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

LEONARDO LIMA DOS SANTOS

O sensor intracelular AIM2 participa da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania amazonensis*

Ribeirão Preto
2017

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

LEONARDO LIMA DOS SANTOS

O sensor intracelular AIM2 participa da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania amazonensis*

LEONARDO LIMA DOS SANTOS

O sensor intracelular AIM2 participa da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania amazonensis*

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

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni.

Ribeirão Preto
2017

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

Lima-Santos, Leonardo

O sensor intracelular AIM2 participa da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania amazonensis* / Leonardo Lima dos Santos; Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni – Ribeirão Preto - 2017-06-13

89f

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2017

1. Leishmaniose 2. Inflamassoma 3. AIM2 4. Imunidade Inata 5. Imunidade Adaptativa

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANTOS, Leonardo Lima

Título: O sensor intracelular AIM2 participa da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao departamento de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: __ / __ / __

Banca Examinadora

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni **Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. José Carlos Alves Filho **Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz **Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Profa. Dra. Valéria Borges **Instituição: FIOCRUZ, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

À minha família pela inesgotável
fonte de incentivo, motivação e carinho.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosilene, meu pai, Miguel, minha avó, Magali e meu irmão Luan, pois são aqueles que, mesmo à distância, são uma fonte de carinho, conforto e incentivo inesgotável. Esta é uma família, que seja qual for a sua decisão te incentiva a crescer, e extrapola qualquer limite de amor. Para minha mãe, eu tenho um agradecimento especial, pois, ao me dar uma bela educação, disciplina e incentivo, desde pequeno, me permitiu alcançar os sonhos que realizei até então;

À Isadora Cortez que desde o ano passado é o grande amor da minha vida e é a mulher que eu admiro imensamente pelo seu humor, genialidade, poder e beleza; e que tenho o grande prazer de compartilhar momentos incríveis, sendo ensinado diariamente sobre a arte do companheiro e do sorriso;

Ao meu orientador Prof. Dr. Dario Simões Zamboni que é um excelente exemplo de valorização da ciência de qualidade e pelo seu grande incentivo nos seus orientados;

A Caju e Djalma, pela constante presença em discussões e ensinamentos, sem os quais este trabalho não seria possível;

Aos meus colegas de trabalho e amigos do laboratório: Leitim (Warrisson), Alexandre, Dani, Fêzinha, Luíza, Augusto, Robson, Danilo, Cati, Nati, Renan, Linkin (Lincoln), Juliana Magro, Renata, Letícia, Victória, Yasmin, Vitor e Carolina.

À técnica de nosso laboratório Maira, à Denise da citometria, ao Rubilan, Edir, e Domingos do biotério e a todos outros funcionários da USP, que são importantíssimos para o desenvolvimento das pesquisas, em especial à secretária do programa Ana, pela constante disponibilidade e atenção para a resolução das burocracias da pós-graduação.

À FAPESP, CRID/FAPESP, INCTV/CNPq, PEW and CAPES e ao programa de Imunologia Básica e Aplicada pelo apoio financeiro e à Universidade de São Paulo e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por proporcionar uma formação acadêmica de qualidade;

Aos meus colegas de pós-graduação e do prédio central da FMRP, Bruno, Piroski, Douglas, Rafa, Alice, Nicole, Guilherme, Eduardo, Luna e Ana Salina, por dividirem esses dois belos anos de churrascos, sushis, academia e Silvão.

RESUMO

LIMA-SANTOS, L. **O sensor intracelular AIM2 participa da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania amazonensis***. 2017, 89f.

Dissertação (Mestrado).— Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Leishmania amazonensis é um parasito endêmico no Brasil, que ao infectar humanos, pode causar a leishmaniose cutânea. Cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas com parasitos do gênero *Leishmania* em 98 países, e anualmente, 350 milhões de indivíduos estão em risco de contrair esta doença. Enquanto o papel da imunidade adaptativa já foi extensivamente investigado, em modelos de infecção com *Leishmania spp.*, os mecanismos de alguns receptores da imunidade inata, e principalmente dos citosólicos, como é o caso do AIM2, permanecem obscuros. Recentemente, o nosso grupo descreveu a importância do inflamassoma de NLRP3 no controle da infecção por *L. amazonensis*, o qual é mediado pela produção de óxido nítrico dependente da sinalização de IL-1R. Neste trabalho, foi demonstrado que a deficiência para IL-1R confere uma maior susceptibilidade a este parasito do que a deficiência para NLRP3. Sugerindo que outros inflamassomas, que operam via IL-1R, possam estar envolvidos na resposta contra este patógeno. Dentre estes, o AIM2 destaca-se como sendo um receptor de DNA citosólico que mediante a sua ativação promove a secreção de citocinas pro-inflamatórias e piroptose. Neste contexto, nós demonstramos que o AIM2 promove o controle da infecção *in vitro* por *L. amazonensis* em macrófagos, e que estas células requerem este sensor de DNA para a secreção de IL-1 α , expressão da enzima NOS2 e produção de óxido nítrico. Adicionalmente, também observamos que AIM2 promove resistência à infecção por *L. amazonensis in vivo*, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta Th1. Por fim, também demonstramos que o inflamassoma de AIM2 atua na produção de IL-1 β e IL-1 α , por células dendríticas, assim como na expressão de CD86 e CD40 e na secreção de IL-12 por estas células. Desta forma, foi demonstrado neste trabalho que o AIM2, ao ativar células da imunidade inata e adaptativa, promove o controle direto ou indireto da infecção por *L. amazonensis*.

Palavras-chaves: ***Leishmania amazonensis***, AIM2, inflamassoma

ABSTRACT

LIMA-SANTOS, L. **The intracellular sensor AIM2 participates of the innate and adaptive immune responses during the infection with *Leishmania amazonensis*.** 2017, 89f. Dissertação (Mestrado).— Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Leishmania amazonensis is an endemic parasite in Brazil that can cause the cutaneous leishmaniasis in humans. Annually, around 12 million people are infected with *Leishmania spp.* parasites, in 98 countries. In addition, 350 million of individuals are on risk to develop this disease. While the role of the adaptive immune response was already extensively evaluated, on models of infection with *Leishmania spp.*, the mechanisms of some innate immune receptors, and mainly the cytosolic ones, such as AIM2, remain unclear. Recently, our group described the importance of the NLRP3 inflammasome to the control of *L. amazonensis* mediated by NO, which is dependent of the IL-1R signaling. In this work, it was also reported that the *Il-1r* deficiency displayed a higher susceptibility to *L. amazonensis* infection in comparison to *Nlrp3*-deficient mice. Suggesting that other inflammasomes, which may operate through IL-1R, might be involved in the response to this pathogen. Among these, the AIM2 highlights as a cytosolic DNA sensor, which, after its activation, promotes the secretion of pro-inflammatory cytokines and pyroptosis. On this context, we demonstrated that AIM2 promotes the *in vitro* control of *L. amazonensis* in macrophages, and that these cells require this DNA sensor for the IL-1 α secretion, NOS2 expression and NO production. In addition, we also observed that AIM2 promotes the *in vivo* resistance to *L. amazonensis* infection, contributing for the development of a Th1 response. Finally, we also demonstrated that AIM2 acts on the production of IL-1 β and IL-1 α , by dendritic cells, as well as on the CD86 and CD40 expression and IL-12 secretion by these cells. Therefore, in this work, we showed that the AIM2, leading to the activation of innate and adaptive immune cells, promotes the direct or indirect control of *L. amazonensis* infection.

Keywords: ***Leishmania amazonensis*, AIM2, inflamassome**

Lista de Figuras

Figura 1. AIM2 é importante para a secreção de IL-1 α mas não de IL-1 β , independente de caspase-1, em BMDMs infectados com <i>L. amazonensis</i>	46
Figura 2. AIM2 contribui para a produção de óxido nítrico mediante regulação da expressão de NOS2.....	48
Figura 3. A resistência à infecção <i>in vitro</i> por <i>L. amazonensis</i> depende de AIM2.....	49
Figura 4. AIM2 atua para o controle <i>in vivo</i> da infecção por <i>L. amazonensis</i>	50
Figura 5. AIM2 modula a frequência de linfócitos no linfonodo mas não no sítio de infecção.....	51
Figura 6. AIM2 é importante para a resposta Th1 durante a infecção por <i>L. amazonensis</i>	53
Figura 7. AIM2 contribui para a produção de IFN- γ e de IL-12 durante a infecção <i>in vivo</i> por <i>L. amazonensis</i>	55
Figura 8. AIM2 tem papel na expressão de co-receptores e secreção de citocinas pró- inflamatórias em BMDCs durante a infecção por <i>L. amazonensis</i>	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Leishmaniose.....	15
1.2 Resposta Imune.....	18
1.2.1 Neutrófilos.....	19
1.2.2 Monócitos Inflamatórios e Células Dendríticas.....	20
1.2.3 Mecanismos de controle da imunidade inata.....	21
1.2.4 Resposta imune adaptativa.....	23
1.2.5 Causas da susceptibilidade a infecção.....	25
1.3 Receptores da Imunidade Inata.....	26
1.3.1 Receptores Toll-like.....	27
1.3.2 Receptores NOD-like.....	28
1.3.3 Inflamassomas.....	29
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Animais de experimentação.....	37
3.2 Parasitos e infecção experimental.....	37
3.3- Avaliação das lesões e quantificação da carga parasitária na orelha.....	38
3.4- Diferenciação de macrófagos e células dendríticas a partir de células da medula óssea.....	38
3.5- Infecção de macrófagos e células dendríticas <i>in vitro</i>	39
3.6- Marcação da caspase-1 ativa.....	39
3.7- Dosagem de citocinas.....	40

3.8- Dosagem de nitrito e óxido nítrico.....	40
3.9- Detecção da expressão de NOS2 por Western Blotting.....	41
3.10- Cultivo de células <i>ex vivo</i>	41
3.11- Detecção intracelular de citocinas.....	42
3.12- Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	45
4.1 A ativação do inflamassoma de AIM2 por <i>L. amazonensis</i> é importante para a secreção de IL-1 α mas não de IL-1 β em macrófagos derivado de medula.....	45
4.2 A ativação do inflamassoma de AIM2 por <i>L. amazonensis</i> contribui para a produção de óxido nítrico através da regulação da expressão da enzima NOS2.....	47
4.3 AIM2 confere resistência à infecção <i>in vitro</i> por <i>L. amazonensis</i> em macrófagos murinos derivados de medula.....	48
4.4 AIM2 também contribui para a resistência à infecção <i>in vivo</i> por <i>L. amazonensis</i>	49
4.5 AIM2 está envolvido com a resposta Th1 durante a infecção <i>in vivo</i> por <i>L. amazonensis</i>	51
4.6 AIM2 contribui para a expressão de co-receptores e para a secreção de citocinas pro-inflamatórias em células dendríticas infectadas <i>in vitro</i> com <i>L. amazonensis</i>	56
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Leishmaniose

Dentre as várias doenças tropicais negligenciadas, a Leishmaniose é considerada uma das mais importantes, sendo a segunda maior causa de morte por doenças parasíticas no mundo. Anualmente, 350 milhões de pessoas correm o risco de desenvolver uma das diversas formas desta doença em 98 países, e 12 milhões destas encontram-se infectadas (Alvar et al., 2012). Desta forma, devido a sua elevada incidência e gravidade, assim como, pela presença de lesões que incapacitam, desfiguram e são até mesmo fatais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a Leishmaniose como uma das seis endemias mais importantes no mundo (Alvar et al., 2012).

Esta doença é caracterizada pela infecção por várias espécies de parasitos do gênero *Leishmania spp.* e a infecção ocorre durante o ciclo de vida destes organismos, os quais transitam entre um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor. A transmissão é realizada por flebotomíneos fêmeas, presentes no velho mundo (*Phlebotomus*) e no novo mundo (*Lutysomyia*) (Handler et al., 2015; Alvar et al., 2012).

O gênero *Leishmania spp.* engloba protozoários unicelulares da ordem Kinetoplastida e da família dos Tripanossomatídeos. Durante o seu ciclo de vida, estes parasitos alternam entre as formas promastigota e amastigota. As promastigotas são formas móveis e flageladas deste parasito, que apresentam vida- livre e são encontradas no trato digestório do inseto (Ambit et al., 2011). Além disso, apresentam uma morfologia piriforme e uma elevada taxa de replicação. Por outro lado, as formas amastigotas não-flageladas, são organismos intracelulares obrigatórios encontrados principalmente nos vacúolos de fagócitos, sendo encontrados em diversos tecidos do

hospedeiro vertebrado (Ambit et al., 2011; Handler et al., 2015).

O ciclo de vida de *Leishmania spp.* inicia-se quando o flebotômíneo, durante o repasto sanguíneo, inocula as formas promastigotas metacíclicas na derme. Estas são morfológicamente mais afiladas, com longo flagelo, baixa capacidade proliferativa e altamente infectivas (Kaye and Scott, 2011). Diversos fagócitos, tais como macrófagos residentes na pele e os neutrófilos, que são rapidamente recrutados, se tornam infectados ao fagocitar os parasitos inoculadas nas primeiras horas de infecção (Scott and Novais, 2016).

Uma vez que o parasito é fagocitado, os mecanismos de tráfego endossomal são cruciais para determinar o seu microambiente. Por exemplo, foi demonstrado que, ao contrário do que é observado durante a infecção por espécies como *L. major*, os fagossomos contendo *L. amazonensis* e *L. mexicana* rapidamente se fundem a vesículas lisossômicas e portanto, o vacúolo parasitóforo destas espécies é caracterizado por um microambiente mais ácido (Real and Mortara, 2012). É importante ressaltar que durante todo o seu ciclo de vida, e inclusive no interior deste vacúolo, estes parasitos secretam exossomos que se fundem as membranas dos fagolisossomos ou as membranas plasmáticas das células do hospedeiro (Atayde et al., 2015). Estas vesículas contem a maioria dos fatores de virulência de *Leishmania spp.* e são o principal método de comunicação com o citosol da célula hospedeira, sendo portanto, cruciais para a subversão de mecanismos de controle do hospedeiro e consequentemente para a sobrevivência do patógeno (Atayde et al., 2016; Silverman et al., 2010). Dentro dos vacúolos dos macrófagos, os parasitos rapidamente se transformam na forma amastigota, que devido a alta replicação podem romper as células infectadas e iniciam a reincidência de infecção (Kaye and Scott, 2011).

Uma vez estabelecido o sítio de infecção, os parasitos, dependendo da espécie ou do quadro genético do hospedeiro, podem estabelecer lesões com diversas propriedades, e transformam o hospedeiro em um reservatório de infecção (Kaye and Scott, 2011). Quando um outro flebotomíneo, insere novamente seu aparelho bucal na derme, durante o repasto sanguíneo, fagócitos dérmicos infectados com a forma amastigota de *Leishmania spp.* são coletados pelo inseto. Durante o trajeto do trato digestório para a linfa, as amastigotas se diferenciam para a forma promastigota procíclica (McConville et al., 1992). A qual devido a elevada taxa de replicação, saturam os níveis de nutrientes e induzem a transição para a forma metacíclica não-replicante e altamente infectiva que se aloja na região bucal do inseto na prontidão de uma próxima inoculação (Sacks, 2001).

