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

**Caracterização da sinalização via IL-1R durante a
infecção experimental por *Leishmania infantum***

Pedro Alexandre Sampaio Oliveira

Ribeirão Preto - SP

2016

PEDRO ALEXANDRE SAMPAIO OLIVEIRA

**Caracterização da sinalização via IL-1R durante a infecção
experimental por *Leishmania infantum***

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

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Carregaro
Pereira

Ribeirão Preto - SP

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Pedro Alexandre Sampaio

Caracterização da sinalização via IL-1R durante a infecção
experimental por *Leishmania infantum*.

Ribeirão Preto, 2016. 87p.; Il.; 30cm

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

Orientador(a): Pereira, Vanessa Carregaro.

1. Leishmaniose visceral. 2. IL-1R. 3. Linfócitos T *helpers*. 4.
Recrutamento de neutrófilos.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Bioquímica
e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, com auxílio Financeiro da Capes/INCTV, CNPQ e FAPESP

Pedro Alexandre Sampaio Oliveira

**Caracterização da sinalização via IL-1R durante a infecção
experimental por *Leishmania infantum***

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^a. Vanessa Carregaro Pereira
FMRP – USP

Prof^ª. Dr^a. Isabel Kinney Ferreira Miranda Santos
FMRP – USP

Prof. Dr. Roque Pacheco
UFS

“O conhecimento nos faz responsáveis”.
(Che Guevara)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por seu amor e bondade, devo tudo a ti.

A minha orientadora **Profª Drª. Vanessa Carregaro** pela excelente oportunidade e confiança depositada em mim no desenvolvimento desse projeto; e ao **Prof Dr. João Santana** pela disponibilidade em permitir o desenvolvimento desse trabalho em seu laboratório.

Aos meus pais, **Francisco Sampaio** e **Leuzimar Martins**, por todo amor, dedicação e esforço na minha formação profissional e pessoal, vocês são a prova de que Deus é infinitamente bom.

Ao meu irmão **Isaac Afonso** e minha avó **Guiomar Martins** por todo apoio e força.

As famílias, **Sampaio Freire** e **Martins Oliveira**, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse objetivo.

A minha companheira de casa e amiga **Karen Bandeira** por todo cuidado para com a minha vida, por ter acreditado em mim mesmo quando eu não podia e estar ao meu lado nos dias bons e ruins, a sua amizade é essencial na minha vida.

A todos os membros do **Laboratório de Imunoparasitologia** pela ajuda, discussão e momentos de descontração, vocês foram determinantes para a minha formação, meu muito obrigado.

Em especial aos amigos do **Grupo da Leishmania** que estiveram presentes em todo o desenvolvimento desse trabalho, sendo eles: **Jéssica** (você me ensinou a maioria de tudo que hoje eu sei, serei eternamente grato), **Ítala** (obrigado por ter acreditado em mim desde o primeiro dia, por me mostrar que eu era capaz e por toda ajuda direta na execução desse trabalho, a nossa amizade vai muito além da bancada), **Laís** (por toda ajuda e discussão nesse trabalho, por compartilhar comigo a essência do pesquisador, o encantamento no descobrimento), **Mikhael** (pelas discussões que me auxiliaram no meu

crescimento), **Gabriela/Ricardo/Alynne** (meu muito obrigado pelas discussões e amizade de vocês).

Aos meus caros amigos da pós-graduação, vocês foram o meu sustento nos dias difíceis e contribuíram diretamente para o meu crescimento pessoal e profissional, a vocês a minha eterna amizade e gratidão, são eles: **Josiane, Ítala, Naira, Bruna, Rafaela, Leandro, Amanda, Luna, Rômulo, Luiz, Jeferson, Davi e Guilherme.**

Aos meus **irmãos do MUR** (Ministério Univerisidades Renovadas) que foram a minha família em Ribeirão, eu sempre estarei ligado a vocês e os levo sempre no meu coração, em especial: **Aline, Letícia, Douglas, Raony, Pamela, Michele, Ivanka, João e Raul.**

Aos professores que compõem a banca, **Dr^a. Isabel Miranda e Dr. Roque Pacheco**, pela disponibilidade e atenção.

A **Prof^a Dr^a. Yara Maria** e ao **Dr. Micássio Andrade** pela contribuição nos experimentos *in vitro*.

Aos funcionários da FMRP-USP pela ajuda direta no desenvolvimento desse trabalho, são eles: **Rubilan, Edir, Denner, Júlio, Wander, Mara, Dorley, Beto, Vera, Cristiane, Denise e Ana Cristina.**

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELA.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 As Leishmanioses	22
1.2 Relação Parasito x Hospedeiro	25
1.3 IL-1 e as Leishmanioses	29
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 METODOLOGIA.....	35
3.1 Animais	36
3.2 Parasitos e Infecção Experimental	36
3.3 Análise da Carga Parasitária dos Animais Infectados	36
3.4 Obtenção de Células do Baço	37
3.5 Fenotipagem de Leucócitos e Determinação do Padrão de Citocinas do Baço	37
3.6 Dosagem de Citocinas por ELISA	38
3.7 Diferenciação de Macrófagos a Partir de Precursores de Medula Óssea.....	39
3.8 Infecção de Macrófagos <i>in vitro</i>	39
3.9 Dosagem de Óxido Nítrico por Macrófagos Infectados	40
3.10 Extração de RNA e Confeção de DNA Complementar (cDNA)	40
3.11 PCR em Tempo Real	41
3.12 Bloqueio com Anti-IL-1 α <i>in vivo</i>	42
3.13 Isolamento de Neutrófilos da Medula Óssea	43
3.14 Cultura <i>in vitro</i> de Neutrófilos e Dosagem de ROS por Quimioluminescência ..	43
3.15 Análise Estatística.....	44
4 RESULTADOS	45

4.1 A infecção por <i>L. infantum</i> induz a expressão e produção de IL-1	46
4.2 Sinalização da via IL-1R é requerida para suscetibilidade durante a infecção por <i>L. infantum</i>	46
4.3 IL-1R regula negativamente a produção de citocinas inflamatórias no fígado durante a infecção por <i>L. infantum</i>	48
4.4 IL-1R regula negativamente a produção de IFN- γ e IL-17 por células T CD4 ⁺ durante a infecção por <i>L. infantum</i>	49
4.5 IL-1 α , mas não Caspase 1/11, contribui para suscetibilidade durante a infecção por <i>L. infantum</i>	52
4.6 IL-1 α regula negativamente os perfis de resposta do tipo Th1, Th17 e CD8 ⁺ produtora de IFN- γ ⁺	53
4.7 O bloqueio de IL-1 α <i>in vivo</i> confere resistência durante a infecção por <i>L. infantum</i>	55
4.8 IL-1R regula negativamente a migração de neutrófilos no baço durante a LV de maneira dependente de Cxcl1	57
4.9 A ausência de IL-1R não altera no perfil de ativação de neutrófilos.....	59
4.10 IL-1 α possui papel regulador sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos.....	62
4.11 IL-1R regula a produção de IL-10 na infecção por <i>L. infantum</i>	63
 5 DISCUSSÃO	66
 6 CONCLUSÃO.....	76
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A via de sinalização mediada por IL-1R confere suscetibilidade na infecção por <i>L. infantum</i>	47
Figura 2. A via IL-1R regula negativamente a produção de citocinas inflamatórias no fígado durante a infecção por <i>L. infantum</i>	49
Figura 3. IL-1R regula negativamente a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ durante a infecção por <i>L. infantum</i>	50
Figura 4. IL-1R regula negativamente a produção de IL-17 por linfócitos T CD4 ⁺ durante a infecção por <i>L. infantum</i>	51
Figura 5. IL-1 α contribui para suscetibilidade no curso da infecção por <i>Leishmania infantum</i>	53
Figura 6. IL-1 α regula negativamente os perfis de resposta do tipo Th1, Th17 e CD8 ⁺ produtora de IFN- γ no baço	54
Figura 7. O bloqueio de IL-1 α <i>in vivo</i> confere resistência a animais WT durante a infecção por <i>L. infantum</i>	56
Figura 8. Sinalização via IL-1R regula negativamente a migração de neutrófilos durante a infecção por <i>L. infantum</i>	58
Figura 9. Migração de neutrófilos é regula por IL-1R de maneira dependente de Cxcl1 na infecção por <i>L. infantum</i>	59
Figura 10. A ausência de sinalização via IL-1R não altera no perfil de ativação de neutrófilos.....	61
Figura 11. IL-1 α regula negativamente a produção de óxido nítrico por macrófagos <i>in vitro</i>	62

Figura 12. Papel regulador de IL-1R é dependente de IL-10 e independente de células T reguladoras	64
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC - *Adaptor protein Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*

AP1- *Activator protein 1*

BSA – Albumina sérica bovina

CCR2 – Receptor de quimiocina C-C do tipo 2

cDNA - DNA complementar

Células NK - Células *Natural Killer*

CXCL - *Chemokine (C-X-C motif) ligand*

CXCR - Receptor de quimiocina CXC

DC - Célula dendrítica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FoxP3 – *Forkhead Box P3*

GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

h- hora

HIV- Human immunodeficiency vírus

IFN- γ - Interferon gama

IL – Interleucina

IL-1 α – Interleucina 1 alfa

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-1R – *Interleukin-1 receptor*

IL-1Ra - *Interleukin-1 receptor antagonist*

IL-1RacP - *Interleukin-1 receptor accessory protein*

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

iv - Intravenoso

KC – *Keratinocyte-derived cytokine*

KO - *Knockout*

LC – Leishmaniose cutânea

LM – Leishmaniose mucocutânea

LPS – Lipopolissacarídeo

LV – leishmaniose visceral

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*

MHCII – Complexo principal de histocompatibilidade

MIP - Macrophage inflammatory protein

MIP-2 - *Macrophage inflammatory protein-2*

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NLRP3 - *PYD domains-containing protein 3*

NF-κB - Fator nuclear κB

NI – Não infectado

NLR – *NOD-like receptors*

NO – Óxido nítrico

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PMA – *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

RNA - Ácido ribonucleico

Spi – Semanas pós-infecção

TGF-β – Fator de transformação de crescimento beta

Th – Célula T *helper*

TIR - *Toll-like and IL-1 receptor*

TIRAP - *TIR-containing adaptor protein*

TLR - *Toll-like Receptors*

TPMD - *2,6,10,14 tetramethylpentadecane*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

T regs – Células T reguladoras

Who – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

WT - *wild type*

β 2M - *Beta-2 microglobulin*

RESUMO

As leishmanioses constituem um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, as quais incluem diversas espécies responsáveis por desencadear formas clínicas distintas. A espécie *Leishmania infantum*, disseminada no Brasil e na América do Sul, está relacionada com comprometimento das vísceras, principalmente baço, fígado e medula óssea, apresentando alto índice de morbidade e mortalidade. É classicamente demonstrado que uma resposta mediada por linfócitos Th1 e Th17 conferem resistência na LV. Nesse sentido, as vias de sinalização ativadas, bem como os mediadores gerados durante a infecção, podem auxiliar no desenvolvimento da resposta imune protetora. Dentre as citocinas produzidas, destaca-se a IL-1 (IL-1 α e IL-1 β) que possui papel importante na geração do processo inflamatório conferindo resistência às infecções fúngicas, bacterianas, e também na leishmaniose cutânea. No presente estudo, nosso objetivo foi determinar o papel da via de sinalização mediada por IL-1R durante a infecção experimental por *Leishmania infantum*. Nossos resultados demonstram que tanto IL-1 α quanto IL-1 β são produzidas durante a infecção *in vivo* por *L. infantum*, sugerindo sua participação na LV. De maneira interessante, a via de sinalização mediada por IL-1R parece estar envolvida na susceptibilidade ao protozoário, visto que animais geneticamente deficientes para IL-1R (IL-1R KO) são mais resistentes à infecção, apresentando menor número de parasitos no baço e fígado nas fases crônicas de infecção. Ainda, o fenômeno de susceptibilidade foi associado a uma regulação negativa da resposta inflamatória, principalmente acerca de células Th1 e também de Th17. A inflamação neutrofílica também foi alterada em animais IL-1R KO infectados. Foi observado aumento do número de neutrófilos bem como da produção de CXCL1 (KC), mediador quimioatraente para neutrófilos no baço de animais IL-1R KO,

mas sem alterar o perfil de ativação dessas células. Ao determinar a citocina envolvida na regulação do processo inflamatório e consequentemente na susceptibilidade ao parasito, observamos que preferencialmente a IL-1 α possui papel na progressão da doença, visto que a deleção gênica de enzimas essenciais para a liberação de IL-1 β como Caspase 1/11 não alterou o número de parasitos no baço e fígado. Porém, na ausência de IL-1 α foi observado um perfil de resistência associado ao aumento dos níveis de IFN- γ e IL-17 nos órgãos alvos da doença. Confirmando o papel regulador, o tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL1 α em animais selvagens (do inglês *wild type* - WT) infectados reverteu o fenótipo de susceptibilidade e aumentou a resposta imune adaptativa na LV. Ao determinar o papel de IL-1 α , macrófagos IL-1 α KO diferenciados a partir de precursores de medula óssea, quando infectados com *L. infantum*, apresentaram concentrações elevadas de óxido nítrico no sobrenadante da cultura, quando comparados aos macrófagos IL-1R KO ou WT, confirmando um papel regulador da resposta imune efetora à infecção por *L. infantum*. Os efeitos reguladores de IL-1 α parecem ser mediados por IL-10, visto que animais IL-1R KO possuem redução significativa dessa citocina mensurada no fígado durante a 6ª semana de infecção. Em conjunto, no presente trabalho demonstramos que a sinalização via IL-1R, com prevalência da IL-1 α , regula negativamente a resposta imune efetora do perfil Th1 e Th17. Consequentemente, há o comprometimento da migração de neutrófilos para o sítio de infecção e ativação de macrófagos permitindo o escape do parasito e estabelecimento da infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, sinalização via IL-1R, recrutamento de neutrófilos, linfócitos T *helpers*.

ABSTRACT

The leishmaniasis are a set of diseases caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, which will lead to different clinical outcomes depending on the specific species infecting the patient. The species *Leishmania infantum*, already spread throughout Brazil and South America, is associated to visceral damage, mainly to the spleen, kidney and bone marrow, presenting high rates of morbidity and mortality. It is classically demonstrated that a response mediated by Th1 and Th17 lymphocytes promotes resistance to VL. Thus, the activated signaling pathways, as well as mediators generated during the infection, can assist in the development of a protective immune response. Among the expressed cytokines, the IL-1 (IL-1 α e IL-1 β) stands out for its important role in the inflammatory process and resistance to fungi and bacterial infections, and also in cutaneous leishmaniasis. In the present study, our aim was to determine the signaling role via IL-1R during experimental infection by *L. infantum*. Our results show IL-1 α and IL-1 β are produced *in vivo* infection by *L. infantum*, suggesting your participation in VL. Interestingly, the signaling pathway mediated by IL-1R appears to be involved in susceptibility to protozoal, since the animals genetically deficient for IL-1R (IL-1R KO) are more resistant to infection, presenting fewer parasites in the spleen and liver in chronic stages of infection. Additionally, the susceptibility phenomenon was associated with downregulation of the inflammatory response, mainly on Th1 cells and Th17. The neutrophilic inflammation has also been changed in IL-1R KO infected animals. Was observed an increase in neutrophils and production of CXCL1 (KC) in the spleen of IL-1R KO animals, but without changing the activation profile of these cells. In determining the regulatory cytokine involved in the inflammatory process and therefore the susceptibility to the parasite, observed that IL-1 α preferably has role in disease

progression, since genic deletion of essential enzymes for IL-1 β secretion (i.e.: Caspase 1/11) did not alter the number of parasites in the spleen and liver. However, in the absence of IL-1 α was observed resistance profile associated with increased IFN- γ and IL-17 in the target organ disease. Confirming the regulatory role, treatment with anti-IL1 α monoclonal antibody in WT mice infected reversed the susceptibility phenotype and increased adaptive immune response in LV. To determine the role of IL-1 α , macrophages from IL-1 α KO differentiated from bone marrow when infected with *L. infantum* showed high concentrations of nitric oxide in the culture supernatant when compared to macrophages from IL-1R KO and WT, confirming a regulatory role of the effector immune response to *L. infantum* infection. IL-1 α regulatory effects appear to be mediated by IL-10, since IL-1R knockout animals have significant reduction of this cytokine measured in the liver during the 6th week of infection. Taken together, the present study demonstrated that IL-1R signaling pathway, with prevalence of IL-1 α , negatively regulates effector immune response of Th1 and Th17 profile. Consequently, the impairment of neutrophil migration to the site of infection and activation of macrophages allowing the escape of the parasite and the establishment of infection.

Keywords: Visceral leishmaniasis, signaling via IL-1R, neutrophil recruitment, T *helpers* lymphocytes.

Introdução

1.1) As Leishmanioses

As leishmanioses constituem um complexo de doenças negligenciadas de amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde a forma visceral à tegumentar (cutânea e mucocutânea), e estão entre as seis endemias de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde, devido ao seu caráter endêmico principalmente em áreas tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e Europa. Estima-se que 310 milhões de pessoas em aproximadamente 102 países residem em regiões de risco para contrair uma das formas de leishmaniose e que cerca de 1,5 milhões de novos casos ocorram anualmente (nos quais aproximadamente 1-1,2 milhões de casos são de leishmaniose cutânea-LC e 300.000 de leishmaniose visceral-LV) (CONTROL OF THE LEISHMANIASES Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 Introduction, 2010) (WHO, 2016 <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>). Dentre as leishmanioses, a leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 65 países, sendo 90% dos casos concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão do Sul, Sudão e Brasil (Desjeux, 2004).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários unicelulares pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e família *Tripanossomatidae* (Lainson, Shaw *et al.*, 1987), e apresentam ciclo biológico heteroxênico, alternando-se entre o hospedeiro invertebrado e o vertebrado. Esse processo ocorre através do repasto sanguíneo realizado pelo mosquito do gênero *Phlebotomus* no velho mundo (Europa, Ásia e África) e pelo *Lutzomyia* no novo mundo (Américas) (Killick-Kendrick, 1999). Já os hospedeiros vertebrados são diversos, desde canídeos, roedores, hiracóides a primatas, incluindo o humano (Shaw, Langton *et al.*, 2009) (Ashford, 1996).

