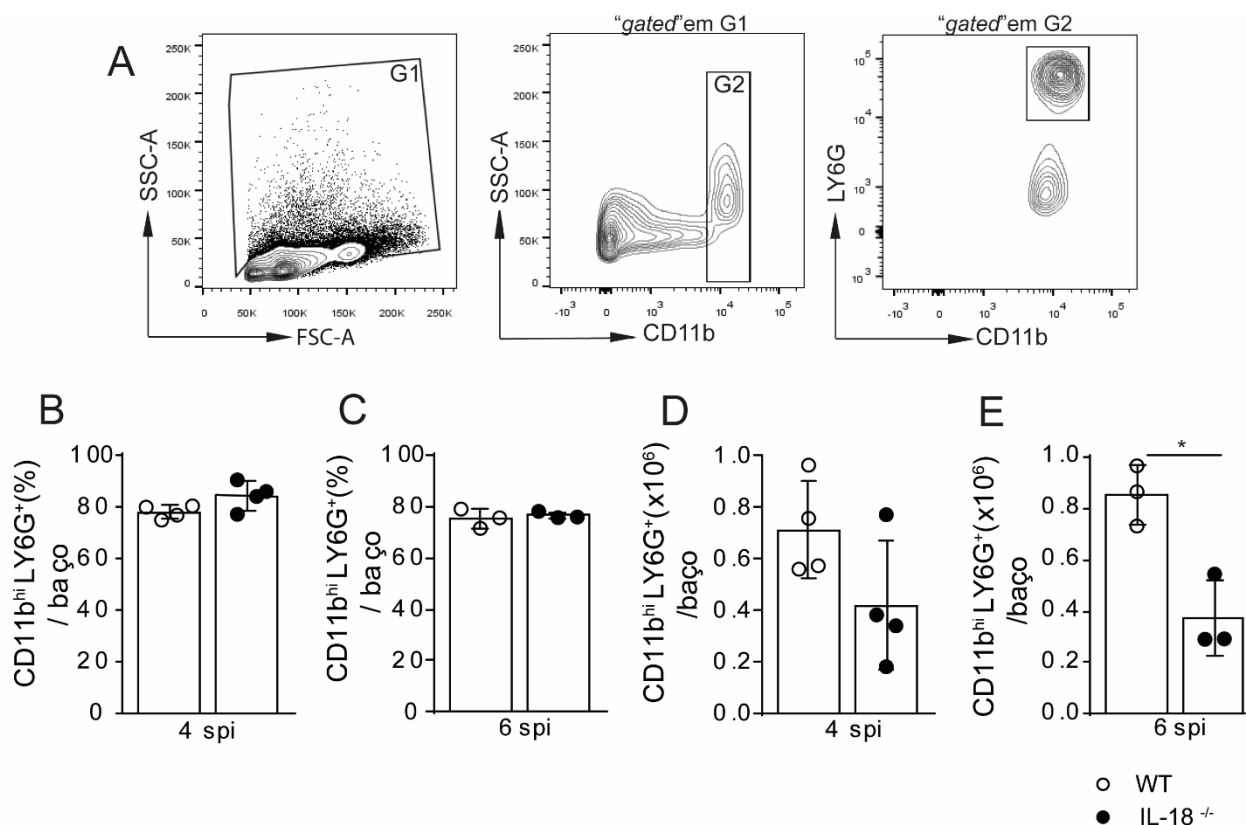


Figura 2: IL-18 participa da inflamação neutrofílica no baço durante a LV. Leucócitos isolados do baço de animais WT e IL-18 KO na 4^a e 6^a semana pós-infecção foram fenotipados por citometria de fluxo. A análise de neutrófilos foi realizada pela expressão dos marcadores CD11b^{hi}Ly6G⁺, como demonstrado no *dot-plot* representativo (A). Os gráficos de barra representam frequência (B, C) e o número absoluto (D, E) de células presentes no baço de animais WT e IL-18 KO na 4^a (B, D) e 6^a (C, E) semana pós-infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média \pm DP, N=3-4, *P<0,05 (teste *t Student*) comparado com o grupo controle WT infectado

4.3 IL-18 participa do recrutamento de monócitos CD11b^{hi}Ly6C^{hi} e CD11b^{hi}Ly6C^{low} durante a LV

O influxo de monócitos sanguíneos para o sítio de infecção tem papel chave na resposta inicial e estabelecida na LV (Cervia, Rosen et al. 1993). Para avaliar o infiltrado de monócitos no baço dos camundongos WT e IL-18^{-/-}, isolamos leucócitos após 4 e 6 semanas pós-infecção e analisamos por citometria de fluxo duas populações de monócitos: CD11b^{hi}Ly6C^{hi}, chamados monócitos inflamatórios, e CD11b^{hi}Ly6C^{low}, monócitos patrulhadores, subtipo residente que “patrulha” vasos de tecidos saudáveis através do movimento de rastejar pelo endotélio, dependente da integrina LFA-1, que permite rápida invasão do tecido em caso de dano tecidual ou infecção (Bartil, Bounekhel et al. 2007, Geissmann, Manz et al. 2010).

Interessante que a frequência dessas populações, tanto na 4^a quanto na 6^a semana pós-infecção, foi similar entre os animais WT e IL-18KO (**Fig.3B** e **Fig.3D**). Porém, o número absoluto dessas células, em ambos períodos analisados, foi significativamente menor para os animais geneticamente deficientes de IL-18 (**Fig.3C** e **Fig.3E**). Nos animais IL-18KO, em relação ao grupo controle, a população CD11b^{hi}Ly6C^{hi}, diminuiu à, aproximadamente, 50%, enquanto a população CD11b^{hi}Ly6C^{low} apresentou redução de, aproximadamente, 70% e 60% na 4^a e 6^a semana, respectivamente, demonstrando também a participação de IL-18 no recrutamento de monócitos para o baço.

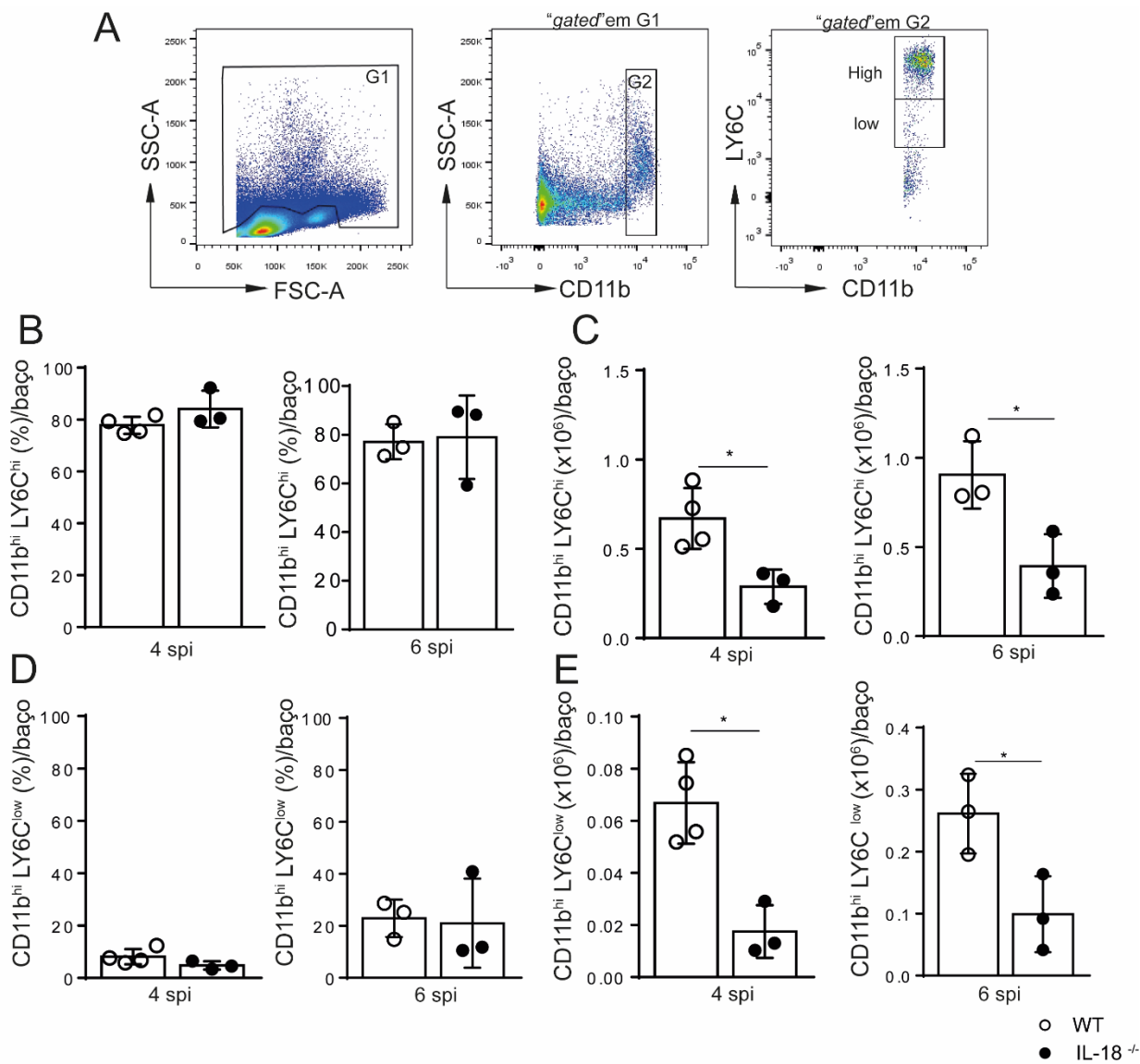


Figura 3: IL-18 interfere na migração de monócitos durante a LV. Leucócitos isolados do baço de animais WT e IL-18 KO na 4^a e 6^a semana pós-infecção foram fenotipados por citometria de fluxo. (A) *Dot-plot* representativo das diferentes subpopulações (P) de células mielóides no baço, baseados na expressão de CD11b^{high}LY6C^{high} (P1) e CD11b^{high}LY6C^{low}(P2). A frequência (B, D) e o número absoluto (C, E) de cada subpopulação presente no baço de animais C57BL/6 infectados (barras-círculos brancos) ou IL-18KO (barras-círculos pretos) são apresentadas em diferentes períodos pós-infecção (4 e 6 semanas). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média \pm DP, N=3-4, *P<0,05 (teste *t Student*) comparado com o grupo controle WT infectado.