Em geral, a leishmaniose é caracterizada pela presença de quadros patológicos em indivíduos infectados com parasitos do gênero *Leishmania spp.*, porém devido a elevada variabilidade de sintomas e quadros clínicos, esta doença foi sistematicamente dividida em dois principais grupos: a leishmaniose cutânea e a visceral. A leishmaniose cutânea é sub-dividida em três formas principais: 1) uma forma benigna, com lesões ulcerativas, porém de cura espontânea, denominada **Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)**; 2) a forma difusa, com lesões não ulceradas em formato de pápulas, repletas de parasitos resistentes aos métodos terapêuticos convencionais, denominada **Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)**; 3) e a forma mais grave da doença denominada mucocutânea, a qual se dissemina e lesiona as regiões das mucosas orais e nasais (Carvalho et al., 1994). Por outro lado, a forma visceral da doença é caracterizada pela infecção e posterior acometimento de diversos órgãos tais como o fígado, baço e inclusive a medula óssea (Marsden et al., 1998; Desjeux, 2004). A forma visceral corresponde ao tipo mais grave de leishmaniose, podendo ser

fatal quando não tratada.

Diversos fatores determinam as respostas do hospedeiro, os sintomas e quadros resultantes de uma infecção estabelecida por parasitos do gênero *Leishmania spp.* A saliva do inseto, por exemplo, é muito importante para criar um microambiente favorável para a infecção dérmica durante a inoculação. Já foi demonstrado que a saliva de flebotomíneos apresenta substâncias vasodilatadoras, anti-coagulantes, anti-inflamatórias e imunoreguladoras (Titus and Ribeiro, 1988; Ribeiro and Francischetti, 2003). Por outro lado, a espécie do parasito infectado é determinante para a diferenciação entre leishmaniose cutânea e visceral. Enquanto as espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são as principais causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil (Carvalho et al., 1994; Desjeux, 2004), as espécies *L. infantum* e *L. donovani* estabelecem a leishmaniose visceral (Desjeux, 2004). Por fim, humanos diferentes infectados com *L. amazonensis*, por exemplo, podem desenvolver a leishmaniose cutânea localizada (Desjeux, 2004), difusa (Turk and Bryceson, 1971) ou a mucocutânea (Marsden et al., 1998). Nestes casos, o padrão genético do hospedeiro determina o padrão de resposta imune e consequentemente os quadros clínicos.

1.2 Resposta Imune

As leishmanioses cutâneas são causadas por diversas espécies de *Leishmania*, como é o caso de *Leishmania amazonensis*, e portanto cada espécie possui uma resposta característica e divergente das demais. Porém, é possível observar um padrão de resposta presente em todos os tipos de infecção.

Quando inoculadas na derme, pelo inseto vetor, as formas promastigotas metacíclicas rapidamente infectam os fagócitos residentes na pele, tais como os

macrófagos (Kaye and Scott, 2011). Dentro do vacúolo destas células, elas rapidamente transformam-se para sua forma amastigota, que iniciam a reincidência de infecção nas células da periferia (Scott and Novais, 2016). E apesar dos macrófagos serem as principais células infectadas na pele, outras células que são também recrutadas para o sítio de infecção são infectadas, tais como neutrófilos e monócitos inflamatórios.

1.2.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas durante o curso da infecção (Peters et al., 2008) e a sua função é ainda muito controversa, uma vez que depende da espécie do parasito e do fundo genético do hospedeiro. Por exemplo, foi demonstrado que os neutrófilos são importantes para a eliminação de formas promastigotas de *L. amazonensis* através da produção de NETs (do inglês, ***Neutrophil Extracellular Traps***) (Guimarães-Costa et al., 2009). No entanto, outro grupo reportou que a saliva do inseto flebotomíneo possui atividade inibitória sobre estas NETs (Chagas et al., 2014). Além disso, os neutrófilos atuam no recrutamento de monócitos inflamatórios através da secreção de CCL2 que atua através dos receptores CCR2 destas células (Charmoy et al., 2010). Também é sugerido que os neutrófilos atuam como cavalos de tróia, servindo como um reservatório momentâneo para a replicação de *Leishmania* na derme (van Zandbergen et al., 2004). Então, após algum tempo da infecção, estes neutrófilos entram em NETose (processo que culmina na liberação de NETs) (Guimarães-Costa et al., 2009), porém outros podem engajar a apoptose. Monócitos inflamatórios que fagocitam neutrófilos apoptóticos infectados possuem uma reduzida diferenciação em células dendríticas. Esta condição, debilita a ativação de populações cruciais para a resposta contra *Leishmania*, tais como os linfócitos

CD4⁺, e os linfócitos CD8⁺ que são ativados através de apresentação cruzada (Ribeiro-Gomes et al., 2012).

1.2.2 Monócitos Inflamatórios e Células Dendríticas

Como citado acima, os monócitos inflamatórios migram para a derme mediante um gradiente de CCL2 (Charmoy et al., 2010) onde podem permanecer neste estado celular ou se diferenciar em células dendríticas. Os monócitos inflamatórios e as células dendríticas capturam os parasitos durante as primeiras horas e são as populações mais infectadas (Ribeiro-Gomes et al., 2012), após a redução nos níveis de neutrófilos nos primeiros dias de infecção. Estes dois tipos celulares ao mesmo tempo funcionam como um reservatório para o desenvolvimento da infecção, eles também podem contribuir para a resposta efetora do hospedeiro. Diferentemente dos macrófagos residentes, os monócitos inflamatórios apresentam uma intensa respiração mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio, controlando inicialmente o patógeno (Goncalves et al., 2011). Por outro lado, os macrófagos apenas colaboram para esta restrição após o contato futuro com IFN- γ oriundo de linfócitos (Held et al., 1999; Goncalves et al., 2011).

A maturação destes linfócitos é extremamente dependente da atividade de células dendríticas. Estas, mediante aumento na expressão de MHC-II, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) e CD40 (Hellman and Eriksson, 2007) migram para os linfonodos drenantes e proporcionam a geração de linfócitos Th1 (do inglês, ***T-helper type 1***) específicos para *Leishmania* através da secreção de IL-12 (von Stebut et al., 1998). Estudos realizados em animais deficientes para CCR2 corroboram estas informações, pois estes apresentam uma maior quantidade de neutrófilos que permanecem por cerca de 8 dias na derme contribuindo com altos níveis de IL-4. Tais fatores,

promovem o desenvolvimento de uma resposta linfocítica Th2 (do inglês, ***T-helper type 2***) (Jang et al., 2006), que inibe a diferenciação de células Th1 e consequentemente contribui para a presença de lesões incuráveis. Desta forma, enquanto os monócitos inflamatórios e as células dendríticas apresentam um papel protetor, é sugerido que os neutrófilos possam dificultar o controle da infecção. Ainda não foi esclarecido, se monócitos, e principalmente as células dendríticas, realmente, translocam os parasitos para outras regiões tais como os linfonodos drenantes e potencializam a resposta patógeno específica nestes locais.

1.2.3 Mecanismos de controle da imunidade inata

Os mecanismos que podem contribuir para o controle de leishmania por células da imunidade inata são os mediados por ROS (do inglês, ***reactive oxygen species***) e pelo NO (do inglês, ***nitric oxide***). Os ROS, normalmente são produzidos pela respiração mitocondrial (Littauer and de Groot, 1992), e mais especificamente, pelo desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons (Liu et al., 2002). No entanto, durante a fagocitose de diversos microorganismos, a produção destas moléculas é acentuada através da ativação da enzima NADPH oxidase presente na membrana dos fagossomos (León et al., 2007), assim como, pela presença de IFN- γ , o qual agindo via receptor IFNGR aumenta a expressão da NADPH oxidase (De Trez et al., 2009). Apesar de ROS ser uma substância microbicida, o seu papel no controle de *Leishmania spp.* é controverso. Enquanto, a produção de ROS por macrófagos de camundongos parece não contribuir para a eliminação do parasita (Rocha et al., 2007), esta mesma molécula tem um papel importante no controle da infecção intracelular por monócitos humanos (Novais et al., 2014). Embora estes dados *in vitro* demonstrem um possível papel das ROS, elas aparentam ter um papel secundário no

controle *in vivo* de *Leishmania spp.*, uma vez que camundongos deficientes para a enzima NADPH oxidase não apresentam susceptibilidade (Rocha et al., 2007).

Por outro lado, a molécula que apresenta maior relevância para o controle da infecção em sistemas murinos é o óxido nítrico. Este gás é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2 ou iNOS, do inglês: *inducible nitric oxide synthase*), podendo se dissipar através das membranas celulares (Gostner et al., 2013), e portanto apresenta potencial de eliminação intra e extracelular dos parasitos (Olekhnovitch et al., 2014). A produção de NO por macrófagos promove alterações metabólicas no parasito, reduzindo a sua proliferação e induzindo morte celular (Carneiro et al., 2016). A expressão e ativação basal de NOS2 é relativamente baixa nas células efectoras, portanto é necessário um sinal para a sua ativação. Tanto o IFN- γ (do inglês, *interferon gamma*) quanto o TNF- α (do inglês, *tumor necrosis factor*), aumentam a expressão desta enzima, e conseqüentemente a produção de NO (Bogdan et al., 1990). Tais informações são corroboradas com a alta susceptibilidade que os camundongos deficientes para iNOS apresentam (Bogdan et al., 1990). Por outro lado, em humanos, apesar da expressão de NOS2 ser detectada nas lesões de pacientes, não é observada diferença em relação às biópsias de pele sem lesão (Novais et al., 2014). No entanto, o bloqueio de NO em macrófagos humanos promove uma maior replicação intracelular do parasito (Gantt et al., 2001). Portanto, sugere-se que, em murinos, o NO tem uma função crucial na resposta e controle da infecção, mas não há nenhuma afirmação consistente em humanos.

1.2.4 Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa é crucial para o controle e resistência frente infecções por *Leishmania spp.* Assim como, o tipo de resposta adaptativa montada

determinará se o indivíduo infectado desenvolverá mecanismos de eliminação do parasito ou não. Por exemplo, quando infectados com parasitos do gênero *Leishmania* que induzem o desenvolvimento de leishmaniose cutânea, os camundongos C57BL/6 são resistentes pois apresentam uma resposta imune adaptativa Th1 derivada de IL-12, com linfócitos CD4⁺ produtores de IFN- γ (Sypek et al., 1993; Heinzel et al., 1993). Por outro lado, camundongos BALB/c são suscetíveis ao mesmo tipo de infecção, porque a resposta montada é predominantemente Th2, produtora de IL-4 (Chatelain et al., 2017). Notavelmente, as causas da susceptibilidade não se dão devido a presença dos mecanismos efetores da resposta Th2, e sim pela ausência da resposta Th1, a qual é inibida pela Th2.

As células mais importantes para a indução desses tipos de resposta são as células dendríticas oriundas dos monócitos inflamatórios recrutados via CCL2 (Sato et al., 2000). Estas células capturam e processam os antígenos de *Leishmania* e, quando completamente ativadas, migram para os linfonodos drenantes da infecção e apresentam os antígenos para os linfócitos T-*naive* específicos (von Stebut et al., 1998). Além destas células dendríticas oriundas da pele, aquelas residentes nos linfonodos também podem capturar antígenos que foram transportados pelo sistema linfático, na margem do seio subcapsular (Iezzi et al., 2006). Estes dois grupos de células dendríticas são uma rica fonte de IL-12 para os linfócitos T-*naive*, durante a sua ativação. Esta produção de IL-12 é oriunda da ativação natural dos TLRs das células dendríticas por PAMPs da infecção (Abou Fagher et al., 2009), mas pode ser potencializada pelo IFN- γ produzido pelas células NK do linfonodo (Liese et al., 2007).

Portanto, a ativação de células T naives por células dendríticas neste microambiente rico em IL-12 proporciona a diferenciação em células Th1. A IL-12, ao sinalizar via IL-12R em linfócitos T, promove a diferenciação para o perfil Th1

mediante ativação do fator de transcrição T-bet (Mullen et al., 2001). Apesar das células CD4⁺ Th1 serem as mais investigadas, nas diversas leishmanioses, as células CD8⁺ produtoras de IFN- γ , também podem ter um papel nesta resposta. Porém a sua relevância é variada e depende da magnitude da infecção inicial. Por exemplo, células T CD8⁺ podem contribuir para a fonte inicial de IFN- γ , que atua nas células dendríticas e potencializa a resposta Th1 (Uzonna et al., 2004). A maioria das infecções por *Leishmania spp.* em camundongos C57BL/6 desenvolve uma resposta Th1. No entanto, é importante ressaltar que no caso de *L. mexicana* e *L. amazonensis*, que é o nosso objeto de estudo, é observada uma resposta predominante mista de Th1 e Th2 (McMahon-Pratt and Alexander, 2004). Enquanto, em BALB/c, independente da espécie do parasito, a resposta predominante é a Th2 (Tacchini-Cottier et al., 2000), que por inibir a Th1 confere a susceptibilidade.

Desta forma, o linfócito Th1 é essencial para a resposta e o controle de formas cutâneas das leishmanioses. Após sua ativação, estas células migram para a pele, onde auxiliam na ativação de macrófagos residentes mediante a secreção de IFN- γ . Dados de microscopia intravital demonstraram que os linfócitos Th1 possuem uma seletividade de ativação, interagindo apenas ou principalmente com as células infectadas (Filipe-Santos et al., 2009). Porém, mesmo células não infectadas também são ativadas devido ao longo alcance de ação da citocina IFN- γ (Müller et al., 2012). Esta resposta conjunta da imunidade inata e adaptativa pode levar ao controle da infecção, porém, ao custo do desenvolvimento de lesões com caráter imunopatológico. O balanço das respostas efetoras e reguladoras durante a leishmaniose é crítico para o efetivo controle do parasito, com menor extensão do dano tecidual.

A regulação da resposta imunológica neste contexto pode se dar pela IL-10,

citocina que começa a se acumular na lesão após algumas semanas de infecção (Belkaid et al., 2002). Por outro lado, a permanência de uma pequena quantidade de parasitos na lesão pode levar a uma maior resistência à infecções secundárias. Já foi descrito, que após o quadro clínico patológico, é ainda possível observar uma pequena quantidade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetores na região da lesão, assim como é possível encontrar uma população de células T CD4⁺ de memória central que migra e reside nos linfonodos (Peters et al., 2014).

1.2.5 Causas da susceptibilidade a infecção

Os estudos realizados em camundongos C57BL/6 e BALB/c são os principais modelos que contribuem para a compreensão dos padrões de resposta imune associados a susceptibilidade ou resistência contra infecções por *Leishmania spp.* Como já citado, a presença de uma forte resposta Th1, induzida pela produção de IL-12 por células dendríticas é crucial para o controle do parasito mediado por IFN- γ (Heinzel et al., 1989). Acreditava-se que a principal causa de susceptibilidade de camundongos BALB/c era devido a elevada produção de IL-4 que direciona a resposta Th2, a qual é incapaz de restringir a replicação intracelular do patógeno. No entanto, como camundongos com fundo genético BALB/c e deficientes para IL-10 são capazes de controlar a infecção (Kane and Mosser, 2001), foi sugerido que a IL-10 seja a principal molécula que contribui para a deficiência no controle desta infecção, suprimindo as respostas efectoras do hospedeiro. Adicionalmente, enquanto os níveis de IL-4 não são elevados em pacientes com leishmaniose cutânea difusa, foram observados altos níveis da enzima arginase-I, que favorece a replicação do parasito, e de outros fatores imunossupressivos, tais como TGF- β e prostaglandina E2 em biópsias e no sangue de pacientes com este tipo de leishmaniose (França-Costa et

al., 2015).

1.3 Receptores da Imunidade Inata

1.3.1 Receptores Toll-like

Os receptores Toll-like (TLRs) são uma classe de receptores transmembranares que reconhecem antígenos microbianos e danos causados por patógenos. Estes receptores são encontrados na membrana plasmática e nas membranas endossomais. Após a sua sinalização, ocorre o engajamento de proteínas adaptadoras e de sinalização citosólica (Lee et al., 2012) que culminam na translocação de fatores de transcrição para o núcleo e a consequente transcrição de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas (Kawasaki and Kawai, 2014). Os TLRs estão presentes nas membranas de neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, e portanto atuam como sentinelas da presença de algum microorganismo ou de possíveis lesões teciduais promovidas durante sua infecção (West et al., 2006).