As *Leishmanias* possuem duas formas morfológicas distintas, variando de acordo com o hospedeiro. As promastigotas, que possuem flagelo livre, importante para conferir motilidade ao parasito, sendo esta encontrada no ambiente extracelular; e as amastigotas, que são ovóides, ausentes em flagelo, altamente replicativas e dependentes do meio intracelular (Hommel, 1999). Durante o ciclo biológico, a fêmea do flebótomo realiza o processo de alimentação hematófaga na derme do hospedeiro infectado. Nesse contexto, células mononucleares do sistema fagocítico infectadas com leishmania são ingeridas pelo inseto. Os parasitos se desenvolvem no interior do tubo digestório e migram em direção a porção anterior do estômago. No processo de migração, os protozoários perdem a forma amastigota e se modificam em promastigota, sofrendo posteriormente, intensa multiplicação por divisão binária e forte aderência a parede do intestino do invertebrado. Subsequentemente, os parasitos migram para as glândulas salivares do inseto e estão aptos a disseminar as leishmanias durante um novo processo de repasto sanguíneo (Sacks e Perkins, 1985; Killickendrick, 1990).

As manifestações clínicas das leishmanioses estão estritamente relacionadas com a espécie de *Leishmania* em questão e com a resposta imunológica do hospedeiro, podendo apresentar sintomatologias variadas, desde manifestações de pele ao acometimento das visceras. Assim, as leishmanioses foram classicamente divididas em três subgrupos, sendo eles, leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV) (Kaye e Scott, 2011).

A leishmaniose cutânea (LC) é comumente a forma mais difundida e menos severa entre as leishmanioses. Cerca de 70% dos casos estão restritos em apenas dez países, sendo eles, Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Arábia Saudita e Síria. Segundo a Organização Mundial de Saúde estima-se que por volta de 1,3 milhões de novos casos de LC ocorram anualmente (WHO, 2016)

<http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>). É característico da LC o surgimento de extensivas lesões de pele com fundo granuloso e purulento, as feridas normalmente são indolores e podem se manifestar de forma localizada ou difusa (CONTROL OF THE LEISHMANIASES Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 Introduction, 2010). Espécies como, *Leishmania major* e *Leishmania tropica* são responsáveis pela disseminação de LC no velho mundo, enquanto *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis* são causadoras de LC na América Central e do Sul (Goto e Lauletta Lindoso, 2012).

Já a leishmaniose mucocutânea (LM) é caracterizada pelo surgimento de lesões destrutivas em regiões de mucosa, como em cavidades nasais e orais, e normalmente ocorre após uma aparente resolução em casos de leishmaniose cutânea (Daneshbod, Oryan *et al.*, 2011). Em regiões endêmicas para leishmaniose cutânea cerca de 2 a 5% dos pacientes desenvolvem LM podendo chegar a 20% em algumas regiões da América do Sul (David, Dimier-David *et al.*, 1993). A principal espécie disseminativa de LM é a *Leishmania braziliensis*, mas alguns casos já foram reportados em infecções por *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Strazzulla, Cocuzza *et al.*, 2013).

A leishmaniose visceral (LV) é considerada a forma mais grave dentre as leishmanioses devido ao seu caráter crônico e sistêmico, provocando mais de 20,000 por ano (Alvar, Velez *et al.*, 2012). Estima-se que na ausência de tratamento, a taxa de letalidade em países em desenvolvimento pode ser de até 100 % em 2 anos. O agente etiológico da LV na África Ocidental e Subcontinente Indiano é a *L. donovani*, enquanto que na Europa, Norte da África e América Latina é provocada pela *L. infantum* (Desjeux, 2004). Pacientes acometidos por LV normalmente apresentam sintomas persistentes de infecção sistêmica, incluindo febre, fadiga, anemia com leucopenia,

perda de apetite e perda de peso. Além disso, os parasitos que sobrevivem em células do sistema fagocitário após um processo de extensiva replicação, são responsáveis pelo aumento de órgãos específicos do hospedeiro como fígado, baço e nódulos linfáticos, acarretando na maioria dos casos em esplenomegalia e hepatomegalia grave (Srividya, Kulshrestha *et al.*, 2012). Assim, indivíduos acometidos por LV normalmente se tornam mais propensos a co-infecções virais e bacterianas, uma vez que tecidos importantes para o desenvolvimento de uma resposta imunológica eficiente se encontram comprometidos pela extensiva replicação parasitária.

Por exemplo, é cada vez mais crescente o número de casos de pacientes positivos para LV e coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em algumas regiões da Etiópia a proporção de pacientes coinfectados atingiu 18,5% nos anos de 1998-1999 (Lyons, Veeken *et al.*, 2003). Já nas Américas, o Brasil é o líder entre os países com maior número de casos de co-infecção LV-HIV, entre os anos de 2001 a 2005 mais de 300 ocorrências de co-infecção foram reportadas no país (Alvar, Aparicio *et al.*, 2008).

Por outro lado, de maneira interessante, alguns indivíduos acometidos por LV podem desenvolver um quadro de resistência espontânea à infecção, com a não manifestação de sintomatologia clínica, mas os mecanismos que orquestram essa resposta protetora ainda não estão completamente caracterizados (Badaro, Jones *et al.*, 1986). Nesse contexto, faz-se necessário a caracterização dos mecanismos imunológicos que determinam um padrão de resistência ou suscetibilidade ao hospedeiro, para que futuramente medidas eficazes de intervenção terapêutica sejam implementadas no ambiente de saúde pública.

1.2) Relação Parasito X Hospedeiro

Os mecanismos de resolução perante as infecções pelos protozoários do gênero *Leishmania* não dependem somente da espécie do parasito em questão, mas principalmente da competência imunológica do hospedeiro. Nesse sentido, os padrões que determinam resistência ou suscetibilidade nas leishmanioses foram inicialmente identificados em modelos murinos ao longo das últimas décadas e tem fundamentado até o presente momento às pesquisas atuais (Alexander, Satoskar *et al.*, 1999).

A princípio, em modelos de infecção por *L. major* foi demonstrado que uma apresentação antigênica eficiente, juntamente com coestímulos necessários e a produção de IL-12 por células dendríticas previamente ativadas pelo reconhecimento do parasito, levam em conjunto, à diferenciação de linfócitos T *naïves* para o padrão de resposta Th1 produtores de IFN- γ (Alexander e Bryson, 2005). Juntamente com os linfócitos T CD4⁺, as células natural killer (NK) e os linfócitos T CD8⁺ também são fontes importantes de IFN- γ (Scharton-Kersten, Afonso *et al.*, 1995; Belkaid, Von Stebut *et al.*, 2002). Esta citocina atua nos macrófagos, ativando a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2), com consequente produção de óxido nítrico (NO), que leva à morte dos parasitos fagocitados. Juntamente com o IFN- γ , o TNF- α provindo de macrófagos infectados, também aumenta a expressão de iNOS (Liew, Li *et al.*, 1990; Liew, Millott *et al.*, 1990; Bogdan, Rollinghoff *et al.*, 2000).

Outra citocina importante no controle da infecção por *L. infantum* é a IL-17. Dados publicados recentemente pelo nosso grupo demonstram esse mediador atua de forma sinérgica com o IFN- γ na ativação de macrófagos, promovendo o aumento da produção de óxido nítrico e uma eficiente eliminação do patógeno. Ainda, foi evidenciado que animais geneticamente deficientes para IL-17Ra (receptor de interleucina IL-17A) são altamente suscetíveis à infecção, sugerindo o papel protetor desta citocina (Nascimento, Carregaro *et al.*, 2015). No entanto, a IL-17 parece ter papel

diferente entre as diversas espécies de *Leishmania*, uma vez que animais *knockouts* para IL-17 possuem maior resistência à infecção por *L. major* e *L. donovani* (Lopez Kostka, Dinges *et al.*, 2009; Terrazas, Varikuti *et al.*, 2016).

Em contrapartida, o desenvolvimento da resposta de perfil Th2 durante a infecção por *L. major*, com predominância de altos níveis de IL-4, e ausência de IL-12, confere suscetibilidade à infecção, levando à desativação de respostas protetoras, como a polarização de linfócitos Th1 e ativação de macrófagos, o que promove a replicação e sobrevivência do parasito (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Em modelos de infecção experimental por *L. major* foi demonstrado que animais geneticamente deficientes para IL-4 são resistentes à infecção, confirmando o papel regulador desta citocina (Kopf, Brombacher *et al.*, 1996). Além disto, outras citocinas como IL-13 e IL-10 também estão relacionadas com o padrão de suscetibilidade nesse modelo (Matthews, Emson *et al.*, 2000; Belkaid, Hoffmann *et al.*, 2001).