4.4 IL-18 está envolvida na manutenção da população de células dendríticas no baço

A resposta imunológica é iniciada por macrófagos e células dendríticas residentes, e resulta na produção de citocinas e quimiocinas, mediando a inflamação local através do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio da infecção, além de seu papel na apresentação de antígenos (Liu and Uzonna 2012). Para avaliar o infiltrado de macrófagos e células dendríticas no baço, utilizamos anticorpos específicos e, por citometria de fluxo, identificamos as distintas populações no baço de animais WT e IL-18 KO na 4^a semana pós-infecção.

A população de células dendríticas, caracterizadas como células CD11b⁺CD11c⁺F4/80⁻ (Fig. 4A), dos animais IL-18 KO apresentou redução significativa em termos de frequência e número absoluto, quando comparadas aos animais WT (**Fig.4B**). Já a população de macrófagos CD11b⁺CD11c⁺F4/80⁺ não apresentou diferença entre os grupos (**Fig.4C**). Avaliamos também a ativação dessas células, através da análise da expressão de moléculas do MHC de classe II e de moléculas coestimuladoras como CD40 e CD86.

Dentro da população de células dendríticas (**Fig.4D, Fig.4F e Fig.4H**), assim como na população de macrófagos (**Fig.4E, Fig.4G e Fig.4I**), não observamos alteração no número absoluto e na intensidade de fluorescência integrada média (MIF) de moléculas de MHC-II, CD40 e CD86 nos animais deficientes para IL-18 em relação aos animais WT. Assim, podemos sugerir que a IL-18 tem papel na manutenção do infiltrado esplênico de células dendríticas, mas não participa no processo de ativação dessas células.

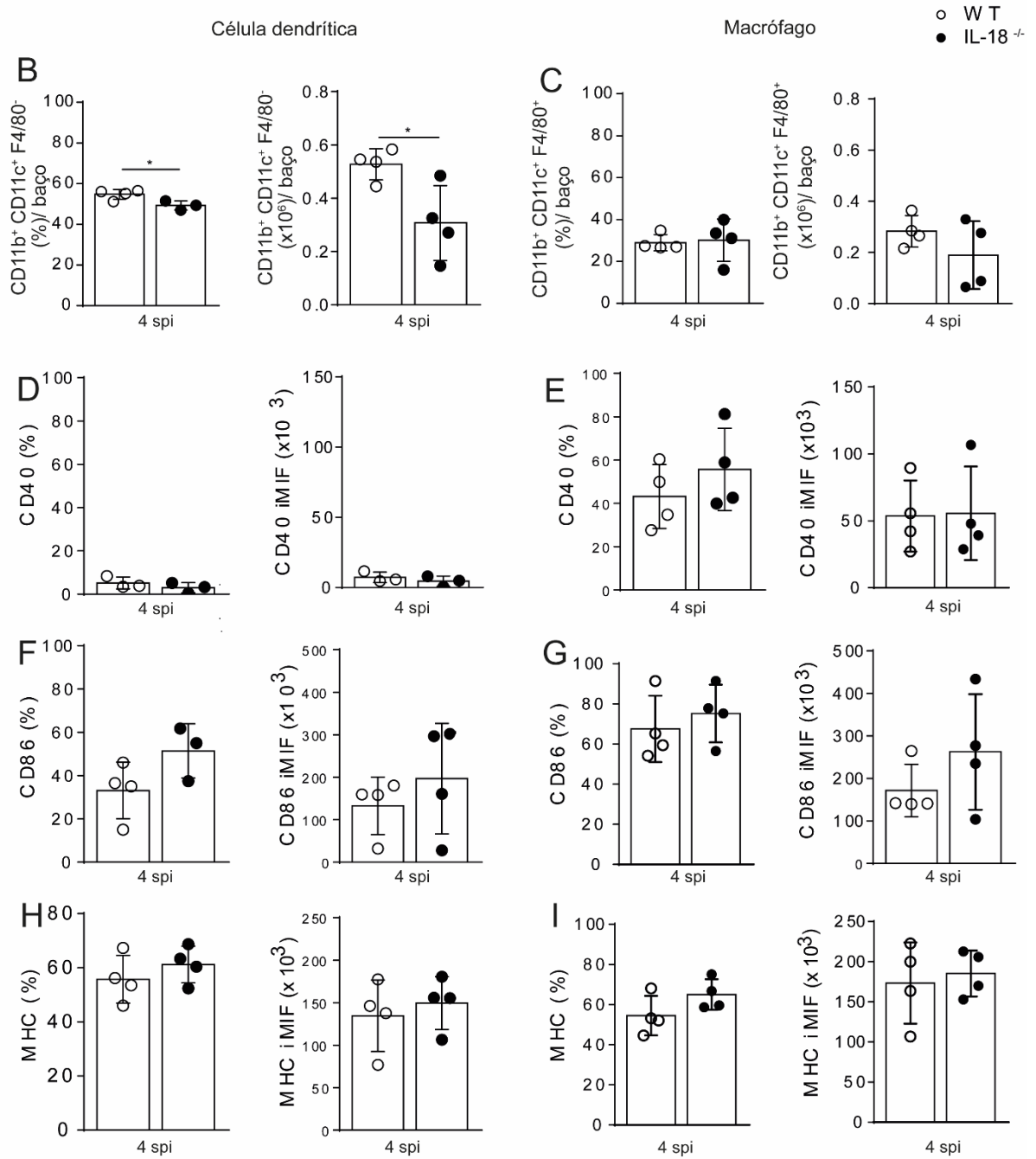
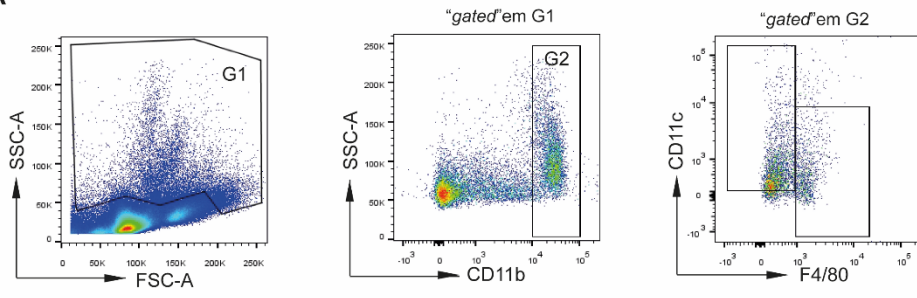
A

Figura 4: IL-18 está envolvida na manutenção do infiltrado de células dendríticas no baço. Leucócitos isolados do baço de animais WT e IL-18 KO na 4ª semana pós-infecção foram fenotipados por citometria de fluxo. Em **A**, *dot-plots* representativos da estratégia de *gate* utilizada. Frequência (esquerda) e número absoluto (direita) da população de células dendríticas (CD11b⁺CD11c^{hi}F4/80⁻) (**B**) e de macrófagos CD11b⁺CD11c⁻F4/80⁺ (**C**) são apresentados nos gráficos de barras. A ativação das células é determinada pela frequência (esquerda) e a intensidade de fluorescência integrada média (MIF) (direita) das moléculas de superfície CD40 (**D,E**), CD86 (**F,G**) e moléculas de MHC-II (**H,I**). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média ±DP, N=3-4, *P<0,05 (teste *t Student*) comparado com o grupo controle WT infectado.

4.5 IL-18 regula positivamente a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e T CD8⁺ durante infecção por *L. infantum*

Visto que a resposta Th1 participa do controle da infecção por Leishmania (Nylen and Sacks 2007, Kumar and Nylen 2012), investigamos se a susceptibilidade encontrada em animais geneticamente deficientes para IL-18 (**Figura 1B**) poderia ser em decorrência do comprometimento de uma resposta de células TCD4⁺ e/ou TCD8⁺ produtoras de IFN- γ . Para isso, leucócitos isolados do baço de camundongos WT e geneticamente deficientes para IL-18 na 4^a e 6^a semanas de infecção foram reestimulados com PMA e ionomicina e, em seguida, as células foram marcadas com anticorpos específicos, conforme descrito em M&M. Tanto a frequência quanto o número absoluto de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ totais, assim como de linfócitos produtores de IFN- γ , foram avaliados por citometria de fluxo.

A frequência das populações de linfócitos totais TCD4⁺ (**Fig.5B** e **Fig.5C**) e TCD8⁺ (**Fig.5F** e **Fig.5G**) mostrou-se semelhante entre os animais IL-18^{-/-} e WT na 4^a e 6^a semana pós-infecção. Quanto ao número absoluto, os animais IL-18KO apresentaram redução das populações de linfócitos TCD4⁺ (**Fig.5D** e **Fig.5E**) e TCD8⁺ (**Fig.5H** e **Fig.5I**), em relação aos animais WT, em ambos períodos analisados.

Avaliando a frequência das células TCD4⁺ (**Fig.6B** e **Fig.6C**) e TCD8⁺ (**Fig.6F** e **Fig.6G**) produtoras de IFN- γ , ambos os grupos, WT e IL-18^{-/-}, apresentaram porcentagens semelhantes dessas células na 4^a e 6^a semana pós-infecção. Porém, em termos de número absoluto de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ (**Fig.6D** e **Fig.6E**), o grupo IL-18KO apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo WT. A população de TCD8⁺ IFN- γ ⁺ (**Fig.6H** e **Fig.6I**) também apresentou redução significativa em relação aos animais WT na 4^a semana pós-infecção, demonstrando a participação de IL-18 na produção de IFN- γ por linfócitos TCD4⁺.