Dentre os TLRs, os TLR2, -4, -5 e -6 encontram-se nas membranas plasmáticas e os TLR3, -7, -8 e -9 nas membranas endossomais de células de murinos (Blasius and Beutler, 2010). Os TLRs sinalizam principalmente via as moléculas adaptadores MyD88 e TRIF (Lee et al., 2012). As cascatas de sinalização *downstream* destas moléculas podem contribuir para diversos tipos de infecções uma vez que permitem a ativação de NF- κ B e a expressão generalizada de genes pró-inflamatórios tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 (Akira and Takeda, 2004), assim como, também pode ativar a via de IRF que potencializa a ativação de interferons do tipo I (IFN- α/β). Notavelmente, a sinalização via TRIF tem uma preferência pelos fatores de

transcrição IRF, os quais são cruciais para uma resposta anti-viral (Kawai and Akira, 2008).

Os TLRs reconhecem tanto os PAMPs (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*) como também os padrões moleculares associados ao dano DAMPs (do inglês, *damage associated molecular patterns*) (Kawasaki and Kawai, 2014). Os PAMPs são moléculas encontrados em microorganismos, mas não no hospedeiro. Os PAMPs mais comumente encontrados em microorganismos são os peptidoglicanos, lipopolissacarídeos e flagelina que são reconhecidos por TLR2, -4 e -5, respectivamente. Assim como dsRNA, ssRNA (sem a molécula CAP) e DNA CpG, são reconhecidos pelos TLR3, -7 e -9 respectivamente (Akira and Uematsu, 2007).

O papel dos TLRs e suas proteínas adaptadoras, bem como de outros receptores da imunidade inata em infecções por *Leishmania spp.*, é um pouco controverso. A principal causa desta controvérsia é dada pela elevada distância filogenética entre as espécies de *Leishmania spp.* utilizadas como modelo, as quais geram padrões de resposta completamente diferentes no hospedeiro (McMahon-Pratt and Alexander, 2004).

Neste contexto, enquanto vários trabalhos são consistentes quanto a relevância de MyD88 para o controle de parasitos intracelulares por macrófagos, principalmente pelo receptor IL-1R (Hawn et al., 2002; Lima-Junior et al., 2013), o papel específico de cada receptor merece detalhamento. Camundongos deficientes para TLR2 são mais resistentes à infecção por *L. amazonensis*, onde apresentam uma menor carga parasitária (Guerra et al., 2010), assim como para *L. braziliensis*, onde a deficiência para TLR2 promove um maior número de células dendríticas ativadas (Vargas-Inchaustegui et al., 2009). Além disso, a modulação negativa da sinalização de IL-12 e o aumento da produção de arginase-1 e COX2, importantes para a

replicação de *L. mexicana*, foi demonstrado como dependente de TLR4 (Shweash et al., 2011). Sugerindo que TLR2 e TLR4 contribuem para a patogênese induzida por estas espécies. Os trabalhos que apontam o TLR2 (Osanya et al., 2011), TLR4 (Gantt et al., 2001) e TLR3/9 (Abou Fakher et al., 2009; Liese et al., 2007), como importantes para a resistência do hospedeiro, foram realizados utilizando *L. major* como modelo de infecção. Curiosamente, a proteção mediada por TLR9 ocorre a partir da produção de IL-12 por células dendríticas após o reconhecimento de DNA CpG do parasito nos endossomos (Abou Fakher et al., 2009).

1.3.2 Receptores NOD-like

Enquanto os TLRs operam principalmente para a detecção da presença de microrganismos, sejam eles patogênicos ou não, os NLRs, por serem receptores citosólicos, detectam a presença de microrganismos (ou moléculas derivadas deles) no citosol ou danos causados por eles (Davis et al., 2011). Diversos patógenos, através de fatores de virulência, modulam a fisiologia celular permitindo o estabelecimento de um nicho de replicação intracelular, sendo que durante esse processo, existe a liberação de material proteico ou gênico no citosol, o que pode culminar com a ativação dos NLRs (Van Avondt et al., 2015).

Estruturalmente, estes receptores citosólicos são formados, em geral, por 3 domínios, sendo os domínios pirina (PYD), NACHT e CARD os mais frequentes, mas outros, como o BIR, também podem ser encontrados. Devido a alta variabilidade gênica nesta família de receptores, não é possível estabelecer um padrão de domínios N ou C terminal. No entanto, em geral, o domínio de pirina e o de CARD realizam uma interação homotípica com os mesmos domínios nas moléculas de ASC e de caspases (Kufer et al., 2009).

Os NLRs são um excelente filtro para a distinção entre organismos patogênicos e não patogênicos. A localização de um microorganismo no citosol, geralmente o caracteriza como patogênico, uma vez que a maioria dos microorganismos não-patogênicos ou comensais, são fagocitados e até a sua eliminação permanecem no ambiente endossomal (Vance et al., 2010). Microorganismos patogênicos frequentemente acessam o citosol através de fatores de virulência e modulam a fisiologia celular para permitir tanto o estabelecimento de um nicho de replicação intracelular quanto a evasão de respostas efectoras do hospedeiro (Ringwald et al., 1993).

1.3.3 Inflamassomas

Dentre os vários membros da família dos NLRs, quatro deles ao interagirem com seus respectivos ligantes, se oligomerizam e montam uma plataforma multiprotéica denominada inflamassoma. Estes seletos membros são o NLRC4, NLRP3, NLRP6 e NLRP1b os quais são ativados por flagelina (Ringwald et al., 1993), efluxo de K⁺ (Muñoz-Planillo et al., 2013), metabólitos microbianos (Levy et al., 2015) e toxina letal do anthrax, respectivamente (Levinsohn et al., 2012).

Adicionalmente, AIM2 é um sensor citosólico não pertencente a classe dos NLRs, que quando ativo, recruta a molécula de ASC e oligomeriza-se numa plataforma de inflamassoma (Hornung et al., 2009). O AIM2, através do reconhecimento de DNA liberado no citosol durante a infecção por diversos patógenos, tem-se mostrado crítico na resposta contra patógenos e também pode contribuir para a patogênese através de uma resposta inflamatória exacerbada em casos de doenças autoimunes (Man et al., 2016).

Estruturalmente, o AIM2 é formado pelos domínios de pirina N-terminal e o

domínio semelhante a helicase HIN-200 C-terminal (Guarda and So, 2010). Quando o AIM2 está inativo, ele apresenta uma conformação inibitória, na qual o domínio HIN-200 interage e inibe o de pirina. Após a interação do domínio HIN-200 com uma sequência de DNA dupla fita contendo no mínimo 80 pares de base, o domínio de pirina é liberado e pode interagir com o domínio de pirina do ASC, promovendo a oligomerização da plataforma (Jin et al., 2013).

Durante uma infecção, pequenas quantidades de DNA ganham acesso ao citosol, sendo rapidamente detectados pela molécula cGAS, a qual através do adaptador STING e de STAT1, induz a secreção de IFN do tipo 1 (IFN- α e IFN- β) (Man et al., 2015). Quando estas moléculas sinalizam via IFNR1, é observado um aumento na expressão e ativação de GBPs (do inglês *guanylate binding proteins*), as quais se concentram ao redor dos fagossomos e promovem indiretamente a desestabilização vacuolar. Tal evento expõe diversos PAMPs, e inclusive o DNA do patógeno para o reconhecimento citosólico por AIM2 e a conseguinte ativação desta plataforma (Meunier et al., 2015).

Adicionalmente foi demonstrado que o DNA mitocondrial (DNAMt) também pode ativar o inflamassoma de AIM2 (Nakahira et al., 2011), e que um dos mecanismos que leva a translocação de DNAMt para o citosol durante infecções é o estresse do retículo endoplasmático (Dias-Teixeira et al., 2016). Este é induzido por diversos patógenos e caracterizado por uma desestabilização na tradução celular com conseguinte acúmulo de proteínas mal-enoveladas no retículo endoplasmático. Tal distúrbio é reconhecido por chaperonas ancoradas na membrana do RE, que então se translocam para o lúmen da organela e ativam diversas proteínas efetoras do estresse do RE, tais como IRE1, ATF6 e PERK (Todd et al., 2008). Estas induzem vias de sinalização que culminam na expressão de citocinas pró-inflamatórias, tal

como a IL-6 (Grootjans et al., 2016) e em mecanismos que promovem dano mitocondrial o qual pode levar a translocação de DNAm da célula do hospedeiro para o citosol (Bronner et al., 2015) e a ativação de AIM2.

Uma vez ativados, estes receptores recrutam a molécula adaptadora ASC, que contém um domínio de pirina e um CARD. O domínio CARD do ASC então interage com o CARD da caspase-1. Quando ativada, esta caspase forma-se e torna-se capaz de clivar e promover a secreção de IL-1 β e IL-18. Estas citocinas promovem o recrutamento de células para o sítio de infecção e intensificam a ativação autócrina e parácrina de células no sítio de infecção (Lamkanfi and Dixit, 2014). Além disso, a ativação dos inflamassomas induz a morte celular inflamatória denominada piroptose. A qual é fundamental para a restrição dos nichos de replicação intracelular dos patógenos (Bergsbaken et al., 2009).

É importante comentar que o NLRC4 e o NLRP1b podem interagir diretamente com caspase-1 inativas e permitir a sua ativação sem a consequente clivagem. Neste caso, a caspase-1 ativa não clivada apenas promove a piroptose independentemente de ASC, mas não possibilita a secreção de IL-1 β , a qual depende totalmente de ASC. Este padrão de resposta é presente também durante infecções com *Salmonella*, *Thyphimurium* e *Legionella pneumophila*, nas quais as vias de NLRC4 e Caspase-1 são as mais relevantes, assim como, no caso da infecção com *Francisella novicida* que fortemente ativa a via de AIM2 (Broz et al., 2010).

O nosso grupo foi o primeiro a relatar o papel de inflamassomas na resposta contra *Leishmania* spp (Lima-Junior et al., 2013). Neste trabalho foi descrito a importância do inflamassoma de NLRP3 para o controle da replicação de várias espécies de *Leishmania* spp. Adicionalmente, este controle é mediado pela produção de IL-1 β , a qual agindo via IL-1R leva à produção do agente microbicida óxido nítrico.

Tais dados corroboraram dados de pacientes, os quais apresentam uma maior suscetibilidade a infecções por *L. mexicana* e *L. infantum* quando apresentam polimorfismo no gene *IL1b* (Fernández-Figueroa et al., 2012).

Adicionalmente, foi recentemente reportado que os níveis de RNAm de AIM2 e o percentual de células AIM2^{hi} são maiores em lesões de pacientes não-responsivos a infecção por *L. braziliensis*, quando comparados àqueles responsivos. No entanto, não foi observada uma maior expressão de IL-1 β nestas lesões (Moreira et al., 2017). Além deste trabalho, o único relato do papel de AIM2 na resposta contra parasitos foi na promoção da inflamação em cooperação com NLRP3 durante a infecção por *Plasmodium falciparum* (Kalantari et al., 2014).

Como citado acima, é conhecido que o estresse de RE induz a translocação de DNAm (Bronner et al., 2015) e que este ativa o inflamassoma de AIM2 (Nakahira et al., 2011). Curiosamente, também foi demonstrado que *L. amazonensis* induz estresse de RE durante a sua infecção e que o sensor endossomal de DNA TLR9 é ativado por *L. major* (Abou Fakher et al., 2009). Em conjunto, tais dados suportam a hipótese da detecção, direta ou indireta, de *L. amazonensis* por outros sensores citoplasmáticos, tal como o AIM2. Além disso, é possível que este componente da resposta imune inata possa promover mecanismos efetores envolvidos na resposta e controle do parasitos.

Portanto, a atual investigação do papel de AIM2 em um modelo de infecção com *L. amazonensis*, pode contribuir não apenas para avanços acerca dos mecanismos moleculares estabelecidos durante a Leishmaniose, mas também para um melhor entendimento do papel de AIM2 em resposta a patógenos ou para a identificação de novas vias de sinalização desta molécula. Desta forma, o estudo do papel de AIM2 na infecção por *L. amazonensis*, pode contribuir para o

desenvolvimento de estratégias terapêuticas associadas ao tratamento de diversas doenças inflamatórias e infecciosas.

Neste contexto, o objetivo do nosso trabalho foi investigar o papel do inflamassoma de AIM2 na resposta imune inata e adaptativa durante a infecção com *L. amazonensis*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o papel de AIM2 na resposta imune frente à infecção por *Leishmania amazonensis*

2.2 Objetivos específicos

- Investigar os mecanismos pelos quais AIM2 contribui para o controle da infecção *in vitro* por *L. amazonensis*
- Avaliar os mecanismos dependentes de AIM2 que promovem a resistência a infecção *in vivo* por *L. amazonensis*

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos tipo-selvagens C57BL/6, camundongos geneticamente modificados deficientes de AIM2 (*Aim2*^{-/-}), NLRP3 (*Nlrp3*^{-/-}), ASC (*Asc*^{-/-}), e iNOS (*Nos2*^{-/-}) estes sendo fêmeas com 6 a 8 semanas de idade. Os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) e receberam água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em pesquisa animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP.

3.2 Parasitos e infecção experimental

Utilizamos parasitos *Leishmania* (L.) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), e *Leishmania* (L.) *amazonensis* expressando constitutivamente a proteína RFP (*L.a.-RFP*; IFLA/BR/67/PH8). Os parasitos foram cultivados à 26°C em meio de cultura Schneider (Sigma-Co, St. Louis, MO, EUA), contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) - GIBCO, 100 unidades/mL de penicilina G potássica (USB Corporation Cleveland, OH USA) e 2% de urina humana masculina em garrafas de cultura (Corning Incorporated, Corning NY-USA). Para infecções *in vivo* com *L. amazonensis*, os camundongos foram inoculados com 10 µL de salina tamponada com fosfato 0,1 M pH 7,2 (PBS) contendo 1 x 10⁶ promastigotas em fase estacionária de crescimento, por via intradérmica na orelha esquerda.

3.3- Avaliação das lesões e quantificação da carga parasitária na orelha

A espessura da lesão foi mensurada semanalmente utilizando-se um paquímetro. Esta medida foi determinada pela diferença entre o tamanho da orelha infectada e a contralateral, não infectada. Para avaliar o potencial dos camundongos em controlar o agente infeccioso, a orelha infectada e o linfonodo drenante da lesão foram coletados após 8 semanas de infecção. As orelhas foram incubadas a 37°C por 1 hora com Collagenase-II (Gibco). As orelhas e linfonodos foram posteriormente trituradas com auxílio de Cell Strainer (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), em um volume de 3 mL de meio de cultura Schneider (Sigma-Co, St. Louis, MO, EUA), com soro bovino fetal (Gibco) a 10% e 2% de urina humana masculina. Os parasitos presentes nas lesões foram quantificados pela técnica de diluição limitante como descrito anteriormente. (TITUS et al., 1985).

3.4- Diferenciação de macrófagos e células dendríticas a partir de células da medula óssea

Células precursoras foram obtidas da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, *Nlrp3*^{-/-} e *NOS2*^{-/-} e cultivadas em meio RPMI complementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 100 unidades/mL de penicilina G Potassium (Sigma-Co, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 30% de sobrenadante de cultura de células L929 (para diferenciação de macrófagos) ou 20 ng/mL de recombinante GM-CSF. Entre o sexto e o sétimo dia de cultura as células foram analisadas por citometria de fluxo, para determinar a expressão de F4/80, CD11b e Cd11c, sendo o início dos experimentos realizado quando a porcentagem de células CD11c⁺ Cd11b⁺ F4/80⁻ (DCs) ou CD11c⁻ Cd11b⁺ F4/80⁺ (macrófagos) for maior ou igual a 80%.