Em relação aos mecanismos supressores na LV, já é bem caracterizado que a IL-10 possui papel importante na inibição de respostas protetoras. Em trabalho publicado em 2001 foi demonstrado que camundongos geneticamente deficientes para IL-10 são resistentes à infecção por *L. donovani*, visto que esses animais possuem aumento significativo na produção de IFN- γ e óxido nítrico (Murphy, Wille *et al.*, 2001). Na leishmaniose cutânea a IL-10 possui papel similar, uma vez que a presença desse mediador está intimamente associada à progressão da patologia na infecção por *L. major*, atuando como um importante regulador negativo sobre a produção de citocinas protetoras, como IL-12 e TNF- α (Kane e Mosser, 2001).

Uma das principais células produtoras de IL-10 são as T reguladoras (T regs), que desempenham função importante na modulação da resposta imune à *Leishmania*

(Peters e Sacks, 2006). Existe uma forte associação entre a persistência da doença ativa em pacientes acometidos por *L. donovani* e a presença de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β , oriundas de linfócitos T regs (Bhattacharya, Ghosh *et al.*, 2016). Além disso, é demonstrado que durante a infecção por *L. major*, células T CD4⁺ CD25⁺ se acumulam na derme do hospedeiro e possuem função inibidora sobre as respostas efetoras de linfócitos T CD4⁺ CD25⁻ (Belkaid, Piccirillo *et al.*, 2002).

Além da resposta imune adaptativa, tem sido demonstrado a participação de células da imunidade inata nas leishmanioses, nesse sentido, os neutrófilos são os primeiros leucócitos recrutados durante a infecção por *Leishmania* (Carlsen, Liang *et al.*, 2015) e seu papel protetor está intimamente relacionado à sua capacidade de migração para o sítio de infecção em períodos iniciais de infecção (Nauseef, 2007). Assim, dentre as atribuições clássicas dos neutrófilos está a sua capacidade de fagocitar e matar os micro-organismos. Em trabalho publicado recentemente por Carlsen et al., (2015), foi demonstrado que durante a infecção experimental por *L. braziliensis*, os neutrófilos reconhecem o parasito e ativam mecanismos efetores que controlam a replicação parasitária, como a degranulação e a produção de metabólitos de oxigênio (Carlsen, Jie *et al.*, 2015). Investigando o papel dos polimorfonucleares na LV induzida por *L. infantum*, nosso grupo demonstrou que essas células são importantes na resolução da infecção, visto que depleção dos neutrófilos com anticorpos (*Anti-Ly6G*) em animais C57/BL6 promoveu o aumento de parasitos em órgãos-alvo da doença (Sacramento, Trevelin *et al.*, 2015).

Entretanto, alguns estudos sugerem que os neutrófilos conferem suscetibilidade durante a infecção por *L. major* e *L. mexicana*. Em modelos experimentais, a depleção dos polimorfonucleares pela administração de anticorpo anti-Ly6G ou o uso de animais deficientes para essas células (*Genista*), promoveu resistência ao hospedeiro mediada

pelo aumento de resposta de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ (Hurrell, Schuster *et al.*, 2015; Charmoy, Hurrell *et al.*, 2016b). Existem evidências que a *L. major* consegue sobreviver aos mecanismos de morte dos polimorfonucleares e que essas células podem servir como reservatório para replicação e disseminação do patógeno (Laskay, Van Zandbergen *et al.*, 2003).

1.3) IL-1 e as Leishmanioses

Os mediadores gerados durante os processos infecciosos, sejam eles citocinas, enzimas ou moléculas inflamatórias normalmente orquestram um perfil de suscetibilidade ou resistência ao hospedeiro, e é de extrema relevância a caracterização de tais mediadores para o entendimento de patologias como a leishmaniose visceral. Entre as diversas citocinas produzidas, destaca-se a interleucina-1 (IL-1) com papéis pouco descritos quanto à infecção por *L. infantum*.

Com importância singular acerca do processo inflamatório, a IL-1 possui funções amplamente caracterizadas em relação às doenças autoimunes, degenerativas e infecciosas, sobretudo no que se refere à migração e ativação celular (Garlanda, Dinarello *et al.*, 2013). Diversos papéis já foram atribuídos a essa interleucina, como no recrutamento de neutrófilos e macrófagos (Rider, Carmi *et al.*, 2011), polarização e co-estimulação de linfócitos (Sutton, Brereton *et al.*, 2006), indução de defensinas (Pioli, Weaver *et al.*, 2006) e na produção óxido nítrico (Thomas, Darwiche *et al.*, 2002).

A função de IL-1 está intimamente associado à capacidade de ligação das citocinas IL-1 α e IL-1 β ao receptor de membrana, o IL-1R1 (IL-1R), o qual é distribuído em diversos tecidos, como pulmão, fígado, rim e baço. De forma geral, após a interação do receptor com os ligantes, a sinalização segue via recrutamento da

proteína acessória IL-1RAcP, essencial para a transdução de sinal. Já com o heterodímero formado, o sinal é eficientemente transduzido e o domínio TIR ativado, consequentemente ocorre o recrutamento da proteína adaptadora MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) que participa da fosforilação de TRAF-6, culminando, por fim, na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (*factor nuclear kappa B*), AP-1 (*Activator protein 1*) e MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) (O'Neill e Greene, 1998).

Embora a IL-1 α e IL-1 β promovam inflamação via IL-1R e desempenhem funções biológicas semelhantes, algumas distinções entre as duas interleucinas já foram relatadas. Quanto à produção celular, IL-1 α é constitutivamente produzida pela maioria das células e tecidos, como em camadas epiteliais do trato gastrointestinal, pulmão, fígado e rim e possui função biológica dependente da clivagem de calpaína, uma cisteína protease sensível ao influxo de cálcio nos compartimentos intracelulares, ativada principalmente em processos envolvendo morte celular (Watanabe e Kobayashi, 1994). Sua liberação está estreitamente associada a mecanismos de inflamação estéril, sem a necessidade da participação de micro-organismos ou toxinas (Berda-Haddad, Robert *et al.*, 2011). Em contraste, a IL-1 β é produzida por células hematopoiéticas, como monócitos, macrófagos teciduais, células dendríticas e micróglias cerebrais e necessitam de estímulos iniciais para a formação do seu precursor inativo, como a ativação dos receptores do tipo Toll-like (TLRs) e a estimulação por citocinas como o TNF- α (Dinarello, 2011). A liberação da forma ativa de IL-1 β ocorre com auxílio da clivagem pela enzima Caspase-1. Embora a Caspase-1 seja encontrada em abundância em células hematopoiéticas, a clivagem da pro-enzima (pro-caspase-1) é dependente de inflamassoma, que consiste em uma plataforma molecular que compreende ainda a proteína NLR (*NOD-like receptors*) e o adaptador ASC (*Apoptosis-associated speck-*

like protein containing a CARD). A ativação é conseguida quando receptores de células hospedeiras conseguem detectar componentes microbianos ou sinais de estresse (Joosten, Netea *et al.*, 2013; Sollberger, Strittmatter *et al.*, 2014). De maneira interessante, outras proteases tem sido associadas à liberação de IL-1 β , como por exemplo a caspase-11, uma vez que macrófagos deficientes e estimulados *in vitro* com *Escherichia coli* e *Citrobacter rodentium* exibiram falhas na produção de IL-1 β (Kayagaki, Warming *et al.*, 2011). Algumas das outras distinções entre os ligantes de IL-1R (IL-1 α e IL-1 β) estão relacionados aos processos tumorigênicos (Krelin, Voronov *et al.*, 2007), infecciosos (Al Moussawi e Kazmierczak, 2014) e na migração leucocitária (Rider, Carmi *et al.*, 2011).

Com relação aos processos infecciosos a função de IL-1 tem sido amplamente estudada durante a infecção por protozoários como *Trypanosoma* (Dey, Sinha *et al.*, 2014), *Toxoplasma* (Villeret, Brault *et al.*, 2013) assim como também nas leishmanioses (Kautz-Neu, Kostka *et al.*, 2011a; Lima-Junior, Costa *et al.*, 2013). Nesse contexto, a grande maioria dos trabalhos descrevendo o envolvimento de IL-1 e as leishmanioses foram realizados em modelos experimentais de LC.

Em relação a infecção por *L. major*, alguns trabalhos sugerem o papel controverso dessa citocina. Em trabalho publicado em 2006, os autores mostraram que a administração de IL-1 α recombinante nos dias iniciais de infecção foi eficiente em aprimorar um perfil de resposta protetora, por promover a diferenciação de células para o padrão Th1 em camundongos susceptíveis BALB/c (Kostka, Knop *et al.*, 2006), indicando possível papel protetor de IL-1. Em contraste, alguns trabalhos sugerem que durante a infecção por *L. major*, a sinalização via IL-1R é dispensável (Kautz-Neu, Kostka *et al.*, 2011b) ou requerida para suscetibilidade (Charmoy, Hurrell *et al.*, 2016a). Recentemente foi evidenciado que a ausência de moléculas como IL-1R, IL-1 β e Nlrp3

induziu forte resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , com resultante contenção parasitária e diminuição nas lesões cutâneas (Charmoy, Hurrell *et al.*, 2016a). Além disso, foi demonstrado que o bloqueio de IL-1R com anticorpo específico preveniu o desenvolvimento de lesões causadas por *L. major* (Theodos, Shankar *et al.*, 1994). De maneira interessante, níveis exacerbados de IL-1 são prejudiciais ao hospedeiro durante a infecção por *L. major*, visto que animais Balb/c tratados com IL-1Ra (*antagonista de IL-1R*) possuem sobrevida aumentada quando comparados ao grupo controle (Balb/c infectado), além de que animais *Knockouts* para IL-1Ra apresentaram maior desenvolvimento de lesões (Voronov, Dotan *et al.*, 2010).