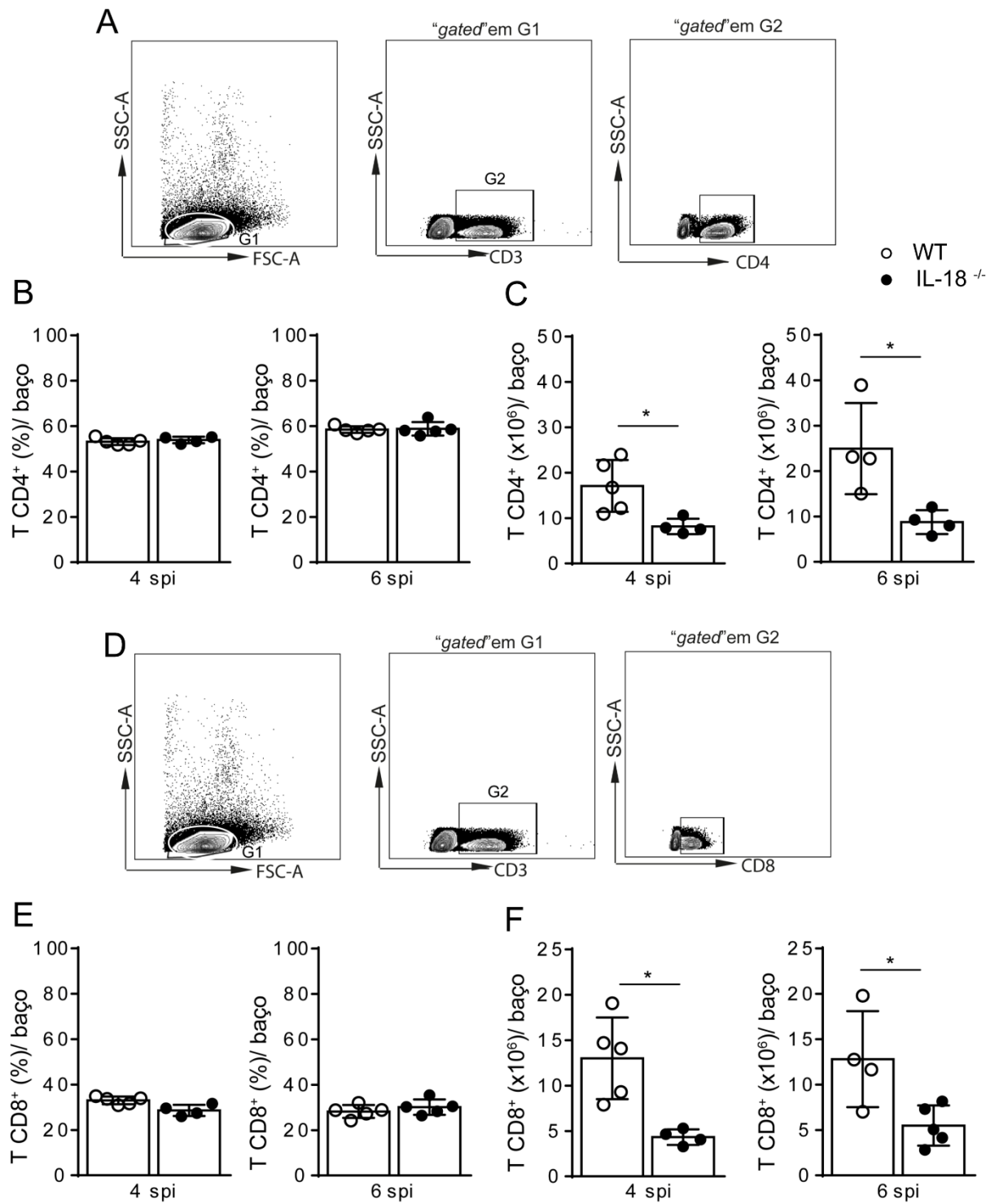
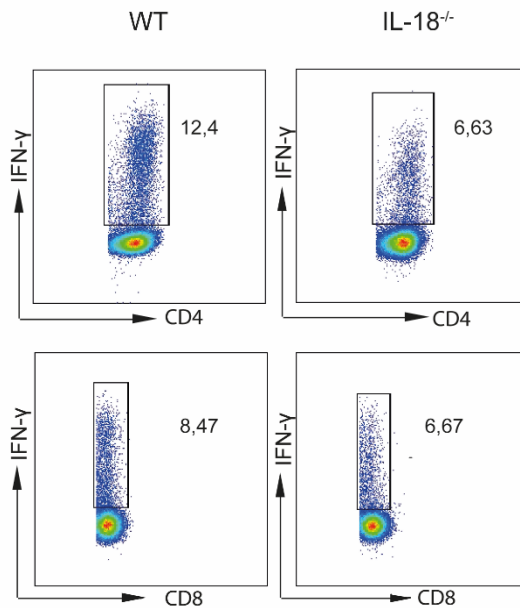


Figura 5: IL-18 interfere na população de linfócitos T durante a LV. A porcentagem e número absoluto de células TCD4⁺ e de TCD8⁺ presentes no baço de animais WT e IL-18 foram determinados na 4^a e 6^a semana pós-infecção por citometria. Estratégia de *gate* da análise de células T CD4⁺ (**A**) e T CD8⁺(**D**). Os gráficos de barra representam frequência (**B,E**) e o número absoluto (**C,F**) de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço de animais WT e IL-18 KO na 4^a e 6^a semana pós-infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média \pm DP, N= 4-5 *P<0,05 (teste *t Student*) comparado com o grupo controle WT infectado.

A



○ WT
● IL-18^{-/-}

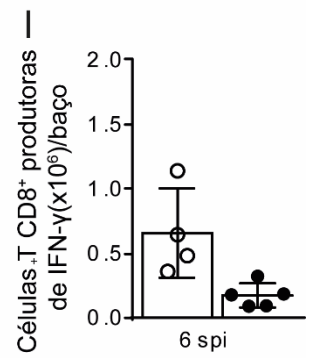
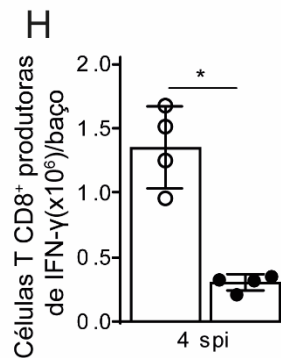
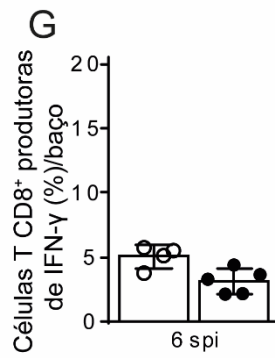
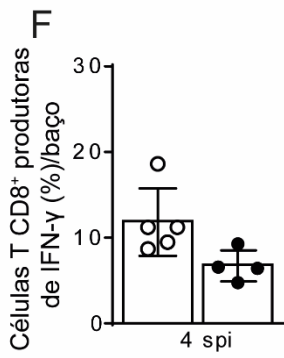
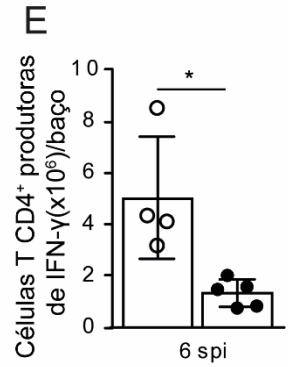
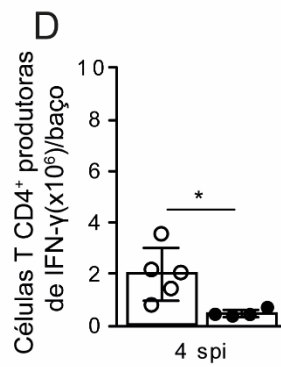
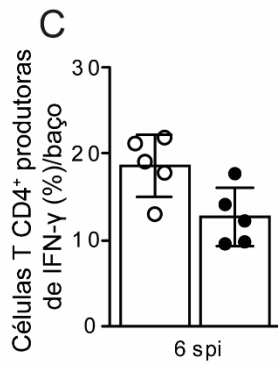
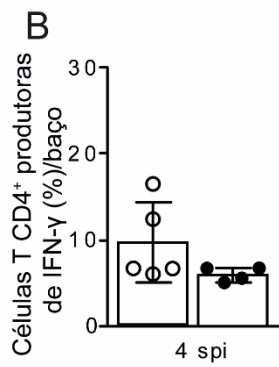


FIGURA 6: IL-18 regula positivamente a produção de IFN- γ na LV. A porcentagem e número absoluto de células TCD4⁺ e de TCD8⁺ produtoras de IFN- γ presentes no baço de animais WT e IL-18 foram determinados na 4^a e 6^a semana pós-infecção. Para marcação intracelular de IFN- γ , as células do baço de animais WT e IL-18 na 4^a e 6^a semanas pós infecção foram reestimuladas *in vitro* com PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) por 4 horas e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. A produção de IFN- γ foi determinada dentro da gate CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ e os gráficos de barras representam a frequência e número das populações. **(A)** *Dot-plots* representativos da porcentagem de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD8⁺IFN- γ ⁺ no baço de animais WT e IL-18 KO na 4^a semana pós-infecção. A frequência **(B,D)** e o número absoluto **(C,E)** de cada população são apresentadas em diferentes períodos pós-infecção (4 e 6 semanas). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média \pm DP, N= 4-5, *P<0,05 (teste *t student*) comparado com o grupo controle WT infectado.