3.5- Infecção de macrófagos e células dendríticas *in vitro*

Culturas de macrófagos e células dendríticas foram ajustadas para uma concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$ em meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 50 μM de 2-mercaptoetanol, 100 unidades/mL de penicilina G Potassium (Sigma). As células foram distribuídas em placas de 12, 24, 48 e 96 poços, sendo 1000, 500, 300 e 100 μL por poço e mantidas em repouso durante 90-120 minutos ou *overnight* para a aderência. Para a infecção, macrófagos e células dendríticas foram, primados ou não com LPS (100 ng/mL) de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (InvivoGen – San Diego, CA - USA) e incubados com promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos/célula sendo realizadas duas lavagens com PBS estéril após 3 horas de infecção para a retirada dos parasitos extracelulares. As culturas foram mantidas à 33°C em estufa de CO₂ (5%) por 24 horas e realizada a análise da produção de citocinas (IL-12p40, IL-1 α e IL-1 β) por ELISA e a análise da expressão das moléculas de superfície (CD40, CD86, e MHC-II) por citometria de fluxo. Para os experimentos visando a avaliação da atividade leishmanicida dos macrófagos foram utilizadas as culturas dos mesmos infectados com *L. amazonensis* expressando constitutivamente a proteína RFP (*L.a* - RFP).

3.6- Marcação da caspase-1 ativa

Para avaliar a ativação da caspase-1, BMDMs infectados por 24 horas (10 parasitos/ célula) com *L. amazonensis* foram removidos da placa com PBS gelado e transferidos para um tubo de polipropileno. A marcação da caspase-1 ativa foi feita por uma hora com o reagente carboxyfluorescein FLICA (FAM–YVAD– FMK,

Immunochemistry Technologies, LLC), como recomendado pelo fabricante. Após esse período, as células foram lavadas por cinco vezes com PBS/Soro fetal bovino 1% e a aquisição das mesmas realizada no citômetro de fluxo FACSCantoII Accuri (BD) sendo as análises realizadas por meio do software “FlowJo” (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

3.7- Dosagem de citocinas

As concentrações de IL-1 β , IL-12, IFN- γ e IL-4 (kits da BD Biosciences) e IL-1 α , (Duoset; R&D Systems, Minneapolis, MN) dos sobrenadantes de cultura foram determinadas por ELISA seguindo as instruções do fabricante.

3.8- Dosagem de nitrito e óxido nítrico

As concentrações de Nitrito foram quantificadas do sobrenadante de cultura através do ensaio de reação de Griess. 50 μ L do sobrenadante foi incubado com 50 μ L do reagente de Griess (Ácido Fosfórico 5%, Sulfanilamida 2% p/v e Naftiletilenodiamino bicloridrato 0,2% p/v) por 5 minutos em temperatura ambiente. A concentração de nitrito foi determinada pela aferição da densidade óptica de 550 nm em referência a solução padrão de nitrito de sódio. Os níveis de óxido nítrico foram monitorados através da sonda fluorescente DAF-FM-DA. Após os estímulos, as culturas foram incubadas com 10 μ M de DAF-FM-DA (Molecular Probes, Eugene, OR) por 45 minutos a 37°C. Em seguida as células foram lavadas com PBS para remoção do excesso da sonda. Após 30 minutos a fluorescência foi quantificada através do padrão de excitação 494 nm e emissão 515 nm no leitor de fluorescência de microplaca Spectramax I3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.9- Detecção da expressão de NOS2 por Western Blotting

Para a detecção da expressão de NOS2, 5×10^5 BMDMs foram adicionados em placas de 48 poços, infectados ou não com *L. amazonensis* (10 parasitos/célula) por 24 horas. Os lisados foram ressuspensos em tampão de amostra contendo SDS (50 mM Tris; pH 6,8), 2% SDS (USB Corporation, USA), 0,1% azul de bromofenol (Synth, USA), 10% glicerol (USB Corporation, USA), 2,5% β -mercaptoetanol). As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, USA) utilizando o sistema de transferência *Semidry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, USA) a 15 volts por 40 minutos. Neste sistema foi utilizado tampão de transferência (50 mM Tris, 40 mM glicina e 10% metanol). As membranas foram bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente em tampão Tris (TBS – Tris buffered saline) (25 mM Tris - Hexis Científica, BR, pH 7.4, 0,3 mM KCl - J.T. Backer e 140 mM NaCl – J.T. Bacher) contendo 0,1% Tween-20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-NOS2 p130 (clone 6/INOS/NOS tipo II – BD Biosciences) (1:250) *overnight* à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas em TBS-T e incubadas por 1 hora a 25 °C com anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase (diluição 1:3000; KPL, USA). Para a detecção das proteínas ligadas aos anticorpos específicos foi utilizado o reagente ECL luminol (GE Healthcare, Boston, MA-USA), seguido da aquisição da imagem de quimioluminescência pelo equipamento Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Boston, MA-USA).

3.10- Cultivo de células *ex vivo*

Para a quantificação da secreção de citocinas da orelha e linfonodos retromaxilares drenantes de animais infectados com *L. amazonensis*, os órgãos foram dissociados e o “pellet” celular ressuspendido em 1 mL de meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino (para as células derivadas do linfonodo). Foi então realizada

a contagem das células em câmara de Neubauer, acertando-se a concentração celular para 5×10^6 células/mL, sendo 500 μ L distribuídos por poço, em placas de 48 poços sendo essas estimuladas ou não com 50 μ g/mL de antígeno particulado de *L. amazonensis*. As culturas foram incubadas a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Para a dosagem de IL-12p40, IFN- γ e IL-4 as culturas foram incubadas por 48h. As amostras foram armazenadas em tubos/placas à -70°C até o momento da dosagem.

3.11- Detecção intracelular de citocinas

Para a determinação das populações celulares produtoras de citocinas na orelha e linfonodo de animais infectados com *L. amazonensis*, os órgãos foram processados conforme descrito acima. As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^6 células/mL, sendo 500 μ L distribuídos por poço, em placas de 48 poços sendo essas estimuladas com ionomicina (500 ng/ml) e PMA (50 ng/ml) na presença de 1 μ l/mL de BD GolgiPlug (BD Biosciences). Após 6 horas, as células foram coletadas e foi realizada a marcação com anticorpos conjugados a fluorocromos para as moléculas de superfície. A marcação de citocinas intracelular foi feita utilizando-se o kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), conforme descrito pelo fabricante. Os dados foram adquiridos no citômetro FACSCanto II, sendo analisados pelo software FlowJo (Tree Star).

3.12- Análise Estatística

Os resultados foram representados como média $\pm$ desvio padrão da média (SD) e erro padrão da média (SEM) quando utilizarmos os dados brutos ou as médias dos experimentos respectivamente. Para comparação entre múltiplos grupos, foi utilizada a análise de variância (two-way ANOVA ou one-way ANOVA), seguida pelo pós-teste

de Bonferroni. Diferenças nos valores entre dois grupos foram determinadas utilizando o teste t de Student. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com o valor de P menor ou igual a 5%.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

O AIM2 é um sensor citosólico que, após o reconhecimento de DNA, promove a montagem de uma plataforma multimérica, denominada inflamassoma. Este receptor apresenta os domínios de pirina N-terminal e o domínio semelhante a helicase HIN-200 C-terminal (Guarda and So, 2010). Após a interação do domínio HIN-200 com uma sequência de DNA dupla fita contendo no mínimo 80 pares de base, o seu domínio de pirina é liberado e pode interagir com o domínio de pirina do ASC, promovendo a oligomerização de uma plataforma multimérica (Jin et al., 2013), a qual devido ao seu tamanho molecular de cerca de 700kDa (Elliott and Sutterwala, 2015), pode ser visualizada através de imunofluorescência.

Neste contexto, em dados não publicados do nosso laboratório, BMDMs de camundongos *Casp1/11^{-/-}* expressando ASC-GFP foram infectados com *L. amazonensis* por 4 horas. Então, a oligomerização da plataforma contendo ASC foi observada através da visualização de punctas de ASC pela técnica de imunofluorescência. Curiosamente, foi também visualizado que a proteína AIM2 colocalizava com este puncta, sugerindo que *L. amazonensis* ativa o sensor AIM2 e este promoveu a nucleação de ASC. Além disso, confirmamos a especificidade do anticorpo anti-AIM2, uma vez que BMDMs *Aim2/Caspase-1/11^{-/-}* não foram marcados por este anticorpo e que a transfecção de DNA dupla fita, um forte agonista de AIM2, também promoveu a colocalização deste receptor no puncta de ASC. Tais dados fazem parte de uma dissertação defendida anteriormente por um mestrando do grupo de pesquisa. (FONSECA, L. L., 2016)

4.1 A ativação do inflamassoma de AIM2 por *L. amazonensis* é importante para a secreção de IL-1 α mas não de IL-1 β em macrófagos derivado de medula

O nosso grupo demonstrou que a IL-1 β , produzida pela ativação de NLRP3 e caspase-1 por *L. amazonensis*, ao sinalizar via IL-1R, é crucial na resposta contra este parasito (Lima-Junior et al., 2013). Neste mesmo trabalho, foi observado que camundongos *Il-1r^{-/-}* são ainda mais susceptíveis que os *Nlrp3^{-/-}*, sugerindo que outras plataformas, que operam através de

IL-1R podem contribuir para a resistência a infecção. Portanto, para avaliar se a ativação de AIM2 por *L. amazonensis* leva a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β ou IL-1 α , BMDMs de camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-} e *Asc*^{-/-} foram infectados com *L. amazonensis* na proporção de 10:1.

Após 24 horas de infecção, foi observado que BMDMs de camundongos deficientes para AIM2 apresentavam níveis idênticos de IL-1 β quando comparados aos selvagens (Fig. 1a). Por outro lado, foi observada uma redução na secreção de IL-1 α em BMDMs *Aim2*^{-/-} (Fig. 1b). Estes BMDMs, também apresentaram uma redução estatisticamente significativa na ativação de caspase-1 (Fig. 1c-d).

Figura 1. AIM2 é importante para a secreção de IL-1 α mas não de IL-1 β , independente de caspase-1, em BMDMs infectados com *L. amazonensis*. A produção de IL-1 β (a) e IL-1 α (b) foi quantificada através de ELISA do sobrenadante de BMDMs de camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-} e *Asc*^{-/-} tratados por 4 horas com 500 ng/mL de LPS e então infectados ou não com *L. amazonensis* por 24 horas ou tratados com nigericina (20 μ M) por 2 horas. (c,d) Análise de citometria de fluxo de BMDMs C57BL/6, *Aim2*^{-/-}, *Nlrp3*^{-/-} infectados com *L. amazonensis* na proporção de 10:1 por 24 horas e marcados com FAM-YVAD. A análise estatística foi feita utilizando análise de multivariância ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os grupos foram considerados como estatisticamente diferentes do grupo C57BL/6 quando *P*<0.05. Dados representativos de três experimentos realizados independentemente.

4.2 A ativação do inflamassoma de AIM2 por *L. amazonensis* contribui para a produção de óxido nítrico através da regulação da expressão da enzima NOS2

A molécula com maior relevância para o controle da infecção por *Leishmania spp.* em modelos murinos é o óxido nítrico, uma vez que camundongos deficientes para NOS2 são altamente susceptíveis (Wei et al., 1995). Porém, em humanos, apesar da expressão de NOS2 ser detectada nas lesões de pacientes, não é observada diferença em relação às biópsias de pele sem lesão (Qadoumi and Becker, 2002). No entanto, o bloqueio de NO em macrófagos humanos promove uma maior replicação intracelular do parasito (Gantt et al., 2001). Portanto, sugere-se que, em murinos, o NO tem uma função crucial na resposta e controle da infecção, mas não há nenhuma afirmação consistente em humanos.

No mesmo trabalho que demonstrou o inflamassoma de NLRP3 contribui para a resistência à infecção por *L. amazonensis*, através da sinalização de IL-1R, foi relatado que essa sinalização promove aumento na expressão a nível de RNA mensageiro de NOS2 e consequentemente da produção do agente microbicida NO (Lima-Junior et al., 2013). Portanto, para investigar se a ativação de AIM2 por *L. amazonensis* leva a produção de óxido nítrico, os níveis desta molécula foram quantificados através da sonda fluorescente DAF-FM-DA. A análise de intensidade de fluorescência demonstrou que BMDMs *Aim2*^{-/-} e *Asc*^{-/-} infectados com *L. amazonensis* apresentam, após 24 horas, reduzidos níveis de NO (Fig. 2a), quando comparados aos BMDMs selvagens.

Adicionalmente, também foi observado, através de *western blot*, uma redução na

expressão proteica da enzima iNOS, ou NOS2, nestes mesmos BMDMs (Fig. 2b). Esta é a enzima que produz NO a partir do aminoácido L-arginina. Tais dados sugerem que AIM2 contribui para a produção de NO pela da regulação da expressão de NOS2, por meio de mecanismos ainda não estabelecidos.

Figura 2. AIM2 contribui para a produção de óxido nítrico mediante regulação da expressão de NOS2. A produção de óxido nítrico (a) e a expressão da enzima NOS2 (b) foram avaliadas pela sonda fluorescente DAF-FM-DA e por western blotting, respectivamente. BMDMs de camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-}, *Asc*^{-/-} e *Nos2*^{-/-} foram tratados com IFN-γ (10 ng/mL), TNF-α (10 ng/mL), LPS (500 ng/mL) (a) ou infectados com formas estacionárias de *L. amazonensis* na proporção de 1:10 por 24 horas. A análise estatística foi feita através da análise de multivariância ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os grupos foram considerados como estatisticamente diferentes do grupo C57BL/6 quando o $P < 0.05$. Dados representativos de três experimentos realizados independentemente.

4.3 AIM2 confere resistência à infecção *in vitro* por *L. amazonensis* em macrófagos murinos derivados de medula

Como já foi demonstrado que durante a infecção por *L. amazonensis*, o inflamassoma de AIM2 é ativado em macrófagos murinos, e que a sua ativação promove a secreção de IL-1α, assim como regula a expressão de NOS2 e a produção de NO, é esperado que esta plataforma possa contribuir para o controle da infecção por este parasito. Desta forma, para investigar o papel de AIM2 na infecção *in vitro* por *L. amazonensis*, BMDMs de camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} foram infectados com *L. amazonensis*-RFP e após 48 horas foi

observado, um maior percentual de células infectadas em BMDMs *Aim2*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} (Fig. 3a) assim como uma maior iMF (intensidade média de fluorescência) sugerindo que AIM2 é importante para o controle *in vitro* de *L. amazonensis* por BMDMs. Além disso, AIM2 também é importante para a secreção de IL-1 α , regulação da expressão proteica de NOS2 e produção de NO durante a infecção por *L. amazonensis*. Futuramente, para confirmar o papel da IL-1 α no controle *in vitro* de *L. amazonensis* por BMDMs, iremos quantificar a replicação intracelular do parasito em BMDMs deficientes para IL-1 α , assim como avaliar se o tratamento com IL-1 α recombinante, reverte a susceptibilidade de BMDMs *Aim2*^{-/-}.