No que se refere às outras espécies de leishmaniose cutânea, como *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, Lima-Junior e col (2013) evidenciaram que a ativação do inflamassoma de Nlrp3 com posterior liberação de IL-1 β confere resistência à infecção. IL-1 β atua em sinergismo com o IFN- γ para a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados, conferindo proteção ao hospedeiro. Dessa forma, animais *Knockouts* para Myd88, IL-1R e Caspase-1 são significativamente suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* (Lima-Junior, Costa *et al.*, 2013).

Embora a IL-1 possua função importante na LC, existem poucos relatos quanto ao seu papel na LV. Na infecção por *L. donovani*, a administração de IL-1 α em animais cronicamente infectados resultou no aumento da produção de IFN- γ e na formação de extensos granulomas, mas não induziu a cura estéril dos animais (Curry e Kaye, 1992). Em relação a *L. infantum* é descrito que animais geneticamente deficientes para Caspase-1 possuem maior carga parasitária nos órgãos-alvo da infecção, sugerindo papel protetor de IL-1 β (Lima-Junior, Costa *et al.*, 2013), no entanto o papel da sinalização via IL-1R e IL-1 α na patogênese da LV ainda não foi elucidado.

Objetivos

2.1) Objetivo geral

Determinar o papel de IL-1R na resistência ou suscetibilidade a infecção experimental por *Leishmania infantum*.

2.2) Objetivos específicos

- ✓ Analisar a expressão dos ligantes de IL-1R (IL-1 α e IL-1 β) durante a infecção por *L. infantum*;
- ✓ Avaliar a carga parasitária no baço e fígado dos animais WT e IL-1R KO infectados;
- ✓ Determinar o papel de IL-1R na diferenciação de linfócitos T *helpers* (Th1 e Th17) ao longo da infecção;
- ✓ Determinar o papel de IL-1R na ativação e/ou migração de células inatas, como neutrófilos e macrófagos;
- ✓ Distinguir o papel dos agonistas de IL-1R (IL-1 α e IL-1 β) quanto ao número de parasitos em órgãos-alvo (baço e fígado) e na produção de citocinas.

Material e Métodos

3.1) Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (*wild type*/WT) e camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes para o receptor IL-1R1 (*Interleukin 1 receptor, type I*; IL-1R KO), para a citocina IL-1 α (IL-1 α KO) e para as enzimas Caspase 1/11 (Caspase 1/11 KO). Todos os animais utilizados nesse estudo tinham entre 6 a 8 semanas de idade e possuíam peso entre 18 a 22g. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura adequada (22 a 25°) no biotério de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e receberam água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram conduzidos sob a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP – Processo Nº 021/2015-1.

3.2) Parasitos e infecção experimental *in vivo*

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

3.3) Análise de carga parasitária dos animais infectados

Para detecção do número de parasitos presentes nos órgãos, o baço e o fígado de camundongos WT, IL-1R KO, IL-1 α KO e Caspase 1/11 KO na 4ª e 6ª semana de infecção foram removidos, pesados e a porção inferior do baço e o lóbulo esquerdo do fígado, após pesados, foram triturados em um volume de 2 mL de meio de cultura Schneider (Sigma) incompleto. O volume total foi centrifugado a 3000 rpm, 25°C, 10

minutos e ressuspensão num volume final de 1 mL de Schneider 20%. Posteriormente, as diluições seriadas foram feitas em placas estéreis de 96 poços de fundo chato, conforme a técnica de diluição limitante descrita anteriormente por TITUS et al., 1985. A contagem de poços *Leishmania*-positivos foi realizada 15 dias após o início da cultura e o número de parasitos presentes nos órgãos foi estimado conforme descrito por BUFFET et al., 1995 (BUFFET et al., 1995).

3.4) Obtenção de Células do Baço

Para isolamento de leucócitos, baços de camundongos WT, IL-1R KO, IL-1 α KO e Caspase 1/11 KO foram removidos durante a 4^a e 6^a semana pós-infecção. O órgão foi pesado, e um fragmento do baço foi macerado em PBS, lavado e centrifugado (10 min, 1300 rpm, 4°C). As hemácias presentes foram lisadas por choque osmótico, e imediatamente após, os leucócitos presentes foram ressuspensos em meio RPMI completo. O número absoluto das células foi determinado pela contagem em Tripan Blue, na proporção de 1:100, em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual.

3.5) Fenotipagem de leucócitos e determinação do padrão de citocinas no baço por citometria de fluxo

Para fenotipar o infiltrado inflamatório no baço de animais WT, IL-1R KO, IL-1 α KO e Caspase 1/11 KO infectados, os leucócitos isolados foram ressuspensos em uma concentração de 1×10^6 células/100 μ L. Logo após, as células foram incubadas com 10 μ L de soro de coelho (para bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos aos receptores Fc na superfície celular) por 30 minutos a 4°C. Subsequentemente, foram adicionados os anticorpos monoclonais de superfícies para MHC II conjugado com FITC; CD11b conjugado com APCcy7; F4/80 conjugado com PE e Ly6G conjugado

com APC (todos os anticorpos da BD Bioscience e eBioscience, San Diego, CA, EUA) na concentração de 0,5 µL por amostra. Decorrido 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 50µl de PBS-formol a 1%. A aquisição das células foi realizada por citômetro de fluxo (FACs canto II; Becton Dickinson, San Jose, USA). Para marcação intracelular, $2,5 \times 10^6$ células/mL foram distribuídas em poços com placas de 48 poços contendo RPMI completo. As células foram reestimuladas *in vitro* com PMA (50 ng/poço), ionomicina (500 ng/ml) e brefeldina A (100 ng/ml) por 4 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Decorrido o período de incubação os leucócitos foram lavados com tampão de permeabilização SBF 1% e incubados com soro de coelho como citado acima. Subsequente, os anticorpos monoclonais de superfície e de citocinas foram adicionados, sendo eles: CD3 conjugado com APCcy7, CD4 conjugado com FITC, CD8 conjugado com PEcy7, IL-17a e IL-10 conjugados com PE e IFN-γ conjugado com APC (todos os anticorpos da BD Bioscience e Bioscience, San Diego, CA, EUA) na concentração de 1 µL. Após o período de incubação (30 min, 4°C na ausência de luz) as células foram novamente lavadas com tampão de permeabilização SBF 1% e PBS e ressuspensas com 50µl de PBS-formol a 1%. A aquisição das células foi realizada por citômetro de fluxo (FACs canto II; Becton Dickinson, San Jose, USA). As análises foram feitas usando o programa *FlowJo* (FlowCytometry Analysis Software v7.2.5) o qual permite analisar todas as células adquiridas (100.000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (“Gates”) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

3.6) Dosagem de citocinas por ELISA

As concentrações de citocinas foram mensuradas *in vivo* em animais WT, IL-1R KO, IL-1 α KO e Caspase 1/11 KO. Fragmentos do fígado de animais infectados foram pesados e triturados em inibidor de protease *Complete* (Hoffman-La Roche Ltd, EUA) para quantificação de citocinas. A dosagem foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático ELISA do tipo *sandwich*, utilizando kit comercial (OpTEIA, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura da reação colorimétrica foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas (EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

3.7) Diferenciação de macrófagos a partir de precursores de medula óssea

Os macrófagos derivados de medula óssea de camundongos foram diferenciados como descrito por Englen e col. (Englen, Valdez *et al.*, 1995). Animais WT, IL-1R KO e IL-1 α KO foram eutanaziados e fêmures e tíbias foram cuidadosamente removidos. Em ambiente estéril, as epífises foram seccionadas para coleta da medula, realizada com auxílio de seringa com agulha 13 x 4,5 mm e RPMI incompleto e *endo-free*. As células recém colhidas foram lavadas com RPMI completo e centrifugadas a 1300 rpm, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células precursoras foram cultivadas em meio RPMI completo suplementado com 20% de soro bovino fetal e 30% de sobrenadante de cultura de células L929. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. No 4^a dia de diferenciação, foram adicionados 10 ml de meio específico para cultura de macrófagos e no 7^o dia as células foram coletadas e marcadas com anticorpo monoclonal para F4/80 conjugado a PE para confirmação da diferenciação. Os experimentos foram realizados quando o total de células positivas para F4/80 era maior que 80%.