4.6 A IL-18 induz a produção de IL-12 durante a LV

Já está bem estabelecido na literatura que IL-12 tem papel central na diferenciação e manutenção da resposta de padrão Th1 (Trinchieri 1993) e IL-18 facilita a produção de IFN- γ por essas células particularmente por atuar em conjunto com IL-12 (Nakahira, Ahn et al. 2002). Nesse sentido, avaliamos se a resposta Th1 reduzida em animais IL-18^{-/-} poderia ser em decorrência do comprometimento da produção de IL-12. Para isso, BMDCs de animais WT e IL-18^{-/-} foram infectadas com formas promastigotas de *L.i.* na proporção de 5:1 (parasito: células) e/ou estimuladas com LPS (200ng/mL) por 24 horas e o sobrenadante foi coletado para dosagem de IL-12p40 por ELISA.

Como esperado, a infecção pelo parasito induz a produção significativa de IL-12p40 em células WT, quando comparada às células não infectadas. Entretanto, tal produção foi reduzida na ausência de IL-18 (**Fig.7A**). Mesmo sob a ativação com LPS, a produção de IL-12p40 foi significativamente reduzida na ausência de IL-18, sugerindo que a IL-18, além de atuar em sinergia com IL-12 na diferenciação e manutenção de IFN- γ por células Th1 e TCD8⁺ (Stuyt, Netea et al. 2001, Nakahira, Ahn et al. 2002), também atua de maneira autócrina estimulando a produção de IL-12.

A

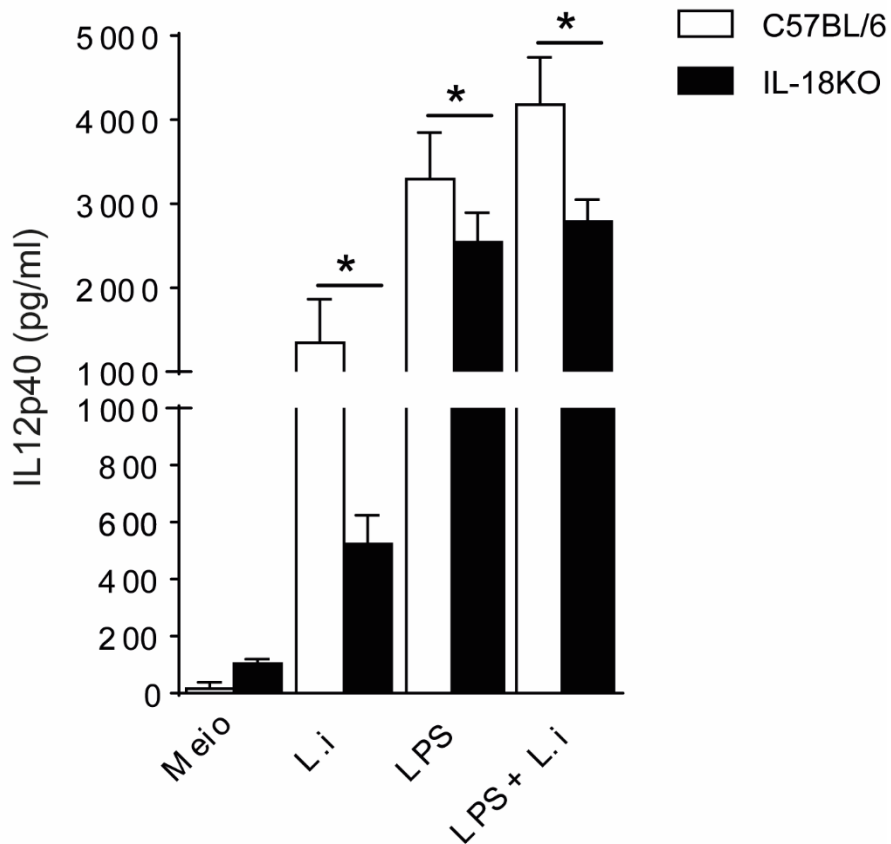


FIGURA 7: IL-18 estimula a produção de IL-12p40 durante a infecção *in vitro* por *L. infantum*. BMDCs de camundongos WT e KO de IL-18 foram infectadas na proporção de 5:1 (parasito:célula) promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, ou estimuladas com LPS (200ng/mL). Após 24h, o sobrenadante foi coletado para quantificar IL12p40(A) por ELISA. Os dados são representativos de dois experimentos e expressos em média \pm DP, *P<0,05 (ANOVA com pós-teste de Bonferroni) comparado a BMDC WT.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A resposta imunológica tem papel importante no desenvolvimento de doenças, influenciando seu prognóstico. Nas leishmanioses essa resposta tende a variar tanto devido à capacidade dos patógenos em induzir ou subverter mecanismos de proteção, assim como devido às características genéticas do hospedeiro (Kaye and Scott 2011). Fatores solúveis e receptores de membrana são peças chaves no direcionamento da resposta imune contra patógenos como *Leishmania* (Vieira, 2012). No presente trabalho demonstramos que IL-18 confere resistência à infecção por *L. infantum* em camundongos C57BL/6.

Têm sido crescente as evidências de que IL-18 participa dos mecanismos regulatórios da resposta imunológica, sendo fator crítico na resposta do hospedeiro a várias infecções e doenças autoimunes (Komai-Koma, Gracie et al. 2003). No contexto de infecções, trabalhos têm mostrado que IL-18 tem papel protetor no controle de patógenos intracelulares (Mencacci, Bacci et al. 2000, Neighbors, Xu et al. 2001, Schneider, Korbel et al. 2010). Nosso grupo demonstrou o papel protetor da IL-18 no modelo de infecção pulmonar pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Ketelut-Carneiro, Silva et al. 2015). Na infecção por espécies de *Leishmania*, no entanto, o papel de IL-18 parece variar de acordo com a espécie do parasito e a cepa de camundongos utilizados (Gurung and Kanneganti 2015). Considerando a ausência de informações acerca dessa citocina na LV causada por *L. infantum*, avaliamos se IL-18 poderia desempenhar algum papel durante o curso da infecção experimental por *L. infantum in vivo*. De maneira interessante, verificamos o papel protetor de IL-18 durante a infecção *in vivo* por *L. infantum*, uma vez que animais geneticamente deficientes para a citocina foram incapazes de controlar o crescimento do parasito no baço e no fígado, órgãos-alvo na LV.

Mostramos que a infecção por *L. infantum* induz a expressão do RNAm de IL-18 em BMDCs. Consta na literatura que a infecção por *L. major* estimula a produção de IL-18 por macrófagos derivados de medula-óssea (BMDM) (Gurung, Karki et al. 2015) e na infecção por *L. donovani*, em BALB/c, há aumento da expressão do RNAm da IL-18 na 2ª e 4ª spi (Murray, Tsai et al. 2006). A IL-18 é produzida como a forma biologicamente inativa pró-IL-18 e necessita ser clivada por uma enzima e esse processo é regulado por inflamassomas (van de Veerdonk, Netea et al. 2011). Não

avaliamos o papel de inflamassomas na produção de IL-18 durante a LV, mas é um ponto a ser explorado por trabalhos futuros.

O desenvolvimento de hepatoesplenomegalia é um importante sinal clínico durante a VL (Murray, Berman et al. 2005, Stanley and Engwerda 2007). Nossos dados mostram que os pesos desses órgãos se apresentaram menores no animal IL-18^{-/-} em comparação ao WT na 6ª semana de infecção. Em acordo com esse resultado, em dados publicados por nosso grupo, animais *Il17ra*^{-/-} suscetíveis à infecção por *L. infantum*, também apresentaram baço e fígado menores que os do grupo controle (Nascimento, Carregaro et al. 2015). Esse fenômeno pode ser resultado de uma resposta inflamatória menos intensa. Visto que a inflamação sustentada é fundamental para um eficiente prime de células T e *clearance* dos parasitos (Hammami, Abidin et al. 2018), avaliamos o infiltrado inflamatório do animal IL-18^{-/-}. A análise histopatológica do fígado dos animais IL-18^{-/-} confirmou a diminuição significativa do número de células inflamatórias no órgão. Corroborando com nossos dados, um outro estudo mostra que, durante a LV, IL-18 modula/induz a formação de granulomas no início da infecção (Murray, Tsai et al. 2006). Em adição, estudo sobre lesão hepática mostra que IL-18 modula a inflamação através do recrutamento de células inflamatórias para o sítio (Kimura, Sekiguchi et al. 2011). Considerando que a alteração no infiltrado inflamatório pode ser responsável pela queda na capacidade do animal IL-18^{-/-} de controlar o parasito nos órgãos alvo da LV, nesse estudo avaliamos quais populações do infiltrado leucocitário esplênico são alteradas no animal IL-18^{-/-} infectado por *L. infantum*. De maneira interessante, observamos que a ausência de IL-18 prejudicou a migração de neutrófilos, monócitos e células dendríticas para o baço, o que acreditamos ser decorrente da fraca indução da resposta adquirida TH1, visto que o IFN- γ induz a expressão de quimiocinas. No entanto, não descartamos o papel inato da IL-18 no estímulo da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, que também será discutido (Morel, Park et al. 2001).

A resistência de uma linhagem de camundongo à infecção por *Leishmania* está relacionada à sua capacidade de desenvolver uma resposta de tipo TH1, produtora IFN- γ (Scott 1998, Rodrigues, Cordeiro-da-Silva et al. 2016). A ativação de MyD88 via TLR/IL-1R/IL-18R possui papel importante na polarização de diferentes perfis de linfócitos TCD4⁺ (O'Donnell, Pham et al. 2014). Em nosso modelo,

observamos que IL-18 modula positivamente a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺, visto que há o decréscimo dessa população celular no baço de animais IL-18^{-/-} durante a infecção por *L. infantum*. Em infecção por *L. major*, o animal sensível IL-18^{-/-} também apresenta menor produção de IFN- γ no baço (Murray, Tsai et al. 2006).