Figura 3. A resistência à infecção *in vitro* por *L. amazonensis* depende de AIM2. Análise de citometria de fluxo de BMDMs C57BL/6, *Aim2*^{-/-} e *Nlrp3*^{-/-} infectados com formas estacionárias de *L.a.* RFP⁺ na proporção de 1:10 por 48 horas. Em seguida o percentual de células infectadas (a), a intensidade média de fluorescência (b) e a intensidade média de fluorescência integrada (iIMFi) (c) foram analisadas. A análise estatística foi feita utilizando análise de multivariância ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os grupos foram considerados como estatisticamente diferentes ao grupo C57BL/6 quando o $P < 0.05$. Dados representativos de três experimentos realizados independentemente.

4.4 AIM2 também contribui para a resistência à infecção *in vivo* por *L. amazonensis*

Lima-Junior e colaboradores (2013) observaram que os camundongos deficientes para NLRP3, assim como os BMDMs *Nlrp3*^{-/-} em ensaios *in vitro*, são susceptíveis à infecção por

L. amazonensis. Desta forma, para investigar se a contribuição de AIM2 para a resistência *in vitro* também pode ser evidenciada durante a infecção *in vivo* por *L. amazonensis*, camundongos C57BL/6 e deficientes para AIM2 ou para NLRP3 foram infectados na orelha com *L. amazonensis*. Em seguida, foi acompanhado semanalmente o desenvolvimento da lesão, através da medição da espessura da orelha. Foi observado que até a terceira semana, não houve diferença na lesão entre os camundongos selvagens e os deficientes para os sensores citosólicos (Fig. 4a). Porém, a partir da quarta e até a oitava semana, os camundongos deficientes tanto para AIM2 ou para NLRP3 apresentaram uma maior espessura da lesão (Fig. 4a). Assim como, foi observada uma maior quantidade de parasitos no linfonodo e na orelha destes animais na oitava semana de infecção (Fig. 4b,c). Sugerindo que, assim como NLRP3, AIM2 contribui para a resistência à infecção *in vivo* e *in vitro*.

Figura 4. AIM2 atua para o controle *in vivo* da infecção por *L. amazonensis*. (a) Quantificação do desenvolvimento da lesão da orelha de camundongos C57BL/6, Aim2^{-/-}, Nlrp3^{-/-} infectados com 1x10⁶ formas estacionárias de *L. amazonensis* e análise da diluição limitante da carga parasitária de linfonodos (b) e orelhas (c) com 8 semanas de infecção. A análise estatística foi feita utilizando análise de multivariância ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os grupos foram considerados como estatisticamente diferentes ao grupo C57BL/6 quando o $P < 0.05$. Dados representativos de três experimentos realizados independentemente.

4.5 AIM2 está envolvido com a resposta Th1 durante a infecção *in vivo* por *L. amazonensis*

Os dados anteriores demonstraram uma diferença na espessura da lesão na orelha após a terceira semana. Portanto, como é estabelecido que a imunidade adaptativa já exerce o papel predominante na resposta contra *L. amazonensis* a partir de 7 a 8 dias, pelos mecanismos acima citados, foi investigado o papel de AIM2 na resposta imune adaptativa. Para isto, animais foram infectados conforme descrito anteriormente, e na oitava semana o LNd e a orelha foram coletados e processados para investigar se a ausência de AIM2 poderia estar relacionada com alguma modificação nas populações celulares. Neste contexto, foi observada uma maior frequência de linfócitos ($CD45^+CD3^+$) no LNd (Fig. 5d) mas não na orelha (Fig. 5b) de camundongos *Aim2*^{-/-}.

Figura 5. AIM2 modula a frequência de linfócitos no linfonodo mas não no sítio de infecção. Análise de citometria de fluxo da frequência populacional de células CD45⁺ (a,c) e CD3⁺ (b,d) de orelhas (a-b) e linfonodos (c-d) de camundongos C57BL/6 e *Aim2*^{-/-} infectados por 6 semanas com 1×10^6 formas estacionárias de *L. amazonensis*. A análise estatística foi feita utilizando o teste T de Student. Os grupos foram considerados como estatisticamente diferentes ao grupo C57BL/6 quando o $P < 0.05$. Dados representativos de dois experimentos realizados independentemente.

Notavelmente, foi observado que os LNd de camundongos *Aim2*^{-/-} infectados com *L. amazonensis* são hipertrofiados, quando comparados a C57BL/6 (dados não mostrados). Com isso, torna-se necessário, em ensaios futuros, não apenas analisar a frequência de células, mas também o número total de uma população para corroborar os dados observacionais.

Mesmo a resposta Th1 sendo a crucial para o controle da infecção, no caso de *L. amazonensis* e *L. mexicana* (Greenwald et al., 2002), os padrões Th1 e Th2 estão presentes na resposta contra estes patógenos em modelos murinos de resistência à infecção (McMahon-Pratt and Alexander, 2004), como é o caso de camundongos C57BL/6. Desta forma, foi avaliado se AIM2 contribui para a diferenciação da resposta Th1 e Th2 durante a infecção *in vivo* por *L. amazonensis*. Para isso, as mesmas amostras da orelha e LN_d dos ensaios referentes a figura 5 foram utilizadas, e as frequências de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ (Th1) ou de IL-4 (Th2) foram quantificadas. Em concordância com os dados anteriores, foi observada uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺ no linfonodo de camundongos deficientes para AIM2 (Fig. 6a), porém estes linfócitos apresentaram uma menor produção de IFN- γ (Fig. 6b) e de IL-4 (Fig. 6c). Por outro lado, também não foi observada alteração na frequência de linfócitos T CD4⁺ na orelha (Fig. 6d). No entanto, estas células apresentaram uma menor produção de IFN- γ (Fig. 6d) mas não de IL-4 (Fig. 6f) em camundongos *Aim2*^{-/-}. Tais dados sugerem que o AIM2 é importante para a ativação e diferenciação de linfócitos Th1 e Th2 no LN_d e de linfócitos Th1 no sítio de infecção. Futuramente, será avaliado os níveis de IL-10 nestas condições, para investigar se a susceptibilidade de camundongos *Aim2*^{-/-}, além de ser justificada por reduzidos níveis de células Th1, também é devido a elevadas quantidade de IL-10.

Nestes ensaios, visando avaliar a produção das citocinas IFN- γ e IL-4, foi utilizado um método inespecífico de ativação dos linfócitos T. Este método consiste em estimular as células por 6 horas com PMA e ionomicina. Estas moléculas induzem a ativação de linfócitos T específicos ou não para antígenos de *L. amazonensis*, através do influxo de cálcio e a ativação da proteína PKC, crucial para a transdução de sinal que leva a transição do estado de uma célula T *naive* para ativada (Chopra et al., 1989; Chatila et al., 1989). Portanto, sabendo que células T não-específicas aos antígenos do organismo infectante também são ativadas durante uma infecção, esta abordagem nos fornece uma visualização abrangente de todas as células T que foram ativadas durante a infecção por *L. amazonensis*.

Figura 6. AIM2 é importante para a resposta Th1 durante a infecção por *L. amazonensis*. Quantificação da frequência populacional de células CD45⁺CD3⁺CD4⁺ (a,d) produtoras de IFN- γ (b,e) ou de IL-4 (c,f) de linfonodos (a-c) e orelhas (d-f) de camundongos C57BL/6 e Aim2^{-/-} infectados por 6 semanas com 1×10^6 formas estacionárias de *L. amazonensis*. A análise estatística foi feita através do teste T de Student. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando o $P < 0.05$. Dados representativos de dois experimentos realizados independentemente.

Por outro lado, uma abordagem adicional e mais específica é realizada através da coleta das células do sítio de infecção (orelha) e do LNd, seguido da reestimulação ou não destas células com o antígeno de *L. amazonensis* por 48 horas. Finalmente, realiza-se a

quantificação das citocinas IL-12, IFN- γ e IL-4 do sobrenadante destas células. Nesta abordagem, o antígeno reestimula apenas as células T específicas para epítomos de *L. amazonensis* e, portanto, fornece um padrão de ativação de linfócitos e secreção de citocinas mais específico para a resposta contra este parasito. Desta forma, após 48 horas de incubação das células do LNd e da orelha, na presença ou ausência de estímulo com antígeno, foi possível observar uma reduzida produção de IFN- γ pelas células do LNd de camundongos *Aim2*^{-/-} (Fig. 7b), quando comparados aos de C57BL/6. No entanto, não foi possível observar diferenças na produção de IL-12 ou IL-4 (Fig. 7a,c).

Curiosamente, as células da orelha de camundongos C57BL/6 reestimuladas com antígeno não apresentaram produção de IL-12 (Fig. 7d) e IFN- γ (Fig. 7e), ao contrário daquelas incubadas apenas com meio (Fig. 7d,e). Além disso, estas células, quando oriundas de camundongos deficientes para AIM2, apresentaram menores níveis de IL-12 (Fig. 7d) e IFN- γ (Fig. 7e), mas não de IL-4 (Fig. 7f).

A estimulação de células do LNd com antígeno é comumente utilizada na literatura, porém no caso das células da orelha, não encontramos trabalho científico adequado que descreve essa metodologia. As metodologias que estimulam células da orelha utilizaram citocinas tais como IL-12 e IL-18, como indutores para quantificar IFN- γ . Portanto, a ausência de resposta em células das orelhas estimuladas com antígeno pode ser devido a uma exaustão destas células T, a qual pode acontecer após a exacerbação de estímulos. É possível que os linfócitos T presentes no sítio de infecção já se encontravam ativos antes do estímulo antigênico, sofrendo processo de exaustão quando reestimulados em cultura. É importante destacar que este experimento foi realizado apenas uma vez, porém, como ele contribui para a compreensão do papel de AIM2 na resposta adaptativa específica à *L. amazonensis* nós decidimos apresentá-lo nessa dissertação. Além disso, este ensaio será repetido para uma maior confiabilidade dos dados.

Figura 7. AIM2 contribui para a produção de IFN-γ e de IL-12 durante a infecção *in vivo* por *L. amazonensis*. A produção de IL-12 (a,d), IFN-γ (b,e) e IL-4 (c,f) foi quantificada através de ELISA do sobrenadante de células coletadas das linfonodos (a-c) e orelhas (d-f) de camundongos C57BL/6 e *Aim2*^{-/-} infectados por 6 semanas com 1×10^6 formas estacionárias de *L. amazonensis* e estimuladas com o ASL por 48 horas. A análise estatística foi feita utilizando o teste T de Student. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes do grupo C57BL/6 quando o $P > 0.05$. Dados representativos de um experimento.

Dessa forma, esses dados corroboram os resultados observados na figura 6, onde o AIM2 contribui para a resposta Th1 e a produção de IFN-γ. No entanto, através desta técnica não foi possível corroborar a contribuição de AIM2 também para a resposta Th2. Entretanto, os dados da ativação de células T com PMA e ionomicina são convincentes e condizentes com a literatura, assim como o padrão de resposta mais importante continua sendo o Th1.

Também é importante destacar a reduzida produção de IL-12 pelas células da orelha de camundongos *Aim2*^{-/-} incubadas com meio (Fig. 7d). Uma vez que a IL-12 é crucial para a diferenciação de linfócitos Th1 (Sypek et al., 1993) em resposta a infecções com *Leishmania spp.*, este dado fornece uma possível explicação para a reduzida frequência de células Th1 em camundongos deficientes para AIM2, e sugere que AIM2 seja importante para a produção de IL-12.

4.6 AIM2 contribui para a expressão de co-receptores e para a secreção de citocinas pro-inflamatórias em células dendríticas infectadas *in vitro* com *L. amazonensis*

A principal população celular produtora de IL-12 no sítio de infecção, e que também exerce um papel imprescindível na polarização Th1 são as células dendríticas (Heufler et al., 1996). Estas promovem a ativação de linfócitos, através da captura, processamento e apresentação de antígenos via MHCII (Savina and Amigorena, 2007). No entanto, para uma ativação bem sucedida dos linfócitos, é necessário a interação das moléculas co-estimulatórias CD86 e CD40 das células dendríticas com os receptores CD28 (Linsley et al., 1994) e CD40L (Banchereau et al., 1994) das células T. Assim como, é requerida a secreção de IL-12 por células dendríticas (Heufler et al., 1996), a qual sinalizando via o receptor IL-12R, em linfócitos T, promove a diferenciação para o perfil Th1 mediante ativação do fator de transcrição T-bet (Mullen et al., 2001). Neste contexto, para investigar o papel de AIM2 na ativação de células dendríticas, BMDCs de camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-} e *Asc*^{-/-} foram infectadas com *L. amazonensis* na proporção de 10:1. Após 24 horas, a expressão de moléculas do MHCII e dos co-receptores CD86 e CD40 foi avaliada através de citometria de fluxo, e a secreção da citocina IL-12, foi quantificada por ELISA. Estes dados demonstraram que a infecção por *L. amazonensis* induz o aumento na expressão de MHCII (Fig. 8b), CD86 (Fig. 8c) e CD40 (Fig. 8d). No entanto, enquanto a expressão de MHCII não é alterada pela deficiência de AIM2 (Fig. 8b), a expressão de CD86 (Fig. 8c) e CD40 (Fig. 8d) foi reduzida em BMDCs de *Aim2*^{-/-}. Além disso, foram observados reduzidos níveis de secreção de IL-12 (Fig.

8e).

Apesar da não contribuição de AIM2 para a expressão de MHCII, estes dados sugerem que este sensor é importante para a ativação de células dendríticas por *L. amazonensis*, uma vez que esta molécula contribuiu para a expressão de co-receptores responsáveis pelo segundo sinal de ativação de linfócitos (CD86 e CD40), assim como da citocina IL-12 crucial para o terceiro sinal de diferenciação de linfócitos Th1.

Adicionalmente, para investigar a contribuição de AIM2 na produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes da atividade do inflamassoma em células dendríticas, os níveis de secreção de IL-1 β e IL-1 α foram quantificados dos mesmos sobrenadantes dos ensaios anteriores. Verificamos que após 24 horas de infecção com *L. amazonensis*, ocorre uma redução na produção de IL-1 α nos BMDCs *Aim2*^{-/-} quando comparados aos de C57BL/6, assim como nos BMDMs.

Figura 8. AIM2 tem papel na expressão de co-receptores e secreção de citocinas pró-inflamatórias em BMDCs durante a infecção por *L. amazonensis*. Quantificação da expressão de

CD11c (**a**), MHCII (**b**), CD40 (**c**) ou CD86 (**d**) em BMDCs (CD11c⁺) de camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-}, *Asc*^{-/-} infectados com *L. amazonensis* na proporção de 10:1 por 24 horas. A produção de IL-12 (**e**), IL-1 β (**f**) e IL-1 α (**g**) foi quantificada por ELISA do sobrenadante de BMDCs de camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-}, *Asc*^{-/-} infectados com *L. amazonensis* na proporção de 10:1 por 24 horas. A análise estatística foi feita utilizando análise de multivariância ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes do grupo C57BL/6 quando o $P < 0.05$. Dados representativos de dois (**a-d**) ou três (**f,g**) experimentos realizados independentemente.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Diversos organismos desenvolveram mecanismos celulares, fisiológicos e sistêmicos para reconhecer e responder à presença de estruturas, antígenos e até mesmo de outros organismos estranhos no interior do citosol ou do corpo. Durante grande parte da história evolutiva de vírus, bactérias (Rath et al., 2015), animais (Flajnik and Kasahara, 2010) e plantas (Zipfel, 2014), um sistema de resposta exclusivo baseado no reconhecimento de padrões moleculares conservados distinguiu antígenos próprios dos não-próprios (Janeway, 1992). As moléculas responsáveis por este tipo de detecção, em animais e plantas, são caracterizadas como receptores de reconhecimento molecular padrão, as quais são codificadas na linhagem germinativa e o seu engajamento direciona a ativação de mecanismos efetores contra os organismos e antígenos estranhos (Janeway, 1992). Em organismos evolutivamente mais derivados, estes receptores e os mecanismos operados por eles, estão presentes em células que residem em diversos potenciais sítios de infecção, e portanto, antes mesmo da presença de um organismo estranho encontram-se prontos para montar uma resposta efetora. Por causa destas características, estas células e os seus respectivos receptores caracterizam os mecanismos de resposta da imunidade inata (Kumar et al., 2011).