3.8) Infecção de macrófagos *in vitro*

Decorrido a diferenciação, os macrófagos foram coletados e plaqueados (5×10^5 /ml, em volume final de 200 μ l) em placas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA) utilizando meio RMPI suplementado com 10% de SBF e 5% de L929. Após um período de repouso de 12 horas, as células foram primadas por 4 horas com IFN- γ recombinante (10 ng/ml) e posteriormente infectadas com *L. infantum* (1 célula: 5 parasitos) ou com meio. As culturas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 48h. Posteriormente o sobrenadante da cultura foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO).

3.9) Dosagem de óxido nítrico por macrófagos infectados

Decorrido 48 horas de infecção, o sobrenadante dos macrófagos foi coletado para quantificação da produção de NO através da mensuração de nitrito (NO²⁻) pela técnica de Griess. Para isso, 50 μ L de reagentes de Griess (diamina di-hidroclorido naftaleno – NEED) a 0,1% (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em ácido fosfórico a 5% (Merck S.A., Rio de Janeiro, Brasil) foi adicionado a 50 μ L do sobrenadante da cultura. A reação foi lida imediatamente na densidade óptica (DO) de 540 nm em leitor de miniplacas (EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos em mM sendo determinados pela comparação com a curva-padrão, obtida pelo uso de nitrito de sódio (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil) em concentrações de 200 a 0,9 μ M.

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

O RNA foi extraído de fragmentos do baço e fígado coletados após 4 e 6 semanas de infecção e controles não infectados. O método de extração combinou a utilização de TRIzol (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) seguida pela utilização parcial do kit de extração Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Alemanha). Resumidamente, após coleta do órgão, um fragmento de aproximadamente 100 mg de

tecido foi armazenado com 500 µL de reagente TRIzol a -70°C até o momento da extração. O tecido foi então descongelado e triturado com auxílio de haste homogenizadora livre de RNase seguido da adição de mais 500 µL de TRIzol, o homogenato permaneceu 5 minutos em repouso a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e a solução foi agitada durante 15 segundos e centrifugada a 12 000 x g por 10 minutos a 4°C. A porção aquosa superior foi removida e utilizada para prosseguimento da extração pelo kit Illustra RNAspin Mini de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após extração, o RNA foi quantificado e avaliado quanto a pureza e qualidade com auxílio do NanoDrop™ 2000. O RNA extraído foi submetido à confecção do cDNA. Para isso, inicialmente todas as amostras foram diluídas para concentrações semelhantes e conhecidas e logo após foi adicionado 1 µL de Oligo (dT)12-18 a 2 µg do RNA mais H₂O livre de RNase para completar um volume final de 13 µL. Esse volume foi então incubado a 65°C por 5 minutos em termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, EUA) seguido por uma incubação no gelo por 1 minuto. À reação foi adicionado um mix contendo 4 µL de tampão da enzima, 1 µL de DTT 0,1 mM, 1 µL de dNTP 10 mM e 1 µL da enzima Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) (200 U/µL), totalizando 20 µL de volume final. A reação foi incubada a 50°C por 60 minutos e depois a 70°C por 10 minutos. O cDNA foi diluído 10 vezes em água estéril e foi armazenado a -70°C até o momento do uso.

3.11) PCR em tempo real

A análise relativa de transcritos de genes alvos foi realizada por PCR em tempo real utilizando-se do cDNA confeccionado a partir das amostras supracitadas. A reação foi realizada com 7,65 µL de SYBER Green Mix (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA), 0,5 µL de cada primer (senso e antisenso) a 10 µM, 5 µL do cDNA sintetizado a

partir de 2 µg de RNA extraído e água destilada estéril suficiente para completar o volume final para 15 µL. A reação foi feita em aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA) compreendendo 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C – 30 segundos a 58°C - 30 segundos a 72°C. Um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregado para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação. Os resultados foram normalizados com GAPDH ou β2M constitutivamente expresso e analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold*) ou linha de corte. O resultado foi calculado com a fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ da amostra – ΔCt da amostra controle, onde $\Delta Ct = Ct$ gene estudado – Ct GAPDH ou β2M. O número de vezes de expressão diferencial do RNA mensageiro comparado com o controle foi definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os *primers* e sequências utilizados durante a reação de PCR em tempo real estão listados na **Tabela 1**.

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

SEQUÊNCIAS

Gene	Senso	Antisenso
GAPDH	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA	ATGTCA TCA TAC TTG GCA
β2M	CACCCCCACTGAGACTGATACATA	TCACATGTCTCGATCCCAGTA
IL-1α	AGACTACAGTTCTGCCATTGACCT	TGAAGTGAGCCATAGCTTGA
IL-1β	TGACAGTGATGAGAATGACCTGC	TTGGAAGCAGCC CTTCATCT
CXCL1	CTTCCCTTGGACATTTTGTGTC	TTTGAACGTCTCTGTCCCGAG
CXCL2	CCCCTGGTTCAGAAAATCATCC	TCCCCAGTCTCTTTCACTGT

3.12 Bloqueio com anti-IL-1α *in vivo*

Para bloqueio *in vivo*, animais C57BL/6 foram tratados por via intraperitoneal com anticorpo neutralizante para IL-1 α (Clone: ALF-161, Cat: BE0243, Bioxcell). O tratamento consistiu de uma dose com 300 ng/ml em 100 μ L de PBS 1x ou IgG controle no dia anterior a infecção e posteriormente os animais foram tratados com dose de 150 ng/ml três vezes por semana por 3 semanas. Os animais foram eutanasiados na 6ª semana após a infecção para determinação da carga parasitária no baço e fígado e investigação do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo.

3.13) Isolamento de neutrófilos da medula óssea

Os neutrófilos da medula óssea de camundongo WT e IL-1R KO foram obtidos por meio de separação por gradiente de Percoll (Percoll, Fiuka Biochemica, Sigma-Aldrich, Steinheim, Sweden.) a 72 e 65%. Cerca de 2ml do lavado do canal medular (fêmur e tibia) foram colocados sobre o gradiente de Percoll e centrifugados 1200g, a 20°C, com 2m/s² de aceleração e desaceleração, durante 30 minutos. Em seguida, a camada de células mononucleares foi descartada e a de polimorfonucleares, sobre a solução a 72%, colocada em tubo plástico estéril de 15mL. A lise das hemácias foi realizada com tampão de NH₄Cl 4% e as células lavadas em meio Hank's. O número de células após o isolamento foi obtido em contador automático, a pureza dos neutrófilos feita a partir de análise em lâmina pela contagem de 100 células e a viabilidade por exclusão com azul de Tripan 1% (1:1). Apenas as amostras com pureza e viabilidade acima de 95% foram consideradas nos ensaios.

3.14) Cultura *in vitro* de neutrófilos e dosagem de ROS por quimioluminescência

Neutrófilos recém-isolados da medula óssea de animais WT e IL-1R KO foram cultivados em placa de cultura celular de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY-

EUA) em meio RPMI 1640, suplementado com BSA 2%, sem fenol, numa concentração de 5×10^5 céls/mL em um volume final de 200µl. As células foram estimuladas com formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* (5 parasitos : 1 célula) ou meio por um período de 24h horas em estufa de BOD, 5% de CO₂ a 37°C. Decorrido o período de incubação, o metabolismo oxidativo de neutrófilos foi avaliado através da medida da produção total de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por Quimioluminescência (QL) dependente de luminol (QLlum), conforme metodologia adaptada de Andrade MF, et. al., 2013. Em placas de 96 poços, foram adicionados os neutrófilos e a sonda quimioluminescente luminol (100 µmol/L). Após incubação por 3 minutos a 37°C, foram adicionados os diferentes estímulos: PMA (10⁻⁷ mol/L) em poços específicos para estimular as células e, imediatamente, foi medida a QL durante 2 horas a 37°C em luminômetro de microplacas (modelo LB 960 Centro, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha). (Andrade, Kabeya *et al.*, 2013)

3.15 Análise estatística

Os resultados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (DP). As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se o teste t de *Student*. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey foi aplicado para amostras com distribuições normais. As análises foram realizadas através do programa GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) e foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de P eram iguais ou menores a 0,05.

Resultados

4.1) A infecção por *Leishmania infantum* induz a expressão e produção de IL-1.

A fim de determinar o papel da via de IL-1R na LV, primeiramente investigamos se a infecção por *L. infantum* promove a produção dos ligantes de IL-1R, como IL-1 α e IL-1 β , *in vivo*. Para isso, camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados ou não com 1×10^7 formas promastigotas de *L. infantum* e a expressão do mRNA para IL-1 α e IL-1 β foi avaliada no fígado por PCR em tempo real.

Conforme demonstrado na **Figura 1**, a infecção induz o aumento da expressão de mRNA para IL-1 α (**Fig.1A**) e IL-1 β (**Fig.1B**), quando comparado aos animais não infectados. Em níveis proteicos, observamos que IL-1 α é progressivamente produzida no curso da infecção (**Fig.1C**), com aumento de aproximadamente duas vezes na 4ª e 6ª pós-infecção, quando comparado aos animais *naïves*. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a citocina IL-1 é regulada positivamente durante a infecção por *L. infantum*, indicando seu possível envolvimento na leishmaniose visceral.

4.2) Sinalização da via IL-1R é requerida para suscetibilidade durante a infecção por *L. infantum*.