As células T CD8⁺ também tem papel protetor na Leishmaniose, na LV essas células apresentam entre seus mecanismos a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α , a liberação de grânulos citotóxicos e interação Fas/FasL (Tsagozis, Karagouni et al. 2003, Tsagozis, Karagouni et al. 2005). Neste trabalho observamos uma diminuição na população de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no baço de animais IL-18^{-/-}, em concordância com publicações que mostram que, em combinação com a IL-12, a IL-18 age sinergicamente para estimular a produção de IFN- γ por células T CD8⁺ (Berg, Cordes et al. 2002, Smeltz 2007). O mecanismo envolvido na redução da resposta Th1 é a diminuição significativa da produção de IL-12p40, observado em BMDCs IL-18^{-/-} infectadas por *L. infantum*. O que se alinha ao fato de que IL-12 é crítica para o direcionamento da resposta de células T e desenvolvimento de resistência (Sacks and Noben-Trauth 2002).

O papel de IFN- γ na ativação da resposta imune inata é crítico para a defesa do hospedeiro contra organismos intracelulares (Fearon and Locksley 1996). Esta citocina ativa mecanismos microbicidas, incluindo a indução de iNOS e a produção de NO (Bogdan, Gessner et al. 1996). IFN- γ também é responsável por regular outra função do sistema imune inato, o tráfico de células mieloides, visto que a expressão de quimiocinas, como CXCL10(IP-10), CXCL11(I-TAC), CCL3(MIP-1 α), CCL4(MIP-1 β), CCL5(RANTES) CCL20(MIP-3 α) são induzidas por esta citocina (Nacy, Fortier et al. 1983, Boehm, Klamp et al. 1997, Scapini, Crepaldi et al. 2002, Schroder, Hertzog et al. 2004, Han, Suh et al. 2017). Essas quimiocinas são quimioatraentes para linfócitos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas (Leonard and Yoshimura 1990, Ramos, Canetti et al. 2005, Murray, Luster et al. 2017). Acreditamos que, a resposta Th1 induzida via IL-18R garante a produção de quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, monócitos e DCs no baço durante o nosso modelo de LV.

Neutrófilos são a primeira população de leucócitos a migrar para o sítio de infecção após inoculação de *L. infantum* em orelha de camundongo (Thalhofer, Chen et al. 2011) e essas células contribuem para o controle da infecção por *L. infantum* no

baço (Rousseau, Demartino et al. 2001, Sacramento, Trevelin et al. 2015). Mostramos que IL-18 participa da inflamação neutrofílica no baço, sendo observada no órgão do animal *IL-18*^{-/-} uma reduzida população de neutrófilos. Em concordância com nossos dados, estudos anteriores demonstram que IL-18 pode induzir inflamação ativando e atraindo neutrófilos (Leung, Culshaw et al. 2001), essa citocina participa do recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório induzido por antígeno levando células a produzirem TNF- α , que induz a produção de Leucotrieno B₄ (LTB₄) (Canetti, Leung et al. 2003), que apresenta função quimioatraente para neutrófilos (Dahlen, Bjork et al. 1981, Ford-Hutchinson 1990). A produção sequente de TNF- α e LTB₄ também pode ser induzida pela sinalização de MIP1- α (*Macrophage inflammatory protein 1 alpha*), a qual é induzida pela sinalização de MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein 2*) (Ramos, Canetti et al. 2005, Ramos, Fernandes et al. 2006). Estudo posterior mostrou que a IL-18 também pode ativar cascata de sinalização IL-18→MIP-2→MIP- α →TNF- α →LTB₄ (Verri, Cunha et al. 2007). O que se justifica pelo fato de NF- κ B regular a expressão de MIP-2 (Kim, Han et al. 2003). Estudos com neutrófilos humanos sugerem que concentrações fisiológicas da IL-18 poderiam estimular neutrófilos de modo a facilitar sua migração dos vasos para tecidos e aumentar sua atividade microbicida (Wyman, Dinarello et al. 2002, Elbim, Guichard et al. 2005, Hirata, Kotani et al. 2008).

Nosso grupo mostrou que durante a infecção por *L. infantum* a sinalização via TLR2 e TLR9 é essencial para o controle do parasito através de um mecanismo dependente do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção mediado pela ativação de fatores quimiotáticos CXCL1(KC) e CXCL2(MIP-2) por DCs (Sacramento, Trevelin et al. 2015). Estudos mostram que a incubação de DCs com oligonucleotídeos CpG, agonista de TLR9, induz o aumento da expressão de *IL-18* (Bohle, Jahn-Schmid et al. 1999) e *in vivo* a injeção de CpG aumenta rapidamente a expressão de *IL18* RNAm no baço de animais WT (Girard-Guyonvarc'h, Palomo et al. 2018). Essa indução também foi relatada após o tratamento de BMDMs com o agonista de TLR2 *Pam3CSK4*.

Na LV, após uma hora da inoculação intradérmica de promastigotas de *L. donovani* em hamster, há inicialmente o recrutamento de neutrófilos e monócitos, infiltrado que se torna principalmente mononuclear após 48 horas (Wilson, Innes et al. 1987). No sítio inflamatório, essas células se diferenciam em células com funções de

macrófagos e células dendríticas (Leon, Martinez del Hoyo et al. 2004, Geissmann, Manz et al. 2010). O bloqueio do influxo de monócitos na LV prejudica os mecanismos de formação de granuloma, a capacidade de responder ao IFN- γ com *killing* intracelular e a capacidade de resistência (Cervia, Rosen et al. 1993). Nossos dados demonstram que na infecção por *L. infantum*, animais *IL-18^{-/-}* apresentam uma diminuição significativa na população de monócitos. Em acordo com nossos dados, foi observado o papel de IL-18 como mediador do recrutamento de monócitos em estudo com modelo de artrite reumatoide, o animal *IL-18^{-/-}* apresentou redução de MIP-3/CCL20 (Ruth, Park et al. 2010). Essa quimiocina se liga ao receptor CCR6 expresso em monócitos promovendo a migração da célula (Manthey, Cochain et al. 2013). Estudos prévios com monócitos humanos demonstram que, de modo dependente de IL-12, IL-18 contribui para a sobrevivência e retenção de monócitos nos sítios inflamatórios (Stuyt, Netea et al. 2003, Coma, Pena et al. 2006). Essas citocinas levam ao aumento da expressão da molécula de adesão intercelular-1 (do inglês: *Intercellular Adhesion Molecule 1*- ICAM-1) (Stuyt, Netea et al. 2003), a expressão dessa molécula de adesão é um passo importante na indução da inflamação, estando relacionada ao extravasamento de leucócitos para o sítio inflamatório e às interações intercelulares, como a formação de *clusters* (Coma, Pena et al. 2006). Durante a inflamação, IL-18 em sinergia com IL-12 além de promover a clusterização e a sequente diferenciação de monócitos para macrófagos, previne a apoptose espontânea dessas células, além de aumentar a expressão dos ligantes de quimiocinas que podem recrutar monócitos, células T ativadas (CXCL9 e CXCL10) e granulócitos (CXCL8) (Coma, Pena et al. 2006). Estudo com infecção bacteriana, mostrou que IFN- γ dependente de Myd88 (TLR/IL-1R/IL-18R) recruta monócitos para o baço via CCR2 através da indução da produção de MCP-1 (CCL2) (Pietras, Miller et al. 2011)

Células dendríticas representam uma pequena população de leucócitos, mas exercem papel importante na iniciação da resposta imune e conexão entre imunidade inata e adaptativa (Basu, Chakrabarti et al. 2000). Na Leishmaniose Visceral, DCs maduras aparecem no baço algumas horas após a infecção e são responsáveis pela produção inicial de IL-12 e priming de células T CD4 (Gorak, Engwerda et al. 1998, Stager, Maroof et al. 2006). Nossos dados mostram a diminuição da população de células dendríticas esplênicas na ausência de IL-18, sugerindo que a IL-18 pode ter

papel na migração de células dendríticas da medula óssea para o baço, ou ser decorrente do efeito de IL-18 no infiltrado de monócitos, que originam DCs. Em um trabalho anterior, foi proposto que IL-18 tem efeito migratório direto em células dendríticas derivadas de monócitos (do inglês, *monocyte derived dendritic cells* - MoDC) e DCs epidermais humanas, pois a citocina induz polimerização de filamentos de actina e migração em experimentos em câmara de Boyden (Gutzmer, Langer et al. 2003). Esse é um potencial mecanismo de recrutamento dessas células para o sítio de inflamação, principalmente em condições de resposta TH1, visto que a expressão de IL-18R em DCs é aumentada por IFN- γ .

Os dados demonstrados no presente trabalho abrem novas perspectivas para outros estudos, buscando compreender os mecanismos pelos quais essa citocina é produzida, atua, e como poderia ser aplicada como terapia para modular e fortalecer a resposta imune do hospedeiro.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, no presente trabalho demonstramos que a IL-18 promove resistência à infecção experimental por *Leishmania infantum*. Os mecanismos pelo qual o controle do parasito é induzido estão relacionados ao desenvolvimento de uma resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ , através da indução da produção de IL-12. Como consequência há o recrutamento de neutrófilos, monócitos e células dendríticas para o sítio da infecção, que atuam no controle da replicação do parasito.

Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdeladhim, M., S. Kamhawi and J. G. Valenzuela (2014). "What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity." Infect Genet Evol **28**: 691-703.
- Anderson, C. F., R. Lira, S. Kamhawi, Y. Belkaid, T. A. Wynn and D. Sacks (2008). "IL-10 and TGF-beta control the establishment of persistent and transmissible infections produced by *Leishmania tropica* in C57BL/6 mice." J Immunol **180**(6): 4090-4097.
- Barral-Netto, M., A. Barral, C. E. Brownell, Y. A. Skeiky, L. R. Ellingsworth, D. R. Twardzik and S. G. Reed (1992). "Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism." Science **257**(5069): 545-548.
- Bartil, T., M. Bounekhel, C. Cedric and R. Jeerome (2007). "Swelling behavior and release properties of pH-sensitive hydrogels based on methacrylic derivatives." Acta Pharm **57**(3): 301-314.
- Basu, A., G. Chakrabarti, A. Saha and S. Bandyopadhyay (2000). "Modulation of CD11C+ splenic dendritic cell functions in murine visceral leishmaniasis: correlation with parasite replication in the spleen." Immunology **99**(2): 305-313.
- Bates, P. A. (2008). "Leishmania sand fly interaction: progress and challenges." Curr Opin Microbiol **11**(4): 340-344.
- Berg, R. E., C. J. Cordes and J. Forman (2002). "Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18." Eur J Immunol **32**(10): 2807-2816.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot and J. C. Howard (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-795.
- Bogdan, C., A. Gessner, S. Werner and R. Martin (1996). "Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites." Current Opinion in Immunology **8**(4): 517-525.
- Bohle, B., B. Jahn-Schmid, D. Maurer, D. Kraft and C. Ebner (1999). "Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro." Eur J Immunol **29**(7): 2344-2353.
- Brodskyn, C., S. M. Beverley and R. G. Titus (2000). "Virulent or avirulent (dhfr-ts-) *Leishmania* major elicit predominantly a type-1 cytokine response by human cells in vitro." Clinical and Experimental Immunology **119**(2): 299-304.
- Bryson, K. J., X. Q. Wei and J. Alexander (2008). "Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice." Microbes Infect **10**(7): 834-839.
- Buffet, P. A., A. Sulahian, Y. J. Garin, N. Nassar and F. Derouin (1995). "Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice." Antimicrob Agents Chemother **39**(9): 2167-2168.
- Canetti, C. A., B. P. Leung, S. Culshaw, I. B. McInnes, F. Q. Cunha and F. Y. Liew (2003). "IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4." J Immunol **171**(2): 1009-1015.
- Carregaro, V., J. M. Ribeiro, J. G. Valenzuela, D. L. Souza-Júnior, D. L. Costa, C. J. F. Oliveira, L. A. Sacramento, M. S. L. Nascimento, C. M. Milanezi, F. Q. Cunha and J. S. Silva (2015). "Nucleosides Present on Phlebotomine Saliva Induce Immunossuppression and Promote the Infection Establishment." PLOS Neglected Tropical Diseases **9**(4): e0003600-e0003600.
- Carregaro, V., J. G. Valenzuela, T. M. Cunha, W. A. Verri, Jr., R. Grespan, G. Matsumura, J. M. Ribeiro, D. E. Elnaiem, J. S. Silva and F. Q. Cunha (2008). "Phlebotomine salivas inhibit

immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE2/IL-10 sequential pathway." J Leukoc Biol **84**(1): 104-114.

Cervia, J. S., H. Rosen and H. W. Murray (1993). "Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis." Infect Immun **61**(4): 1330-1333.

Chaix, J., M. S. Tessmer, K. Hoebe, N. Fuseri, B. Ryffel, M. Dalod, L. Alexopoulou, B. Beutler, L. Brossay, E. Vivier and T. Walzer (2008). "Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18." J Immunol **181**(3): 1627-1631.

Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar and M. Boelaert (2007). "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" Nat Rev Microbiol **5**(11): 873-882.

Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar and M. Boelaert (2007). "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" Nat.Rev.Microbiol. **5**(1740-1534 (Electronic)): 873-882.

Coma, G., R. Pena, J. Blanco, A. Rosell, F. E. Borrás, J. A. Este, B. Clotet, L. Ruiz, R. M. Parkhouse and M. Bofill (2006). "Treatment of monocytes with interleukin (IL)-12 plus IL-18 stimulates survival, differentiation and the production of CXC chemokine ligands (CXCL8, CXCL9 and CXCL10)." Clin Exp Immunol **145**(3): 535-544.

Cotton, J. A. (2017). "The Expanding World of Human Leishmaniasis." Trends Parasitol **33**(5): 341-344.

Dahlen, S. E., J. Bjork, P. Hedqvist, K. E. Arfors, S. Hammarstrom, J. A. Lindgren and B. Samuelsson (1981). "Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(6): 3887-3891.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-318.

Dey, R., A. B. Joshi, F. Oliveira, L. Pereira, A. B. Guimaraes-Costa, T. D. Serafim, W. de Castro, I. V. Coutinho-Abreu, P. Bhattacharya, S. Townsend, H. Aslan, A. Perkins, S. Karmakar, N. Ismail, M. Karetnick, C. Meneses, R. Duncan, H. L. Nakhasi, J. G. Valenzuela and S. Kamhawi (2018). "Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1beta." Cell Host Microbe **23**(1): 134-143 e136.

Dinarello, C. A. (2011). "A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation." Eur J Immunol **41**(5): 1203-1217.

Dinarello, C. A. and G. Fantuzzi (2003). "Interleukin-18 and host defense against infection." The Journal of infectious diseases **187** Suppl(Suppl 2): S370-S384.

Dinarello, C. A., D. Novick, S. Kim and G. Kaplanski (2013). "Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein." Frontiers in Immunology **4**(OCT): 1-11.

Dinarello, C. A., D. Novick, S. Kim and G. Kaplanski (2013). "Interleukin-18 and IL-18 binding protein." Front Immunol **4**: 289.

Elbim, C., C. Guichard, P. M. Dang, M. Fay, E. Pedruzzi, H. Demur, C. Pouzet, J. El Benna and M. A. Gougerot-Pocidalo (2005). "Interleukin-18 primes the oxidative burst of neutrophils in response to formyl-peptides: role of cytochrome b558 translocation and N-formyl peptide receptor endocytosis." Clin Diagn Lab Immunol **12**(3): 436-446.

Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." Science **272**(5258): 50-53.

Ford-Hutchinson, A. W. (1990). "Leukotriene B4 in inflammation." Crit Rev Immunol **10**(1): 1-12.

Garcia, V. E., K. Uyemura, P. A. Sieling, M. T. Ochoa, C. T. Morita, H. Okamura, M. Kurimoto, T. H. Rea and R. L. Modlin (1999). "IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection." J Immunol **162**(10): 6114-6121.

García, V. E., K. Uyemura, P. a. Sieling, M. T. Ochoa, C. T. Morita, H. Okamura, M. Kurimoto, T. H. Rea and R. L. Modlin (1999). "IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **162**(10): 6114-6121.

Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

Girard-Guyonvarc'h, C., J. Palomo, P. Martin, E. Rodriguez, S. Troccaz, G. Palmer and C. Gabay (2018). "Unopposed IL-18 signaling leads to severe TLR9-induced macrophage activation syndrome in mice." Blood **131**(13): 1430-1441.

Goncalves-de-Albuquerque, S. D. C., E. S. R. Pessoa, L. A. M. Trajano-Silva, T. C. de Goes, R. C. S. de Moraes, C. O. C. N. da, V. M. B. de Lorena and M. de Paiva-Cavalcanti (2017). "The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis." Front Immunol **8**: 1437.

Gorak, P. M., C. R. Engwerda and P. M. Kaye (1998). "Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection." Eur J Immunol **28**(2): 687-695.

Gu, Y., K. Kuida, H. Tsutsui, G. Ku, K. Hsiao, M. A. Fleming, N. Hayashi, K. Higashino, H. Okamura, K. Nakanishi, M. Kurimoto, T. Tanimoto, R. A. Flavell, V. Sato, M. W. Harding, D. J. Livingston and M. S. Su (1997). "Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin- 1β converting enzyme." Science **275**: 206-209.

Gurung, P. and T. D. Kanneganti (2015). "Innate immunity against *Leishmania* infections." Cell Microbiol **17**(9): 1286-1294.

Gurung, P., R. Karki, P. Vogel, M. Watanabe, M. Bix, M. Lamkanfi and T.-d. Kanneganti (2015). "An NLRP3 inflammasome – triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis." The Journal of Clinical Investigation **125**(3): 1329-1338.

Gurung, P., R. Karki, P. Vogel, M. Watanabe, M. Bix, M. Lamkanfi and T. D. Kanneganti (2015). "An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis." J Clin Invest **125**(3): 1329-1338.

Gutzmer, R., K. Langer, S. Mommert, M. Wittmann, A. Kapp and T. Werfel (2003). "Human dendritic cells express the IL-18R and are chemoattracted to IL-18." J Immunol **171**(12): 6363-6371.

Hammami, A., B. M. Abidin, K. M. Heinonen and S. Stager (2018). "HIF-1 α hampers dendritic cell function and Th1 generation during chronic visceral leishmaniasis." Sci Rep **8**(1): 3500.

Han, J. H., C. H. Suh, J. Y. Jung, M. H. Ahn, M. H. Han, J. E. Kwon, H. Yim and H. A. Kim (2017). "Elevated circulating levels of the interferon-gamma-induced chemokines are associated with disease activity and cutaneous manifestations in adult-onset Still's disease." Sci Rep **7**: 46652.

Handler MZ, P. P., Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. (2015). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives." J Am Acad Dermatol **73**(6).

Hirata, J., J. Kotani, M. Aoyama, S. Kashiwamura, H. Ueda, Y. Kuroda, M. Usami, H. Okamura and S. Marukawa (2008). "A role for IL-18 in human neutrophil apoptosis." Shock **30**(6): 628-633.

Hoshino, T., R. H. Witrout and H. A. Young (1999). "IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response." J Immunol **162**(9): 5070-5077.

Iddawela, D., S. M. P. Vithana, D. Atapattu and L. Wijekoon (2018). "Clinical and epidemiological characteristics of cutaneous leishmaniasis in Sri Lanka." BMC Infect Dis **18**(1): 108.

Kamhawi, S. (2006). "Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?" *Trends Parasitol* **22**(9): 439-445.

Kawakami, K., M. H. Qureshi, T. Zhang, H. Okamura, M. Kurimoto and A. Saito (1997). "IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN-g production." *J Immunol*. **159**(11): 5528-5534.

Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." *Nat Rev Microbiol* **9**(8): 604-615.

Ketelut-Carneiro, N., G. K. Silva, F. A. Rocha, C. M. Milanezi, F. F. Cavalcanti-Neto, D. S. Zamboni and J. S. Silva (2015). "IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection." *J Immunol* **194**(9): 4507-4517.

Keyel, P. A. (2014). "How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1." *Cytokine* **69**(1): 136-145.