Adicionalmente, estes receptores possuem uma localização diversa nos compartimentos celulares, estando presente tanto em membranas endossomais e plasmáticas (TLRs) (Blasius and Beutler, 2010; Akira and Uematsu, 2007), quanto solúveis no citosol (NLRs) (Shaw et al., 2008). Esta localização diferencial consiste em uma estratégia evolutiva, para a distinção entre microorganismos comensais e patogênicos (Abdul-Sater et al., 2009). Uma vez que os comensais, além de serem segregados por barreiras físicas e químicas, são rapidamente fagocitados e eliminados quando translocados para regiões de risco, como é o caso da derme (Cogen et al., 2008) e da lâmina própria (Pédron and Sansonetti, 2008). No caso dos comensais, eles são essencialmente reconhecidos por TLRs de superfície e endossomais. Por outro lado, organismos patogênicos, extra ou intracelulares, evadem os mecanismos efetores da resposta imune inata, assim como modulam a fisiologia celular para criar microambiente apropriado para a sua replicação (Abdul-Sater et al., 2009).

Isso ocorre quando ganham acesso ao citosol das células do hospedeiro, e além de serem reconhecidos por TLRs (Akira and Uematsu, 2007), também são reconhecidos por NLRs citosólicos (Abdul-Sater et al., 2009). Estes montam uma resposta apropriada, mediada por IL-1 β , IL-18 e IL-1 α , assim como por meio da morte celular piroptótica, contra organismos patogênicos. A secreção destas citocinas, leva ao recrutamento de células e a consequente ativação no sítio de infecção. Por outro lado, a piroptose, limita o nicho de replicação intracelular dos patógenos (Lamkanfi and Dixit, 2014).

No entanto, há 500 milhões de anos atrás, o surgimento dos genes RAG-1 e RAG-2 em mandibulados (Kapitonov and Koonin, 2015), seguido de duas duplicações gênicas massivas no genoma destes organismos, permitiu a seleção de um gene associado a recombinação de genes da resposta imune em células somáticas (Schatz, 1999). Tal fato possibilitou a geração de uma quantidade incomparável de genes que codificam moléculas associadas ao reconhecimento antigênico. Enquanto o repertório de genes de reconhecimento da imunidade inata encontrava-se no nível das dezenas ou até no máximo centenas em um genoma (Hibino et al., 2006), o repertório de receptores derivados de RAG-1 e RAG-2, pode chegar na escala de 10^{12} (Qi et al., 2014), como é observado em humanos e mamíferos atuais. Curiosamente, este elevado número de genes, selecionou outra característica crucial nas células que os expressavam. Como a quantidade de genes é bastante grande, em homeostase, um pequeno número de células expressam o mesmo receptor dos 10^{12} diferentes tipos (Qi et al., 2014), e estas apenas irão se expandir, e se ativar, após o reconhecimento destes antígenos (Quintáns and Lefkovits, 1974). Uma vez expandidas e a infecção resolvida, estas células permanecem em número reduzido, porém ainda maior do que antes da infecção. Além disso, elas se encontram mais ativadas em relação à primeira estimulação antigênica, e portanto responderão mais eficientemente à uma segunda exposição antigênica, o que é caracterizado como memória (Gowans and Uhr, 1966; Kugelberg, 2016). Tal propriedade caracterizou estas células e os receptores como pertencentes a uma resposta imune adaptativa.

Apesar, da imunidade adaptativa ser mais eficiente na resposta apropriada frente a uma maior variedade de infecções, é conhecido que a imunidade inata tem um papel muito maior

na resposta à infecções do que a imunidade adaptativa (Vance et al., 2010). Tal afirmação é corroborada pela observação de que a deleção de genes cruciais para a resposta imune inata confere uma susceptibilidade a uma quantidade muito maior de infecções quando comparada a deleção de genes da resposta imune adaptativa. Tais dados são explicados pelo fato de que a imunidade inata é capaz de controlar diversos tipos de infecções, pelo reconhecimento, fagocitose, atividade microbicida e secreção de mediadores pró-inflamatórios que promovem o recrutamento de células para o sítio de infecção e a sua consequente ativação (Zhong et al., 2006).

Adicionalmente, a imunidade inata tem um papel crucial na comunicação e ativação especializada das células da resposta imune adaptativa, através de mecanismos acima citado, os quais demonstram a importância magna da resposta imune inata frente à infecções (Janeway, 1992).

No caso de infecções com *Leishmania*, principalmente com àquelas do novo mundo (*L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*), existe uma controvérsia quanto ao papel dos receptores da imunidade inata e suas moléculas adaptadoras, principalmente aos TLRs que são mais estudados. Como citado acima, sugere-se que, ao contrário da contribuição para a resistência a infecção pela *L. major* (Abou Fakher et al., 2009; Osanya et al., 2011; Gantt et al., 2001) do velho mundo, os TLRs contribuem para a susceptibilidade às infecções pelos parasitos do novo mundo (Vargas-Inchaustegui et al., 2009; Shweash et al., 2011). No entanto, a deleção da molécula adaptadora MyD88 que não apenas transduz sinal via estes TLRs, mas também via IL-1R, promove uma das maiores susceptibilidades à infecções por parasitos do novo mundo (Muraille et al., 2003). Curiosamente, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, modulam a resposta imune efetora por meio do TLR2 e TLR4, que sinalizam via MyD88, produzindo moléculas anti-inflamatórias tais como COX2 e arginase-I (Shweash et al., 2011; Guerra et al., 2010).

Desta forma, sugere-se que a importância do MyD88 para a resistência à estes parasitos, esteja associada a outro receptor, tal como o IL-1R, o qual também contribui para o controle da infecção em modelos animais de resistência com fundo genético C57BL/6. Tal

hipótese foi bem corroborada, pelo trabalho prévio do nosso grupo, que mostrou que a sinalização via IL-1R mediante produção de IL-1 β e dependente da ativação de NLRP3, promove o controle de *L. amazonensis* pela produção da molécula leishmanicida óxido nítrico (Lima-Junior et al., 2013).

Adicionalmente, o nosso grupo por meio da demonstração prévia da ativação de AIM2 por *L. amazonensis*, corrobora a hipótese da deturpação da homeostase celular por este parasito, o qual permite a ativação direta ou indireta deste sensor citosólico de DNA. Atualmente, hipotetizamos que a ativação de AIM2 durante a infecção por *L. amazonensis*, pode ocorrer pelo reconhecimento direto do DNA do parasito. Tal hipótese poderia se desenvolver tanto pela translocação de DNA de *L. amazonensis* do vacúolo parasitóforo para o citosol quanto pela desestabilização vacuolar, a qual é um dos requerimentos para a ativação de AIM2 por outros patógenos (Man et al., 2015; Meunier et al., 2015). Apesar de termos demonstrado que *L. amazonensis* ativa o inflamassoma de AIM2, os mecanismos envolvidos nesta ativação serão futuramente investigados. Assim como, tentaremos avaliar de forma endógena, na ausência de super expressão de ASC-GFP, a ativação e colocalização de AIM2 com ASC, descartando a possibilidade dessa interação ser um artefato da super expressão de ASC-GFP. Além disso, para avaliar a contribuição do AIM2 na montagem dos inflamassomas induzidos pela infecção com *L. amazonensis*, quantificaremos o número de punctas de ASC em BMDMs de camundongos C57BL/6 e *Aim2*^{-/-}, uma vez que, outros sensores também podem, quando ativados, promover a nucleação de ASC.

Após a oligomerização de AIM2 com a molécula adaptadora ASC, ocorre a interação homotípica do domínio CARD de uma caspase-1 efetora com o domínio CARD do ASC. Em seguida, estas caspases formam heterodímeros que clivam e secretam IL-1 β e IL-18 (Lamkanfi and Dixit, 2014). Também foi demonstrado que a ativação de vários inflamassomas leva a secreção de IL-1 α (Groß et al., 2012) e que IL-1 β e IL-1 α sinalizam via IL-1R (Barry et al., 2013). Estas citocinas promovem o recrutamento celular para o sítio de inflamação, assim como induzem a ativação destas células frente à infecção (Luheshi et al., 2009).

Curiosamente, ao avaliar se a ativação de AIM2 por *L. amazonensis*, promove a

secreção destas citocinas inflamatórias, nós observamos uma dependência deste sensor citosólico para a produção de IL-1 α , mas não de IL-1 β . Além disso, foi observada uma contribuição mínima de AIM2 para a ativação de caspase-1. No entanto, tal contribuição não parece condizer com o mesmo nível de importância de AIM2 para a secreção de IL-1 α , sugerindo que outros mecanismos possam operar para a produção desta citocina mediante a ativação de AIM2 por *L. amazonensis*. Não podemos descartar a contribuição de caspase-1 para a produção de IL-1 α apenas através da comparação entre duas técnicas, para elucidar tal contribuição iremos avaliar, futuramente, a secreção de IL-1 α em BMDMs deficientes para caspase-1 ou na presença do inibidor específico de caspase-1 (YVAD-cmk).

Apesar de IL-1 β e IL-1 α terem sido demonstradas como secretadas mediante ativação de AIM2 (Groß et al., 2012; Meunier et al., 2015; Broz et al., 2010), por agonistas tal como o poly(dA:dT), os mecanismos envolvidos no processamento destas citocinas em formas biologicamente ativas diferem bastante. Por exemplo, enquanto a caspase-1 é essencial para a clivagem de IL-1 β (Broz et al., 2010), no caso de IL-1 α é observada a clivagem dependente e independente de caspase-1 (Groß et al., 2012). Uma vez que outras enzimas, como a calpaína (Carruth et al., 1991) e a granzima-B (Afonina et al., 2011), também podem clivar a IL-1 α na sua porção C-terminal.

Adicionalmente, mesmo não tendo observado uma redução nos níveis de IL-1 β e de ativação de caspase-1 em BMDMs *Aim2*^{-/-}, não podemos descartar a contribuição de AIM2 para estes eventos celulares durante a infecção por *L. amazonensis*. Como a secreção de IL-1 β pode ser induzida por outras plataformas tais como NLRP3, NLRC4 e caspase-11, é possível que haja uma redundância do sistema de secreção de IL-1 β em macrófagos murinos de medula, tornando a via de AIM2 não essencial para a produção desta molécula.

Além disso, como já foi demonstrado que IL-1 β , atuando via IL-1R, é crucial para a resistência de camundongos C57BL/6 à infecção por *L. amazonensis* (Lima-Junior et al., 2013), e que IL-1 α também sinaliza via este receptor (Barry et al., 2013), torna-se necessário investigar também o papel desta citocina na resposta *in vitro* e *in vivo* frente à infecção por este parasito. Os únicos dados associando IL-1 α em modelos de leishmaniose foram

realizados com camundongos susceptíveis BALB/c e com modelos de infecção com *L. major* (Voronov et al., 2010). Como *L. amazonensis* e *L. major* apresentam respostas muito diferentes no hospedeiro, nenhuma conclusão acerca da contribuição da IL-1 α pode ser gerada com base neste estudo, para a resposta contra *L. amazonensis*. Para isto, avaliaremos futuramente o desenvolvimento de lesão e o controle intracelular do parasito em camundongos deficientes para IL-1 α e em BMDMs *Il1a*^{-/-} infectados com *L. amazonensis* respectivamente. Além disso, avaliaremos estes parâmetros mediante o tratamento *in vitro* e *in vivo* com IL-1 α recombinante.

Como citado acima, o NO é o mecanismo leishmanicida derivado da ativação de NLRP3 e da sinalização de IL-1 β via IL-1R (Lima-Junior et al., 2013). Portanto, uma vez que observamos a contribuição de AIM2 para a produção de IL-1 α , e esta citocina também sinaliza via IL-1R (Barry et al., 2013), nós hipotetizamos se AIM2 também estaria contribuindo para a produção de NO. Notavelmente, nós observamos que, durante a infecção *in vitro* por *L. amazonensis*, o AIM2 não só contribui para a produção de NO, mas também para a expressão da enzima NOS2. Para corroborar estes dados, e a possível contribuição da IL-1 α dependente da ativação de AIM2 para a produção de NO, nós iremos futuramente investigar se a estimulação de BMDMs com IL-1 α recombinante realmente pode promover a expressão de NOS2 e a produção de NO. Além disso, investigaremos se estes parâmetros são afetados em BMDMs deficientes para IL-1 α infectados com *L. amazonensis*. Assim como, validaremos todas estas hipóteses avaliando a expressão de mRNA do gene *Nos2*.

Uma vez tendo observado que, durante a infecção por *L. amazonensis*, o inflamassoma de AIM2 é ativado em macrófagos murinos, e que a sua ativação promove a secreção de IL-1 α , assim como regula a expressão de NOS2 e a produção de NO, era esperado que esta plataforma pudesse contribuir para o controle da infecção por este parasito. Desta forma, observamos que assim como NLRP3, o AIM2 não só contribui para a resistência à infecção *in vitro*, pelos mecanismos acima sugeridos, mas também à infecção *in vivo* por *L. amazonensis*.

Curiosamente, a resistência promovida por AIM2, *in vivo*, apresentou-se apenas a partir

da quarta semana. Porém, este evento não descarta um possível papel de AIM2 na fase inicial da infecção e nos mecanismos da imunidade inata *in vivo*. Portanto, para testar a contribuição inicial de AIM2 para a resistência contra *L. amazonensis*, avaliaremos futuramente, nas três primeiras semanas de infecção, outros parâmetros celulares no sítio da infecção e no linfonodo drenante (LNd) em animais C57BL/6 e *Aim2*^{-/-}. Como por exemplo, o perfil de populações celulares da imunidade inata tais como neutrófilos, monócitos inflamatórios e células dendríticas; a secreção de citocinas (IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-6 e IL-12); o perfil de ativação e migração de células dendríticas para o LNd; a ativação de linfócitos Th1, assim como, a carga parasitária de orelha e linfonodo.

Por outro lado, como foi observado um aumento na lesão em animais deficientes para AIM2 apenas após a quarta semana, e a partir de 7 a 8 dias de infecção, a imunidade adaptativa já exerce o papel predominante na resposta contra *L. amazonensis*, através de mecanismos acima citados, nós decidimos investigar o papel de AIM2 na resposta imune adaptativa. Já foi demonstrado que a resposta efetora de linfócitos Th1, mediante produção de IFN- γ , é a mais eficiente em ativar mecanismos microbicidas intracelulares (ROS e NO) que levam ao controle do parasito (Scott et al., 1988; Green et al., 1990). Além disso, a ausência da montagem de uma resposta Th1, consiste no principal motivo da não-responsividade de pacientes (Shahi et al., 2013) ou de camundongos (Heinzel et al., 1989) à infecção por *Leishmania spp*, como ocorre em animais BALB/c. Nos modelos de leishmaniose cutânea, a principal molécula que contribui para a susceptibilidade é a IL-10 (Petritus et al., 2012; Soong, 2008) e não a IL-4, a qual tem um papel parcial (Sadick et al., 1990). Ainda mais, as lesões de pacientes não-responsivos são resultantes do acúmulo de parasitos e de IL-10 que induzem a fibrose tecidual (Scott and Novais, 2016). Também é importante destacar que apesar da resposta Th1 ser a responsável pelo controle de *L. amazonensis*, a infecção por este parasito desenvolve uma resposta mista Th1 e Th2 no hospedeiro.