É classicamente descrito que a sinalização via IL-1R confere resistência à diversas infecções fúngicas e bacterianas (Lee, Yang *et al.*, 2015; Mascarenhas, Pereira *et al.*, 2015), mas no que se refere as leishmanioses, seu papel parece divergir entre as distintas espécies (Kautz-Neu, Kostka *et al.*, 2011; Charmoy, Hurrell *et al.*, 2016). A fim de avaliar o papel de IL-1R no perfil de susceptibilidade ou resistência a infecção por *L. infantum*, animais WT e IL-1R KO foram infectados por via intravenosa (iv) com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum*. O número de parasitas presentes nos órgãos alvo da infecção, baço e fígado, na 4ª e 6ª semana pós-infecção foi determinado pela técnica de diluição limitante (Titus *et al.*, 1985).

De maneira interessante, animais geneticamente deficientes para IL-1R (IL-1R KO) foram mais resistentes à infecção em ambos os períodos analisados, apresentando quantidades significativamente menores de parasitos no baço (**Fig.1D**) e fígado (**Fig.1E**), quando comparados aos animais WT.

Figura 1: A via de sinalização mediada por IL-1R confere suscetibilidade na infecção por *L. infantum*. (A-C) Expressão de mRNA para *IL-1α* (A) e *IL-1β* (B) no fígado de camundongos WT na 4ª e 6ª semana pós-infecção foi determinada por PCR em tempo real e normalizada de acordo com a expressão constitutiva de β2M. (C) Níveis proteicos de IL-1α em amostras de fígado de camundongos WT na 2ª, 4ª e 6ª semana pós-infecção determinados por ELISA. (D-E) Camundongos WT e IL-1R KO foram infectados com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* por via intravenosa. A carga parasitária do baço (D) e do fígado (E) durante a 4ª e 6ª semana de infecção foi determinada pela técnica de diluição limitante. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, δ P < 0,05 comparado ao grupo controle WT não infectado e média ± DP, * P < 0,05 comparado ao grupo controle WT infectado.

4.3) IL-1R regula negativamente a produção de citocinas inflamatórias no fígado durante a infecção por *L. infantum*.

Tendo em vista que a ausência de IL-1R contribui para o controle da replicação parasitária, analisamos a produção de mediadores envolvidos com o perfil de resistência da LV. Para isso, fragmento do fígado de animais selvagens e deficientes para IL-1R foi coletado a 4ª e 6ª semana de infecção e pesado para dosagem de citocinas por ELISA.

Nós observamos que a infecção com o parasito promoveu a liberação de IFN- γ no fígado de animais WT em todos os períodos analisados (4ª e 6ª spi). Entretanto, a produção dessa citocina foi significativamente aumentada em animais IL-1R KO na 4ª semana pós infecção, quando comparada ao grupo WT 4ª spi (**Fig.2A**). Esse aumento foi, em média, duas vezes maior que os WT. Além de IFN- γ , a via de IL-1R também é um importante regulador negativo de IL-17, visto que tanto na 4ª quanto na 6ª semana pós infecção, a ausência desse receptor aumentou significativamente a produção de IL-17 no fígado (**Fig.2B**). Visto que a IL-12p40 é uma subunidade compartilhada por citocinas como IL-12 e IL-23 importantes para a polarização de linfócitos T *helpers*, como os Th1 e Th17 (Trinchieri, Pflanz *et al.*, 2003; Cooper e Khader, 2007), avaliamos a IL-12p40 no fígado de animais infectados. Nossos dados demonstram que, em fases crônicas de infecção (4ª e 6ª semana), animais geneticamente deficientes para IL-1R apresentaram níveis aumentados de IL-12p40 quando comparado aos WT (**Fig.2D**), sugerindo que a inibição da resposta imune adaptativa efetora contra *L. infantum* pela via de IL-1R pode ser em decorrência do comprometimento da resposta imune inata. Uma vez que a citocina IL-6 promove inflamação e desempenha papel importante na polarização de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 (Kimura e Kishimoto, 2010), avaliamos se IL-1R interfere na produção desse mediador no nosso modelo. Porém, os níveis de IL-6 foram similares entre animais WT e IL-1R KO (**Fig.2C**).

Figura 2: A via IL-1R regula negativamente a produção de citocinas inflamatórias no fígado durante a infecção por *L. infantum*. (A-D) Fragmentos do fígado de animais WT e IL-1R KO infectados com *L. infantum* foram triturados para quantificação de citocinas por ELISA. Dosagem de IFN- γ (A), IL-17 (B) e IL-6 (C) e IL-12p40 (D) foi realizada durante a 4ª e 6ª semana de infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle WT infectado.

4.4) IL-1R regula negativamente a produção de IFN- γ e IL-17 por células T CD4⁺ durante a infecção por *L. infantum*.

Visto que linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são os principais produtores de IFN- γ e IL-17 e estão associados com resistência à infecção por Leishmanias (Belkaid, Von Stebut *et al.*, 2002; Alexander e Bryson, 2005; Sacramento, Cunha *et al.*, 2014), fenotipamos as células produtoras de tais citocinas a fim de associá-las ao caráter protetor observado em animais IL-1R KO. Para isso, células do baço de animais WT e IL-1R KO em diferentes dias pós-infecção (4 e 6 semanas) foram restimuladas in vitro

com PMA e ionomicina e a produção de IFN- γ e IL-17 foi determinada por citometria de fluxo.

Observamos que animais deficientes para IL-1R apresentaram aumento tanto na porcentagem (**Fig.3A**) quanto no número absoluto (**Fig.3B**) de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ na 4^a e 6^a semana pós-infecção. Durante a 4^a semana de infecção, animais IL-1R KO apresentaram aproximadamente 3 vezes mais linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺ comparado ao grupo controle (WT infectados).

Relativo aos linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ ⁺, observamos que os animais IL-1R KO apresentaram aumento significativo na frequência desse subtipo celular quando comparado aos WT infectados (**Fig.3E**), mas não alterou o número absoluto dessas células (**Fig.3F**).

Figura 3: IL-1R regula negativamente a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ durante a infecção por *L. infantum*. Células do baço de animais WT e IL-1R KO na 4^a e 6^a spi foram restimuladas in vitro com PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) por 4h e a

produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. A produção de IFN- γ foi determinada dentro do *gate* CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺. Os dot plots representam a frequência da produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (A) e por T CD8⁺ (D). Os gráficos de barra representam a porcentagem (B/E) e o número absoluto (C/F) dessas células. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, * P <0,05 comparado ao grupo controle WT infectado.

Com relação a IL-17, animais geneticamente deficientes para IL-1R apresentam aumento significativo na porcentagem de linfócitos T CD4⁺ IL-17⁺ no baço na 4^a e 6^a spi, quando comparados aos WT infectados (Fig.4B e Fig.4C). Em relação ao número absoluto de células, camundongos IL-1R KO apresentam um aumento de células TCD4⁺ produtoras de IL-17 de aproximadamente 2,5 vezes.

Figura 4: IL-1R regula negativamente a produção de IL-17 por linfócitos T CD4⁺ durante a infecção por *L. infantum*. Células do baço de animais WT e IL-1R KO na 4^a e 6^a spi foram restimuladas in vitro com PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) por 4h e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. A produção de IL-17 foi determinada dentro do *gate* CD3⁺CD4⁺. O dot plot representa a frequência da produção de IL-17 por células T CD4⁺ (A). Os gráficos de barra representam a porcentagem (B) e o número absoluto (C) dessas células. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, * P <0,05 comparado ao grupo controle WT infectado.

4.5) IL-1 α , mas não Caspase 1/11, contribui para suscetibilidade durante a infecção por *L. infantum*.

Tendo em vista que o papel biológico de IL-1R pode ser mediado tanto por IL-1 α quanto por IL-1 β (Boraschi e Tagliabue, 2013), determinamos qual das duas interleucinas são requeridas para suscetibilidade no curso da infecção por *L. infantum*. Para isso, camundongos WT, IL-1 α KO e Caspase 1/11 KO (enzimas necessárias para liberação da forma ativa de IL-1 β) (Vigano e Mortellaro, 2013; Sollberger, Strittmatter *et al.*, 2014), foram infectados iv com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. Infantum* e o número de parasitas presentes em órgãos alvo da infecção foi avaliado na 6ª semana pós-infecção. De forma interessante, nossos dados sugerem que IL-1 α , mas não IL-1 β , promove a progressão da doença, uma vez que animais deficientes para IL-1 α , mas não para Caspase 1/11, possuem menos parasitos no baço (**Fig.5A**) e fígado (**Fig.5B**) quando comparado aos animais WT.

Investigando os mecanismos envolvidos no perfil de resistência dos animais IL-1 α KO, avaliamos a produção de citocinas envolvidas com a proteção durante a infecção. Nossos dados demonstram que animais deficientes para IL-1 α possuem aumento na produção de IFN- γ (**Fig.5C**), IL-17 (**Fig.5D**) e IL-12p40 (**Fig.5E**) quando comparados aos WT infectados. Já os animais deficientes para Caspase 1/11 produzem quantidades similares de IFN- γ (**Fig.5C**) e IL-17 (**Fig.5D**) comparado aos animais WT infectados, apresentando discreto aumento apenas na produção de IL-12p40 (**Fig.5E**). Em conjunto, o aumento de IFN- γ e IL-17 no fígado de animais IL-1 α KO justifica o perfil de resistência observado nesses animais.