Kim, D. S., J. H. Han and H. J. Kwon (2003). "NF-kappaB and c-Jun-dependent regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression in response to lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells." *Mol Immunol* **40**(9): 633-643.

Kimura, K., S. Sekiguchi, S. Hayashi, Y. Hayashi, T. Hishima, M. Nagaki and M. Kohara (2011). "Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury." *J Leukoc Biol* **89**(3): 433-442.

Komai-Koma, M., J. A. Gracie, X. Q. Wei, D. Xu, N. Thomson, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2003). "Chemoattraction of human T cells by IL-18." *J Immunol* **170**(2): 1084-1090.

Körner Donhauser, H., M. Röllinghoff, C. Bogdan, P. Wilhelm, U. Ritter, S. Labbow, N. Donhauser and H. Körner (2001). "C57BL/6 Mice Lacking TNF Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant C57BL/6 Mice Lacking TNF 1." *J Immunol References The Journal of Immunology at Cleveland Health Sciences Library on* **166**: 4012-4019.

Kumar, R. and S. Nysten (2012). "Immunobiology of visceral leishmaniasis." *Front Immunol* **3**: 251.

Lalor, S. J., L. S. Dungan, C. E. Sutton, S. A. Basdeo, J. M. Fletcher and K. H. Mills (2011). "Caspase-1-processed cytokines IL-1beta and IL-18 promote IL-17 production by gammadelta and CD4 T cells that mediate autoimmunity." *J Immunol* **186**(10): 5738-5748.

Laskay, T., G. van Zandbergen and W. Solbach (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?" *Trends Microbiol* **11**(5): 210-214.

Lee, J. K., S. H. Kim, E. C. Lewis, T. Azam, L. L. Reznikov and C. A. Dinarello (2004). "Differences in signaling pathways by IL-1beta and IL-18." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8815-8820.

Leon, B., G. Martinez del Hoyo, V. Parrillas, H. H. Vargas, P. Sanchez-Mateos, N. Longo, M. Lopez-Bravo and C. Ardavin (2004). "Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells." *Blood* **103**(7): 2668-2676.

Leonard, E. J. and T. Yoshimura (1990). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)." *Immunol Today* **11**(3): 97-101.

Leung, B. P., S. Culshaw, J. A. Gracie, D. Hunter, C. A. Canetti, C. Campbell, F. Cunha, F. Y. Liew and I. B. McInnes (2001). "A role for IL-18 in neutrophil activation." *J Immunol* **167**(5): 2879-2886.

Liese, J., U. Schleicher and C. Bogdan (2007). "TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis." *Eur J Immunol* **37**(12): 3424-3434.

Liu, D. and J. E. Uzonna (2012). "The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response." *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 83.

Locksley, R. M., F. P. Heinzl, J. E. Fankhauser, C. S. Nelson and M. D. Sadick (1988). "Cutaneous host defense in leishmaniasis: Interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote." Infection and Immunity **56**(2): 336-342.

Loeuillet, C., A. L. Banuls and M. Hide (2016). "Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations." Parasit Vectors **9**: 144.

Manthey, H. D., C. Cochain, S. Barnsteiner, E. Karshovska, J. Pelisek, M. Koch, S. M. Chaudhari, M. Busch, H. H. Eckstein, C. Weber, R. R. Koenen and A. Zernecke (2013). "CCR6 selectively promotes monocyte mediated inflammation and atherogenesis in mice." Thromb Haemost **110**(6): 1267-1277.

Matsumoto, S., K. Tsuji-Takayama, Y. Aizawa, K. Koide, M. Takeuchi, T. Ohta and M. Kurimoto (1997). "Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells." Biochemical and biophysical research communications **234**(2): 454-457.

Mayer-Barber, K. D. and B. Yan (2017). "Clash of the Cytokine Titans: counter-regulation of interleukin-1 and type I interferon-mediated inflammatory responses." Cell Mol Immunol **14**(1): 22-35.

McCall, L. I., W. W. Zhang and G. Matlashewski (2013). "Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease." PLoS Pathog **9**(1): e1003053.

McFarlane, E., C. Perez, M. Charmoy, C. Allenbach, K. C. Carter, J. Alexander and F. Tacchini-Cottier (2008). "Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with Leishmania donovani." Infect Immun **76**(2): 532-541.

Mencacci, A., A. Bacci, E. Cenci, C. Montagnoli, S. Fiorucci, A. Casagrande, R. A. Flavell, F. Bistoni and L. Romani (2000). "Interleukin 18 restores defective Th1 immunity to Candida albicans in caspase 1-deficient mice." Infect Immun **68**(9): 5126-5131.

Messlinger, H., H. Sebald, L. Heger, D. Dudziak, C. Bogdan and U. Schleicher (2018). "Monocyte-Derived Signals Activate Human Natural Killer Cells in Response to Leishmania Parasites." Front Immunol **9**: 24.

Monteforte, G. M., K. Takeda, M. Rodriguez-Sosa, S. Akira, J. R. David and A. R. Satoskar (2000). "Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous Leishmania major infection." J Immunol **164**(11): 5890-5893.

Morel, J. C., C. C. Park, P. Kumar and A. E. Koch (2001). "Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NFkappaB activation." Lab Invest **81**(10): 1371-1383.

Mullen, A. B., C. E. Lawrence, E. McFarlane, X. Q. Wei and K. C. Carter (2006). "Endogenous interleukin-18 is involved in immunity to Leishmania donovani but its absence does not adversely influence the therapeutic activity of sodium stibogluconate." Immunology **119**(3): 348-354.

Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies and N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." Lancet **366**(9496): 1561-1577.

Murray, H. W., A. D. Luster, H. Zheng and X. Ma (2017). "Gamma Interferon-Regulated Chemokines in Leishmania donovani Infection in the Liver." Infect Immun **85**(1).

Murray, H. W., C. W. Tsai, J. Liu and X. Ma (2006). "Responses to Leishmania donovani in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18." Infect Immun **74**(7): 4370-4374.

Nacy, C. A., A. H. Fortier, M. G. Pappas and R. R. Henry (1983). "Susceptibility of inbred mice to Leishmania tropica infection: correlation of susceptibility with in vitro defective macrophage microbicidal activities." Cell Immunol **77**(2): 298-307.

Nakahira, M., H. J. Ahn, W. R. Park, P. Gao, M. Tomura, C. S. Park, T. Hamaoka, T. Ohta, M. Kurimoto and H. Fujiwara (2002). "Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-

regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1." J Immunol **168**(3): 1146-1153.

Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata and T. Tamura (1989). "Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production." Infection and Immunity **57**(2): 590-595.

Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui and H. Okamura (2001). "Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses." Annu Rev Immunol **19**: 423-474.

Nascimento, M. S., V. Carregaro, D. S. Lima-Junior, D. L. Costa, B. Ryffel, M. S. Duthie, A. de Jesus, R. P. de Almeida and J. S. da Silva (2015). "Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against Leishmania infantum infection." J Infect Dis **211**(6): 1015-1026.

Nascimento, M. S. L., V. Carregaro, D. S. Lima-Júnior, D. L. Costa, B. Ryffel, M. S. Duthie, A. De Jesus, R. P. De Almeida and J. S. Da Silva (2015). "Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against leishmania infantum infection." Journal of Infectious Diseases **211**(6): 1015-1026.

Neighbors, M., X. Xu, F. J. Barrat, S. R. Ruuls, T. Churakova, R. Debets, J. F. Bazan, R. A. Kastelein, J. S. Abrams and A. O'Garra (2001). "A critical role for interleukin 18 in primary and memory effector responses to Listeria monocytogenes that extends beyond its effects on Interferon gamma production." J Exp Med **194**(3): 343-354.

Nold-Petry, C. A., C. Y. Lo, I. Rudloff, K. D. Elgass, S. Li, M. P. Gantier, A. S. Lotz-Havla, S. W. Gersting, S. X. Cho, J. C. Lao, A. M. Ellisdon, B. Rotter, T. Azam, N. E. Mangan, F. J. Rossello, J. C. Whisstock, P. Bufler, C. Garlanda, A. Mantovani, C. A. Dinarello and M. F. Nold (2015). "IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction." Nat Immunol **16**(4): 354-365.

Novick, D., S. Kim, G. Kaplanski and C. A. Dinarello (2013). "Interleukin-18, more than a Th1 cytokine." Seminars in Immunology **25**(6): 439-448.

Novick, D., S. H. Kim, G. Fantuzzi, L. L. Reznikov, C. A. Dinarello and M. Rubinstein (1999). "Interleukin-18 binding protein: A novel modulator of the Th1 cytokine response." Immunity **10**(1): 127-136.

Nylen, S. and D. Sacks (2007). "Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis." Trends Immunol **28**(9): 378-384.

O'Donnell, H., O. H. Pham, L. X. Li, S. M. Atif, S. J. Lee, M. M. Ravesloot, J. L. Stolfi, S. P. Nuccio, P. Broz, D. M. Monack, A. J. Baumler and S. J. McSorley (2014). "Toll-like receptor and inflammasome signals converge to amplify the innate bactericidal capacity of T helper 1 cells." Immunity **40**(2): 213-224.

Olekhovitch, R., B. Ryffel, A. J. Muller and P. Bousso (2014). "Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during Leishmania infection." J Clin Invest **124**(4): 1711-1722.

Omoto, Y., K. Yamanaka, K. Tokime, S. Kitano, M. Kakeda, T. Akeda, I. Kurokawa, E. C. Gabazza, H. Tsutsui, N. Katayama, K. Yamanishi, K. Nakanishi and H. Mizutani (2010). "Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme." J Dermatol Sci **59**(2): 129-135.

Pietras, E. M., L. S. Miller, C. T. Johnson, R. M. O'Connell, P. W. Dempsey and G. Cheng (2011). "A MyD88-dependent IFN γ R-CCR2 signaling circuit is required for mobilization of monocytes and host defense against systemic bacterial challenge." Cell Res **21**(7): 1068-1079.