Neste contexto, foi observado que na sexta semana de infecção com *L. amazonensis*, a deficiência para AIM2 promove um maior número de linfócitos no linfonodo, o que corrobora a observação visual de linfonodos hipertrofiados oriundos de animais deficientes para AIM2.

No entanto, é possível que esta maior frequência de linfócitos possa ser uma consequência de um mecanismo compensatório gerado pela maior quantidade de parasitos e por uma possível deficiência na resolução da infecção. Uma vez que, nossos dados sugerem que AIM2 é importante para a montagem do perfil de linfócitos Th1 em resposta a infecção por *L. amazonensis*.

Como discutido acima, foi demonstrada a importância de AIM2 para o perfil Th1, através de duas técnicas. Adicionalmente, quando as células da orelha foram reestimuladas com antígenos de *L. amazonensis*, foi observado que o inflamassoma de AIM2 também contribui para a produção de IL-12 no sítio de infecção. Citocina esta, crucial para a diferenciação de linfócitos Th1, mediante ativação do fator de transcrição T-bet em linfócitos T-naive (Mullen et al., 2001).

Como já conhecido, as células dendríticas são as principais células produtoras de IL-12 e cruciais para a montagem da resposta Th1 em resposta a *L. amazonensis* (Sypek et al., 1993). E notavelmente, foi observado que BMDCs infectadas com *L. amazonensis* requerem o AIM2 para a expressão das moléculas co-estimulatórias CD86 (B7.2) e CD40, assim como para a produção de IL-12. Como a função das células dendríticas requer a sua migração e interação com linfócitos T na zona medular do linfonodo drenante, e esta migração é totalmente dependente do receptor de quimiocinas CCR7 (Jang et al., 2006), também iremos avaliar futuramente a contribuição de AIM2 para a expressão deste receptor.

Além disso, demonstramos que o AIM2, assim como em macrófagos, contribui para a secreção de IL-1 α em células dendríticas. Porém, ao contrário do observado em macrófagos, AIM2 também é importante para a secreção de IL-1 β por células dendríticas. A diferença no requerimento de AIM2 para a produção de IL-1 β por BMDMs e BMDCs, pode ser devido a diferentes níveis de expressão de AIM2 nestas células. Para investigar isso, iremos futuramente quantificar a expressão deste sensor e de outros componentes de inflamassomas tais como NLRC4, caspase-11 e NLRP3 a nível de RNAm e proteína em ambos tipos celulares. Tal abordagem, pode explicar a compensação na produção de IL-1 β durante a deficiência para AIM2 em BMDMs mas não em BMDCs.

Curiosamente, a presença de IL-1 β já foi demonstrada como potencializando a ativação de células dendríticas via CD40L (Luft et al., 2002), assim como promovendo a produção de IL-12 por células dendríticas (Wesa and Galy, 2001). Adicionalmente, a IL-1 β aumenta a quantidade de células T proliferando em resposta a um antígeno (Chu et al., 1984). Sugerindo, que o AIM2 através da IL-1 β possa promover a ativação das células dendríticas no contexto de infecção com *L. amazonensis*, assim como a expansão de linfócitos T ativados. Como a IL-1 α age através do mesmo receptor (IL-1R) que a IL-1 β e é fortemente produzida por células dendríticas, é possível que ela também possa ter um papel na ativação destas células. Não há relatos, na literatura, da contribuição de IL-1 α para a ativação de células dendríticas em C57BL/6, por outro lado, a IL-1 α foi demonstrada como importante para o desenvolvimento da resposta Th1 dependente de IL-12 em BALB/c. Para testar a hipótese de que a ativação de AIM2 em células dendríticas por *L. amazonensis* induz a ativação destas células mediante secreção de IL-1 α , iremos futuramente investigar se a deficiência na expressão de CD86, CD40 e secreção de IL-12 por células dendríticas pode ser recuperada pelo tratamento com IL-1 β ou IL-1 α recombinantes. Adicionalmente, iremos investigar o padrão de ativação de BMDCs de camundongos *Il1a*^{-/-}.

É importante destacar que todas as sugestões acerca do papel de AIM2 em células dendríticas foram feitas *in vitro*. Portanto, para confirmar a contribuição deste sensor para a montagem de uma resposta Th1 durante a infecção com *L. amazonensis*, através da ativação de células dendríticas, é preciso realizar ensaios com modelos de infecção *in vivo*. Nestes ensaios, iremos investigar o papel do inflamassoma de AIM2 nos primeiros dias de infecção com *L. amazonensis* na orelha. Neste contexto, iremos avaliar, entre camundongos C57BL/6, *Aim2*^{-/-}, *Il1a*^{-/-} e *Il1b*^{-/-}, o perfil de migração de células dendríticas da pele para o linfonodo, a expressão de co-receptores e a secreção de citocinas por estas células.

Em conjunto, estes dados sugerem um modelo, no qual a ativação do inflamassoma de AIM2 leva a secreção de citocinas por células da imunidade inata, no caso de IL-1 α por macrófagos e células dendríticas e de IL-1 β por células dendríticas. Em seguida, apesar de não demonstrarmos experimentalmente, nós hipotetizamos que a IL-1 α possa atuar em

macrófagos e promova o controle intracelular de *L. amazonensis* mediante sinalização via IL-1R e aumento na expressão de NOS2 e consequente produção de NO. Em paralelo, também sugerimos que a sinalização via IL-1R, por IL-1 β e IL-1 α , em células dendríticas, possam promover a expressão das moléculas co-estimulatórias CD86 e CD40 nestas células, assim como a secreção de IL-12. Portanto, a ativação de AIM2 em células dendríticas confere o requerimento para o segundo e terceiro sinais de ativação de células T, e devido a presença de IL-12, promove a diferenciação dos linfócitos em células Th1 produtoras de IFN- γ . Finalmente, estas células Th1 produtoras de IFN- γ , ao migrar para o sítio de infecção, potencializam a produção de NO por fagócitos mononucleares e contribuem para o controle da infecção.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A ativação do inflamassoma de AIM2 por *Leishmania amazonensis* é importante para a resposta do hospedeiro contra este parasito. A ativação deste sensor de DNA, em macrófagos, leva a expressão da enzima NOS2 e da produção de óxido nítrico, os quais podem estar sendo induzidos pela sinalização de IL-1 α pelo IL-1R. Adicionalmente, demonstramos que AIM2 contribui para a resposta *in vivo* contra *L. amazonensis*, por meio do desenvolvimento da resposta imune adaptativa Th1, a qual é crucial para o controle do parasito no sítio de infecção. Além disso, é sugerido que os mecanismos pelos quais AIM2 induz esta resposta seriam por meio da ativação de células dendríticas, via IL-1 β e IL-1 α . Estas citocinas, sinalizando via IL-1R, aumentariam a expressão de CD86 e CD40, assim como a secreção de IL-12 e determinariam a diferenciação de linfócitos T-*naive* em Th1 durante a resposta contra *L. amazonensis*.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Abdul-Sater, A.A., N. Saïd-Sadier, D.M. Ojcius, Ö. Yilmaz, and K.A. Kelly. 2009. Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. *Drugs of Today*.

Abou Fakher, F.H., N. Rachinel, M. Klimczak, J. Louis, and N. Doyen. 2009. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J. Immunol.* 182:1386–96.

Afonina, I.S., G.A. Tynan, S.E. Logue, S.P. Cullen, M. Bots, A.U. Lüthi, E.P. Reeves, N.G. McElvaney, J.P. Medema, E.C. Lavelle, and S.J. Martin. 2011. Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1a *Mol. Cell.* 44:265–278.

Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4:499–511.

Akira, S., and S. Uematsu. 2007. Toll-like receptors (TLRs) and Their Ligands. *Toll-Like Recept. Innate Immun.* 6–8.

Alvar, J., I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and M. de Boer. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 7.

Ambit, A., K.L. Woods, B. Cull, G.H. Coombs, and J.C. Mottram. 2011. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. *Eukaryot. Cell.* 10:1429–38.

Atayde, V.D., H. Aslan, S. Townsend, K. Hassani, S. Kamhawi, and M. Olivier. 2015. Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. *Cell Rep.* 13:957–967.

Atayde, V.D., K. Hassani, A. da Silva Lira Filho, A.R. Borges, A. Adhikari, C. Martel, and M. Olivier. 2016. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell. Immunol.* 309:7–18.

Van Avondt, K., N.M. van Sorge, and L. Meyaard. 2015. Bacterial Immune Evasion through Manipulation of Host Inhibitory Immune Signaling. *PLoS Pathog.* 11:1–8.

Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Brière, J.P. Galizzi, C. van Kooten, Y.J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12:881–922.

Barry, K.C., M.F. Fontana, J.L. Portman, A.S. Dugan, and R.E. Vance. 2013. IL-1 α signaling initiates the inflammatory response to virulent *Legionella pneumophila* in vivo. *J. Immunol.* 190:6329–39.

Belkaid, Y., C. a Piccirillo, and S. Mendez. 2002. CD4+ CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 420:633–637.

Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:99–109.

Blasius, A.L., and B. Beutler. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity.* 32:305–15.

Bogdan, C., H. Moll, W. Solbach, and M. Rölinghoff. 1990. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur. J. Immunol.* 20:1131–5.

Bronner, D.N., B.H. Abuaita, X. Chen, K.A. Fitzgerald, G. Nuñez, Y. He, X.-M. Yin, and M.X.D. O’Riordan. 2015. Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. *Immunity.*

43:451–462.

Broz, P., J. Von Moltke, J.W. Jones, R.E. Vance, and D.M. Monack. 2010. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*. 8:471–483.

Carneiro, P., J. Conceição, M. Macedo, V. Magalhães, E. Carvalho, and O. Bacellar. 2016. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous PubMed Commons. *PLoS One*. 11:1–2.

Carruth, L.M., S. Demczuk, and S.B. Mizel. 1991. Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. *J. Biol. Chem*. 266:12162–7.

Carvalho, E.M., A. Barral, J.M.L. Costa, A. Bittencourt, and P. Marsden. 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 56:315–325.

Chagas, A.C., F. Oliveira, A. Debrabant, J.G. Valenzuela, J.M.C. Ribeiro, and E. Calvo. 2014. Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases *Leishmania* Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits Xlla Contact Activation in Human Plasma. *PLoS Pathog*. 10.

Charmoy, M., S. Brunner-Agten, D. Aebischer, F. Auderset, P. Launois, G. Milon, A.E.I. Proudfoot, and F. Tacchini-Cottier. 2010. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog*.

Chatelain, R., K. Varkila, and R.L. Coffman. 2017. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice . Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : IL-4 INDUCES A Th2 RESPONSE IN *Leishmania major*-

INFECTED MICE '.

Chatila, T., L. Silverman, R. Miller, and R. Geha. 1989. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J. Immunol.* 143:1283–9.

Chopra, R.K., D.C. Powers, W.H. Adler, and J.E. Nagel. 1989. Phorbol myristate acetate and calcium ionophore A23187-stimulated human T cells do not express high-affinity IL-2 receptors. *Immunology.* 66:54–60.

Chu, E., L.J. Rosenwasser, C.A. Dinarello, M. Lareau, and R.S. Geha. 1984. Role of interleukin 1 in antigen-specific T cell proliferation. *J. Immunol.* 132:1311–6.

Cogen, A.L., V. Nizet, and R.L. Gallo. 2008. Skin microbiota: A source of disease or defence? *Br. J. Dermatol.* 158:442–455.

Davis, B.K., H. Wen, and J.P.-Y. Ting. 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 29:707–35.

Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27:305–318.

Dias-Teixeira, K.L., T.C. Calegari-Silva, G.R.R.M. Dos Santos, J.V. Dos Santos, C. Lima, J.M. Medina, B.H. Aktas, and U.G. Lopes. 2016. The integrated endoplasmic reticulum stress response in *Leishmania amazonensis* macrophage infection: The role of X-box binding protein 1 transcription factor. *FASEB J.* 30:1557–1565.

Elliott, E.I., and F.S. Sutterwala. 2015. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol. Rev.* 265:35–52.

Fernández-Figueroa, E.A., C. Rangel-Escareño, V. Espinosa-Mateos, K. Carrillo-Sánchez, N. Salaiza-Suazo, G. Carrada-Figueroa, S. March-Mifsut, and I. Becker. 2012. Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6.

Filipe-Santos, O., P. Pescher, B. Breart, C. Lippuner, T. Aebischer, N.

Glaichenhaus, G.F. Späth, and P. Bousso. 2009. A Dynamic Map of Antigen Recognition by CD4 T Cells at the Site of *Leishmania major* Infection. *Cell Host Microbe*. 6:23–33.

Flajnik, M.F., and M. Kasahara. 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* 11:47–59.

França-Costa, J., J. Van Weyenbergh, V.S. Boaventura, N.F. Luz, H. Malta-Santos, M.C.S. Oliveira, D.C.S. De Campos, A.C. Saldanha, W.L.C. Dos-Santos, P.T. Bozza, M. Barral-Netto, A. Barral, J.M. Costa, and V.M. Borges. 2015. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 211:426–435.

Gantt, K.R., T.L. Goldman, M.L. McCormick, M. a Miller, S.M. Jeronimo, E.T. Nascimento, B.E. Britigan, and M.E. Wilson. 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* 167:893–901.

Goncalves, R., X. Zhang, H. Cohen, A. Debrabant, and D.M. Mosser. 2011. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J. Exp. Med.* 208:1253–1265.

Gostner, J.M., K. Becker, D. Fuchs, and R. Sucher. 2013. Redox regulation of the immune response. *Redox Rep.* 18:88–94.

Gowans, J.L., and J.W. Uhr. 1966. The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat. *J. Exp. Med.* 124:1017–30.

Green, S.J., R.M. Crawford, J.T. Hockmeyer, M.S. Meltzer, and C.A. Nacy. 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 145:4290–7.

Greenwald, R.J., A.J. McAdam, D. Van der Woude, A.R. Satoskar, and A.H. Sharpe. 2002. Cutting edge: inducible costimulator protein regulates both Th1 and Th2 responses to cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 168:991–5.

Grootjans, J., A. Kaser, R.J. Kaufman, and R.S. Blumberg. 2016. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 16:469–484.

Groß, O., A.S. Yazdi, C.J. Thomas, M. Masin, L.X. Heinz, G. Guarda, M. Quadroni, S.K. Drexler, and J. Tschopp. 2012. Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 α Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. *Immunity.* 36:388–400.

Guarda, G., and A. So. 2010. Regulation of inflammasome activity. *Immunology.* 130:329–36.

Guerra, C.S., R.M. Macedo Silva, L.O.P. Carvalho, K. da S. Calabrese, P.T. Bozza, and S. Côrte-Real. 2010. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Int. J. Exp. Pathol.* 91:451–459.

Guimarães-Costa, A.B., M.T.C. Nascimento, G.S. Froment, R.P.P. Soares, F.N. Morgado, F. Conceição-Silva, and E.M. Saraiva. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:6748–6753.

Handler, M.Z., P.A. Patel, R. Kapila, Y. Al-Qubati, and R.A. Schwartz. 2015. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 73:911-26–8.

Hawn, T.R., A. Ozinsky, D.M. Underhill, F.S. Buckner, S. Akira, and A. Aderem. 2002. *Leishmania major* activates IL-1 α expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes Infect.* 4:763–771.

Heinzel, F.P., M.D. Sadick, B.J. Holaday, R.L. Coffman, and R.M. Locksley. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 169:59–72..

Heinzel, F.P., D.S. Schoenhaut, R.M. Rerko, L.E. Rosser, and M.K. Gately. 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 177:1505–9.

Held, T.K., X. Weihua, L. Yuan, D. V. Kalvakolanu, and A.S. Cross. 1999. Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infect. Immun.* 67:206–212.

Hellman, P., and H. Eriksson. 2007. Early Activation Markers of Human Peripheral Dendritic Cells. *Hum. Immunol.* 68:324–333.

Heufler, C., F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wyszocka, G. Trinchieri, A. Enk, R.M. Steinman, N. Romani, and G. Schuler. 1996. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.*

Hibino, T., M. Loza-Coll, C. Messier, A.J. Majeske, A.H. Cohen, D.P. Terwilliger, K.M. Buckley, V. Brockton, S. V. Nair, K. Berney, S.D. Fugmann, M.K. Anderson, Z. Pancer, R.A. Cameron, L.C. Smith, and J.P. Rast. 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev. Biol.* 300:349–365.

Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D.R. Caffrey, E. Latz, and K. a. Fitzgerald. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* 458:514–518.

Iezzi, G., a. Frohlich, B. Ernst, F. Ampenberger, S. Saeland, N. Glaichenhaus,

and M. Kopf. 2006. Lymph Node Resident Rather Than Skin-Derived Dendritic Cells Initiate Specific T Cell Responses after *Leishmania major* Infection. *J. Immunol.* 177:1250–1256.

Janeway, C.A. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today.* 13:11–6.

Jang, M.H., N. Sougawa, T. Tanaka, T. Hirata, T. Hiroi, K. Tohya, Z.J. Guo, E. Umemoto, Y. Ebisuno, B.G. Yang, J.Y. Seoh, M. Lipp, H. Kiyono, and M. Miyasaka. 2006. CCR7 is critically important in intestinal lamina propria for migration of dendritic cells to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 176:803–810.

Jin, T., A. Perry, P. Smith, J. Jiang, and T.S. Xiao. 2013. Structure of the absent in melanoma 2 (AIM2) pyrin domain provides insights into the mechanisms of AIM2 autoinhibition and inflammasome assembly. *J. Biol. Chem.* 288:13225–35.

Kalantari, P., R.B. DeOliveira, J. Chan, Y. Corbett, V. Rathinam, A. Stutz, E. Latz, R.T. Gazzinelli, D.T. Golenbock, and K.A. Fitzgerald. 2014. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during Malaria. *Cell Rep.* 6:196–210.

Kane, M., and D. Mosser. 2001. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *J. Immunol.* 166:1141–1147.

Kapitonov, V. V, and E. V Koonin. 2015. Evolution of the RAG1-RAG2 locus: both proteins came from the same transposon. *Biol. Direct.* 10:20.

Kawai, T., and S. Akira. 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143:1–20.

Kawasaki, T., and T. Kawai. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5:1–8.

Kaye, P., and P. Scott. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen

interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:604–15.

Kufer, T.A., Jö.H. Fritz, S. Benko, L.H. Travassos, D.J. Philpott, and L.A.M. Carneiro. 2009. NLRs: Nucleotide-Binding Domain and Leucine-Rich-Repeat-Containing Proteins. *EcoSal Plus.* 3.

Kugelberg, E. 2016. Immune memory: Lingering human T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 16:73–73.

Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30:16–34.

Lamkanfi, M., and V.M. Dixit. 2014. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 157:1013–1022.

Lee, C.C., A.M. Avalos, and H.L. Ploegh. 2012. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat. Rev. Immunol.* 12:168–179.

León, B., M. López-Bravo, and C. Ardavín. 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity.* 26:519–31.

Levinsohn, J.L., Z.L. Newman, K.A. Hellmich, R. Fattah, M.A. Getz, S. Liu, I. Sastalla, S.H. Leppla, and M. Moayeri. 2012. Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. *PLoS Pathog.* 8.

Levy, M., C.A. Thaiss, D. Zeevi, L. Dohnalová, G. Zilberman-Schapira, J.A. Mahdi, E. David, A. Savidor, T. Korem, Y. Herzig, M. Pevsner-Fischer, H. Shapiro, A. Christ, A. Harmelin, Z. Halpern, E. Latz, R.A. Flavell, I. Amit, E. Segal, and E. Elinav. 2015. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell.* 163:1428–43.

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.* 37:3424–

3434.

Lima-Junior, D.S., D.L. Costa, V. Carregaro, L.D. Cunha, A.L.N. Silva, T.W.P. Mineo, F.R.S. Gutierrez, M. Bellio, K.R. Bortoluci, R. a Flavell, M.T. Bozza, J.S. Silva, and D.S. Zamboni. 2013. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat. Med.* 19:909–15.

Linsley, P.S., J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. Ledbetter, and R. Peach. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*. 1:793–801.

Littauer, A., and H. de Groot. 1992. Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria. *Am J Physiol*. 262:G1015-20.

Liu, Y., G. Fiskum, and D. Schubert. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*. 80:780–787.

Luft, T., M. Jefford, P. Luetjens, H. Hochrein, K.-A. Masterman, C. Maliszewski, K. Shortman, J. Cebon, and E. Maraskovsky. 2002. IL-1 Enhances CD40 Ligand-Mediated Cytokine Secretion by Human Dendritic Cells (DC): A Mechanism for T Cell-Independent DC Activation. *J. Immunol*. 168:713–722.

Luheshi, N.M., N.J. Rothwell, and D. Brough. 2009. Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: Implications for anti-interleukin-1 therapy. *Br. J. Pharmacol*. 157:1318–1329.

Man, S.M., R. Karki, and T.-D. Kanneganti. 2016. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur. J. Immunol*. 46:269–80.

Man, S.M., R. Karki, R.K.S. Malireddi, G. Neale, P. Vogel, M. Yamamoto, M. Lamkanfi, and T. Kanneganti. 2015. The transcription factor IRF1 and guanylate-

binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by *Francisella* infection. *Nat. Immunol.* 16:1–11.

Marsden, P.D., H.A. Lessa, M.R.F. Oliveira, G.A. Sierra Romero, J.G. Marotti, R.N.R. Sampaio, A. Barral, E.M. Carvalho, C.C. Cuba, A. V. Magalhães, and V.O. Macêdo. 1998. Clinical observations of unresponsive mucosal leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:543–545.

McConville, M.J., S.J. Turco, M.A.J. Ferguson, and D.L.J. Sacks. 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* 8:396.

McMahon-Pratt, D., and J. Alexander. 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol. Rev.* 201:206–224.

Meunier, E., P. Wallet, R.F. Dreier, S. Costanzo, L. Anton, S. Rühl, S. Dussurgey, M.S. Dick, A. Kistner, M. Rigard, D. Degrandi, K. Pfeffer, M. Yamamoto, T. Henry, and P. Broz. 2015. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nat. Immunol.* 16:476–84.

Moreira, R.B., C. Pirmez, M.P. De Oliveira-Neto, L. De Souza Aguiar, A.J. Da Silva Gonçalves, L.O.R. Pereira, L. Abreu, and M.P. De Oliveira. 2017. AIM2 inflammasome is associated to disease severity in tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) braziliensis*. *Parasite Immunol.* 38:42–49.

Mullen, A.C., F.A. High, A.S. Hutchins, H.W. Lee, A. V Villarino, D.M. Livingston, A.L. Kung, N. Cereb, T.P. Yao, S.Y. Yang, and S.L. Reiner. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science.* 292:1907–10.

Müller, A.J., O. Filipe-Santos, G. Eberl, T. Aebischer, G.F. Späth, and P. Bousso. 2012. CD4 + T Cells Rely on a Cytokine Gradient to Control Intracellular Pathogens

beyond Sites of Antigen Presentation. *Immunity*. 37:147–157.

Muñoz-Planillo, R., P. Kuffa, G. Martínez-Colón, B.L. Smith, T.M. Rajendiran, and G. Núñez. 2013. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 38:1142–53.

Muraille, E., C. De Trez, M. Brait, P. De Baetselier, O. Leo, Y. Carlier, C. De Trez, M. Brait, P. De, O. Leo, and Y. Carlier. 2003. Genetically Resistant Mice Lacking MyD88-Adapter Protein Display a High Susceptibility to *Leishmania major* Infection Associated with a Polarized Th2 Response. *J. Immunol.* 170:4237–4241.

Nakahira, K., J.A. Haspel, V.A.K. Rathinam, S.-J. Lee, T. Dolinay, H.C. Lam, J.A. Englert, M. Rabinovitch, M. Cernadas, H.P. Kim, K.A. Fitzgerald, S.W. Ryter, and A.M.K. Choi. 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 12:222–30.

Novais, F.O., B.T. Nguyen, D.P. Beiting, L.P. Carvalho, N.D. Glennie, S. Passos, E.M. Carvalho, and P. Scott. 2014. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J. Infect. Dis.* 209:1288–1296.

Olekhnovitch, R., B. Ryffel, A.J. Müller, and P. Bousso. 2014. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania infection*. *J. Clin. Invest.* 124:1711–22.

Osanya, A., E.H. Song, K. Metz, R.M. Shimak, P.M. Boggiatto, E. Huffman, C. Johnson, J.M. Hostetter, N.L.B. Pohl, and C.A. Petersen. 2011. Pathogen-derived oligosaccharides improve innate immune response to intracellular parasite infection. *Am. J. Pathol.* 179:1329–1337.

Pédron, T., and P. Sansonetti. 2008. Commensals, Bacterial Pathogens and

Intestinal Inflammation: An Intriguing Ménage à Trois. *Cell Host Microbe*. 3:344–347.

Peters, N.C., J.G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M.P. Fay, R.N. Germain, and D. Sacks. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 321:970–4.

Peters, N.C., A.J. Pagán, P.G. Lawyer, T.W. Hand, E. Henriquez-Romero, L.W. Stamper, A. Romano, and D.L. Sacks. 2014. Chronic parasitic infection maintains high frequencies of short-lived Ly6C⁺CD4⁺ effector T cells that are required for protection against re-infection. *PLoS Pathog*. 10:e1004538.

Petritis, P.M., D. Manzon-de-Almeida, C. Gimblet, C. Gonzalez Lombana, and P. Scott. 2012. *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 6:e1858.

Qadumi, M., and I. Becker. 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect. Dis*. 70:4638–4642.

Qi, Q., Y. Liu, Y. Cheng, J. Glanville, D. Zhang, J.-Y. Lee, R. A. Olshen, C.M. Weyand, S.D. Boyd, and J.J. Goronzy. 2014. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 111:13139–44.

Quintáns, J., and I. Lefkovits. 1974. Clonal expansion of lipopolysaccharide-stimulated B lymphocytes. *J. Immunol*. 113:1373–6.

Rath, D., L. Amlinger, A. Rath, and M. Lundgren. 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 117:119–128.

Real, F., and R.A. Mortara. 2012. The diverse and dynamic nature of leishmania parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl. Trop. Dis*.

6.

Ribeiro-Gomes, F.L., N.C. Peters, A. Debrabant, and D.L. Sacks. 2012. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog.* 8.

Ribeiro, J.M.C., and I.M.B. Francischetti. 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48:73–88.

Ringwald, P., F. Peyron, J.P. Lepers, P. Rabarison, C. Rakotomalala, M. Razanamparany, M. Rabodonirina, J. Roux, and J. Le Bras. 1993. Parasite virulence factors during falciparum malaria: Rosetting, cytoadherence, and modulation of cytoadherence by cytokines. *Infect. Immun.* 61:5198–5204.

Rocha, F.J.S., U. Schleicher, J. Mattner, G. Alber, and C. Bogdan. 2007. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect. Immun.* 75:3823–3832.

Sacks, D.L. 2001. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell. Microbiol.* 3:189–196.

Sadick, M.D., F.P. Heinzel, B.J. Holaday, R.T. Pu, R.S. Dawkins, and R.M. Locksley. 1990. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J. Exp. Med.* 171:115–27.

Sato, N., S.K. Ahuja, M. Quinones, V. KostECKi, R.L. Reddick, P.C. Melby, W. a Kuziel, and S.S. Ahuja. 2000. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokin. *J. Exp. Med.* 192:205–218.

Savina, A., and S. Amigorena. 2007. Phagocytosis and antigen presentation in

dendritic cells. *Immunol. Rev.* 219:143–156.

Schatz, D.G. 1999. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and the evolution of the adaptive immune system. *Immunol. Res.* 19:169–82.

Scott, P., P. Natovitz, R.L. Coffman, E. Pearce, and A. Sher. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.* 168:1675–84.

Scott, P., and F.O. Novais. 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 16:581–592.

Shaw, M.H., T. Reimer, Y.-G. Kim, and G. Nuñez. 2008. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr. Opin. Immunol.* 20:377–82.

Shweash, M., H. Adrienne McGachy, J. Schroeder, T. Neamatallah, C.E. Bryant, O. Millington, J.C. Mottram, J. Alexander, and R. Plevin. 2011. *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Mol. Immunol.* 48:1800–1808.

Silverman, J.M., J. Clos, C.C. de'Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L.J. Foster, and N.E. Reiner. 2010. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci.* 123:842–852.

Soong, L. 2008. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J. Immunol.* 180:4355–60.

von Stebut, E., Y. Belkaid, T. Jakob, D.L. Sacks, and M.C. Udey. 1998. Uptake of *Leishmania* major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J. Exp. Med.* 188:1547–52.

Sypek, J.P., C.L. Chung, S.E. Mayor, J.M. Subramanyam, S.J. Goldman, D.S. Sieburth, S.F. Wolf, and R.G. Schaub. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* 177:1797–802.

Tacchini-Cottier, F., C. Zweifel, Y. Belkaid, C. Mukankundiye, M. Vasei, P. Launois, G. Milon, and J.A. Louis. 2000. An Immunomodulatory Function for Neutrophils During the Induction of a CD4+ Th2 Response in BALB/c Mice Infected with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 165:2628–2636.

Titus, R.G., and J.M. Ribeiro. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*. 239:1306–1308.

Todd, D.J., A.H. Lee, and L.H. Glimcher. 2008. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat.Rev.Immunol.* 8:663–674.

De Trez, C., S. Magesz, S. Akira, B. Ryffel, Y. Carlier, and E. Muraille. 2009. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog.* 5.

Turk, J.L., and A.D. Bryceson. 1971. Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv.Immunol.* 13:209–266.

Uzonna, J.E., K.L. Joyce, and P. Scott. 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 199:1559–66.

Vance, R.E., R.R. Isberg, and D.A. Portnoy. 2010. Pathogenic Microbes By the Innate Immune System. *Cell.* 6:10–21..

Vargas-Inchaustegui, D.A., W. Tai, L. Xin, A.E. Hogg, D.B. Corry, and L. Soong. 2009. Distinct roles for MyD88 and toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect. Immun.* 77:2948–2956.

Voronov, E., S. Dotan, L. Gayvoronsky, R.M. White, I. Cohen, Y. Krelin, F. Benchetrit, M. Elkabets, M. Huszar, J. El-On, and R.N. Apte. 2010. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int. Immunol.* 22:245–57.

Wei, X.Q., I.G. Charles, A. Smith, J. Ure, G.J. Feng, F.P. Huang, D. Xu, W. Muller, S. Moncada, and F.Y. Liew. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 375:408–411.

Wesa, A.K., and A. Galy. 2001. IL-1 beta induces dendritic cells to produce IL-12. *Int. Immunol.* 13:1053–1061.

West, a P., A.A. Koblansky, and S. Ghosh. 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:409–37.

van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach, and T. Laskay. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.* 173:6521–6525.

Zhong, B., P. Tien, and H.-B. Shu. 2006. Innate immune responses: crosstalk of signaling and regulation of gene transcription. *Virology.* 352:14–21.

Zipfel, C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35:345–351.