Ramos, C. D., C. Canetti, J. T. Souto, J. S. Silva, C. M. Hogaboam, S. H. Ferreira and F. Q. Cunha (2005). "MIP-1 α [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF- α and LTB $_4$." J Leukoc Biol **78**(1): 167-177.

Ramos, C. D., K. S. Fernandes, C. Canetti, M. M. Teixeira, J. S. Silva and F. Q. Cunha (2006). "Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB(4)." *Eur J Immunol* **36**(8): 2025-2034.

Reithinger, R., J. C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander and S. Brooker (2007). "Cutaneous leishmaniasis." *Lancet Infect Dis* **7**(9): 581-596.

Robinson, D., K. Shibuya, A. Mui, F. Zonin, E. Murphy, T. Sana, S. B. Hartley, S. Menon, R. Kastelein, F. Bazan and A. O'Garra (1997). "IGIF Does Not Drive Th1 Development but Synergizes with IL-12 for Interferon- γ Production and Activates IRAK afile:///E:/IMUNO/Projeto_mestrado/ref_conferida/il-18_e_il-12/il-12_singergiza_com_il-18_ou_il-1b_para_produzir_ifn_y.pdf file:///E:/IMUNO/Projet." *Immunity* **7**(4): 571-581.

Rodrigues, V., A. Cordeiro-da-Silva, M. Laforge, R. Silvestre and J. Estaquier (2016). "Regulation of immunity during visceral Leishmania infection." *Parasit Vectors* **9**: 118.

Rodrigues, V., A. Cordeiro-da-Silva, M. Laforge, R. Silvestre and J. Estaquier (2016). "Regulation of immunity during visceral Leishmania infection." *Parasites & Vectors* **9**(1): 118-118.

Rousseau, D., S. Demartino, B. Ferrua, J. F. Michiels, F. Anjuere, K. Fragaki, Y. Le Fichoux and J. Kubar (2001). "In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in Leishmania infantum infection." *BMC Microbiol* **1**: 17.

Ruth, J. H., C. C. Park, M. A. Amin, C. Lesch, H. Marotte, S. Shahrara and A. E. Koch (2010). "Interleukin-18 as an in vivo mediator of monocyte recruitment in rodent models of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **12**(3): R118.

Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice." *Nat Rev Immunol* **2**(11): 845-858.

Sacramento, L., S. C. Trevelin, M. S. Nascimento, D. S. Lima-Junior, D. L. Costa, R. P. Almeida, F. Q. Cunha, J. S. Silva and V. Carregaro (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.

Scapini, P., L. Crepaldi, C. Pinardi, F. Calzetti and M. A. Cassatella (2002). "CCL20/macrophage inflammatory protein-3alpha production in LPS-stimulated neutrophils is enhanced by the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and IFN-gamma through independent mechanisms." *Eur J Immunol* **32**(12): 3515-3524.

Scharton, T. M. and P. Scott (1993). "Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice." *The Journal of Experimental Medicine* **178**(2): 567-577.

Schneider, B. E., D. Korbel, K. Hagens, M. Koch, B. Raupach, J. Enders, S. H. Kaufmann, H. W. Mittrucker and U. E. Schaible (2010). "A role for IL-18 in protective immunity against Mycobacterium tuberculosis." *Eur J Immunol* **40**(2): 396-405.

Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukoc Biol* **75**(2): 163-189.

Scott, P. (1998). "Differentiation, regulation, and death of T helper cell subsets during infection with Leishmania major." *Immunol Res* **17**(1-2): 229-238.

Singh, O. P. and S. Sundar (2015). "Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era." *J Parasitol Res* **2015**: 239469.

Smeltz, R. B. (2007). "Profound enhancement of the IL-12/IL-18 pathway of IFN-gamma secretion in human CD8+ memory T cell subsets via IL-15." *J Immunol* **178**(8): 4786-4792.

Sousa, L. M., M. B. Carneiro, L. M. Dos Santos, C. C. Natale, M. E. Resende, D. M. Mosser and L. Q. Vieira (2015). "IL-18 contributes to susceptibility to Leishmania amazonensis infection by macrophage-independent mechanisms." *Cytokine* **74**(2): 327-330.

Stager, S., A. Maroof, S. Zubairi, S. L. Sanos, M. Kopf and P. M. Kaye (2006). "Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells." Eur J Immunol **36**(7): 1764-1771.

Stanley, A. C. and C. R. Engwerda (2007). "Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis." Immunol Cell Biol **85**(2): 138-147.

Stoll, S., H. Jonuleit, E. Schmitt, G. Müller, M. Kurimoto, J. Knop and A. H. Enk (1998). "Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC- derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development." (DC): 3231-3239.

Stoll, S., G. Müller, M. Kurimoto, J. Saloga, T. Tanimoto, H. Yamauchi, H. Okamura, J. Knop and A. H. Enk (1997). "Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **159**(1): 298-302.

Stuyt, R. J., M. G. Netea, T. B. Geijtenbeek, B. J. Kullberg, C. A. Dinarello and J. W. van der Meer (2003). "Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes." Immunology **110**(3): 329-334.

Stuyt, R. J., M. G. Netea, S. H. Kim, D. Novick, M. Rubinstein, B. J. Kullberg, J. W. Van der Meer and C. A. Dinarello (2001). "Differential roles of interleukin-18 (IL-18) and IL12 for induction of gamma interferon by staphylococcal cell wall components and superantigens." Infect Immun **69**(8): 5025-5030.

Sugawara, I., H. Yamada, H. Kaneko, S. Mizuno, K. Takeda and S. Akira (1999). "Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice." Infection and immunity **67**(5): 2585-2589.

Thalhofer, C. J., Y. Chen, B. Sudan, L. Love-Homan and M. E. Wilson (2011). "Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi." Infect Immun **79**(1): 108-117.

Titus, R. G., M. Marchand, T. Boon and J. A. Louis (1985). "A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice." Parasite Immunol **7**(5): 545-555.

Tominaga, K., T. Yoshimoto, K. Torigoe, M. Kurimoto, K. Matsui, T. Hada, H. Okamura and K. Nakanishi (2000). "IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells." International immunology **12**(2): 151-160.

Torigoe, K., S. Ushio, T. Okura, S. Kobayashi, M. Taniai, T. Kunikata, T. Murakami, O. Sanou, H. Kojima, M. Fujii, T. Ohta, M. Ikeda, H. Ikegami and M. Kurimoto (1997). "Purification and Characterization of the Human Interleukin-18 Receptor *." **272**(41): 25737-25742.

Trinchieri, G. (1993). "Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells." Immunol Today **14**(7): 335-338.

Tsagozis, P., E. Karagouni and E. Dotsika (2003). "CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis." Parasite Immunol **25**(11-12): 569-579.

Tsagozis, P., E. Karagouni and E. Dotsika (2005). "Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis." Parasitol Int **54**(2): 139-146.

Tsutsumi, N., T. Kimura, K. Arita, M. Ariyoshi, H. Ohnishi, T. Yamamoto, X. Zuo, K. Maenaka, E. Y. Park, N. Kondo, M. Shirakawa, H. Tochio and Z. Kato (2014). "The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18." Nature communications **5**: 5340-5340.

Ushio, S., M. Namba, O. Takanori, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura and M. Kurimoto (1996). "Cloning of the cDNA for human IFN-g-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein." J.Immunol. **156**(4274).

van de Veerdonk, F. L., M. G. Netea, C. A. Dinarello and L. A. Joosten (2011). "Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection." Trends Immunol **32**(3): 110-116.

Verri, W. A., Jr., T. M. Cunha, S. H. Ferreira, X. Wei, B. P. Leung, A. Fraser, I. B. McInnes, F. Y. Liew and F. Q. Cunha (2007). "IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production." *Eur J Immunol* **37**(12): 3373-3380.

Wald, D., M. Commane, G. R. Stark and X. Li (2001). "IRAK and TAK1 are required for IL-18-mediated signaling." *European Journal of Immunology* **31**(12): 3747-3754.

Walker, D. M., S. Oghumu, G. Gupta, B. S. McGwire, M. E. Drew and A. R. Satoskar (2014). "Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites." *Cell Mol Life Sci* **71**(7): 1245-1263.

Wiersinga, W. J., C. W. Wieland, G. J. van der Windt, A. de Boer, S. Florquin, A. Dondorp, N. P. Day, S. J. Peacock and T. van der Poll (2007). "Endogenous interleukin-18 improves the early antimicrobial host response in severe melioidosis." *Infect Immun* **75**(8): 3739-3746.

Wild, J. S. and S. Sur (2000). "Interleukin-18 and allergic asthma." *Isr Med Assoc J* **2 Suppl**: 16-18.

Wilson, M. E., D. J. Innes, A. D. Sousa and R. D. Pearson (1987). "Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters." *J Parasitol* **73**(1): 55-63.

Wyman, T. H., C. A. Dinarello, A. Banerjee, F. Gamboni-Robertson, A. A. Hiester, K. M. England, M. Kelher and C. C. Silliman (2002). "Physiological levels of interleukin-18 stimulate multiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation." *J Leukoc Biol* **72**(2): 401-409.

Xiang, Y. and B. Moss (2001). "Correspondence of the functional epitopes of poxvirus and human interleukin-18-binding proteins." *Journal of virology* **75**(20): 9947-9954.

Yoshimoto, T., K. Takeda, T. Tanaka, K. Ohkusu, S. Kashiwamura, H. Okamura, S. Akira and K. Nakanishi (1998). "IL-12 Up-Regulates IL-18 Receptor Expression on T Cells, Th1 Cells, and B Cells: Synergism with IL-18 for IFN- γ Production." *The Journal of Immunology* **161**(7): 3400-3407.

Zhu, Q. and T.-D. Kanneganti (2017). "Mechanisms Control Proinflammatory Cutting Edge: Distinct Regulatory Cutting Edge: Distinct Regulatory Mechanisms Control Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1b." *DCSupplemental The Journal of Immunology* **198**: 4210-4215.