Figura 5: IL-1 α contribui para suscetibilidade no curso da infecção por *Leishmania infantum*. (A-B) Camundongos WT, IL-1 α KO e Caspase 1/11 KO foram infectados com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* por via intravenosa. A carga parasitária do baço (A) e do fígado (B) durante a 4ª e 6ª semana de infecção foi determinada pela técnica de diluição limitante. (C-E) Fragmentos do fígado de animais WT, IL-1 α KO e Caspase 1/11 KO infectados com *L. infantum* foram pesados e macerados em inibidor enzimático para quantificação de citocinas por ELISA. Dosagem de IFN- γ (C), IL-17 (D) e IL-12p40 (E) foi realizada durante a 6ª semana de infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, * P < 0,05 comparado ao grupo controle WT infectado e média DP, # P < 0,05 comparado ao grupo Caspase 1/11 KO infectado.

4.6) IL-1 α regula negativamente os perfis de resposta do tipo Th1, Th17 e T CD8⁺ produtora de IFN- γ ⁺.

Em seguida, analisamos a presença de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IFN- γ e T CD4⁺ produtora de IL-17 nos animais deficientes para IL-1 α e Caspase 1/11

durante a 6ª semana de infecção. Evidenciamos que animais IL-1 α KO apresentam maior porcentagem e número absoluto de linfócitos Th1, Th17 e T CD8⁺ produtor de IFN- γ quando comparados aos WT (**Fig.6A-I**). Enquanto que os camundongos deficientes para Caspase 1/11, apresentaram apenas aumento no número absoluto de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (**Fig. 6A-I**). Em conjunto, os dados apresentados até o momento sugerem que preferencialmente a IL-1 α , via IL-1R, suprime a resposta imune efetora contra o parasita permitindo o estabelecimento e progressão da doença.

Figura 6: IL-1 α regula negativamente os perfis de resposta do tipo Th1, Th17 e CD8⁺ produtora de IFN- γ ⁺ no baço. Células do baço de animais WT, IL-1 α KO e Caspase 1/11 KO na 6ª spi foram restimuladas in vitro com PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) por 4h e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. A produção de IFN- γ foi determinada dentro do gate CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺ e a produção de IL-17 dentro do gate CD3⁺CD4⁺. Os dot plots representam a frequência da produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (D) e a frequência da produção de IL-17 por células T CD4⁺ (G). Os gráficos de barra representam a porcentagem (B/E/H) e o número absoluto (C/F/I) dessas células. Os

resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, * P <0,05 comparado ao grupo controle WT infectado.

4.7) O bloqueio de IL-1 α *in vivo* confere resistência durante a infecção por *L. infantum*.

Com o objetivo de confirmar o papel de IL-1 α na regulação negativa da resposta inflamatória na LV, bloqueamos essa citocina com auxílio de anticorpo específico anti-IL-1 α em animais WT infectados, conforme mencionado em M&M.

Confirmando os resultados obtidos com animais IL-1R KO e IL-1 α KO, o tratamento com anti-IL-1 α foi capaz de reduzir o número de parasitos no fígado (**Fig.7B**), quando comparados ao grupo controle. Além disso, verificamos que o grupo tratado apresentou um significativo aumento na frequência de células T CD4⁺ (**Fig.7D**) e T CD8⁺ (**Fig.7G**) produtoras de IFN- γ em comparação aos animais selvagens (IgG controle). Em conjunto, nossos dados confirmam que a IL-1 α participa como um regulador negativo da resposta imune durante a infecção por *L. infantum*, principalmente no que se refere a produção de IFN- γ .

Figura 7: O bloqueio de IL-1 α *in vivo* confere resistência a animais WT durante a infecção por *L. infantum*. Camundongos WT fêmeas foram tratados com anticorpo neutralizante para IL-1 α (300ng/ ml) via intraperitoneal no dia 0, enquanto o grupo controle (WT fêmea) recebeu apenas IgG controle. No dia 01, todos os animais foram infectados por via intravenosa com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum*. Durante a 4^a, 5^a e 6^a semana de infecção os animais receberam novas doses de anticorpo neutralizante para IL-1 α (150 ng/ml) ou IgG controle, em dias alternados. Os experimentos foram realizados no final da 6^a semana de infecção. (A-B) Carga parasitária do baço (A) e fígado (B) foi determinada pela técnica de diluição limitante. (C-H) A análise das células produtoras de IFN- γ^+ foi realizada dentro da população de células CD3⁺CD4⁺, como demonstrado no *dot plot* representativo (C), frequência (D) e número absoluto de células (E); e pela produção de IFN- γ^+ dentro da população de células CD3⁺CD8⁺, como demonstrado no *dot plot* representativo (F), frequência (G) e número absoluto de células, determinada por citometria de fluxo no baço. Os resultados representam um único experimento e estão expressos como média $\pm$ DP, * P <0,05 comparado ao grupo controle WT infectado.

4.8) IL-1R regula negativamente a migração de neutrófilos no baço durante a LV de maneira dependente de Cxcl1.

Considerando que os neutrófilos desempenham papel importante no controle das leishmanioses (Mcfarlane, Perez *et al.*, 2008; Sacramento, Trevelin *et al.*, 2015), avaliamos se o recrutamento do polimorfonuclear é dependente de IL-1R. Em todos os períodos analisados, a migração de neutrófilos, (caracterizados como Ly6G⁺CD11b⁺) esteve aumentada em animais IL-1R KO, quando comparados aos animais controle (**Fig.8**). Em termos de frequência o aumento foi de aproximadamente 2 vezes (**Fig.8B**) e em números absolutos foi de 3 vezes (**Fig.8C**) na 4^a spi, quando comparado aos WT.

Figura 8: Sinalização via IL-1R regula negativamente a migração de neutrófilos durante a infecção por *L. infantum*. (A-C) A análise de neutrófilos foi caracterizada pela população de células positivas para Ly6G⁺CD11b⁺, como demonstrado no *dot plot* representativo (A) por citometria de fluxo. Os gráficos de barra representam a frequência (B) e o número absoluto de células (C) presentes no baço de animais WT e IL-1R KO na 4^a e 6^a semana pós-infecção. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, * P <0,05 comparado ao grupo controle WT infectado.

A migração dos neutrófilos do sangue para os sítios inflamatórios é mediada pela produção e secreção de quimiocinas CXC (Murphy, 1997; Chintakuntlawar e Chodosh, 2009). Nesse sentido, investigamos em nosso modelo a expressão de quimiocinas clássicas para o recrutamento do polimorfo. Como demonstrado na **Figura 9**, observamos um aumento significativo de aproximadamente 3 vezes na expressão de *Cxcl1* (**Fig.9A**) no baço de animais *Knockouts* para IL-1R durante a 6ª semana de infecção, quando comparado aos WT. No entanto nenhuma diferença foi observada relativo à expressão de *Cxcl2* entre os grupos investigados (**Fig.9B**).

Figura 9: Migração de neutrófilos é regulada por IL-1R de maneira dependente de *Cxcl1* na infecção por *L. infantum*. A Expressão de mRNA para *Cxcl1* (A) e *Cxcl2* (B) no baço de camundongos WT e IL-1R KO durante a 6ª semana de infecção foi determinada por PCR em tempo real e normalizada de acordo com a expressão constitutiva de GAPDH. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle WT infectado.

4.9) A ausência de IL-1R não altera no perfil de ativação de neutrófilos.

A ativação de neutrófilos por produtos microbianos ou citocinas induz expressão de selectinas e integrinas as quais permitem o rolamento, adesão e transmigração do polimorfonuclear do endotélio para o sítio de infecção (Jones, Abbassi *et al.*, 1993; Hafezi-Moghadam, Thomas *et al.*, 2001; Sanz e Kubes, 2012). Visto que animais *knockouts* para IL-1R possuem maior recrutamento de neutrófilos no sítio infeccioso durante a LV, nós avaliamos o perfil de ativação dos polimorfonucleares nesses animais (IL-1R KO) pela análise da expressão de CD62L e CD69. Para isso, neutrófilos presentes no baço de animais IL-1R KO e WT na 6ª spi foram marcados com anticorpos monoclonais para avaliação da média de intensidade de fluorescência (MIF) por citometria de fluxo. De forma interessante, nossos dados demonstram que a ausência de IL-1R não altera nesse parâmetro de ativação, visto que a expressão de CD62L (**Fig.10A**) e CD69 (**Fig.10B**) foi similar entre os neutrófilos de animais IL-1R KO e os WT.

É demonstrado que a infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania* promovem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos polimorfonucleares, mecanismo esse que auxília na eliminação do patógeno (Falcao, Weinkopff *et al.*, 2015). Nesse sentido, analisamos no nosso modelo se a capacidade de produção de ROS é dependente da sinalização de IL-1R nos polimorfonucleares. Para isso, neutrófilos isolados da medula óssea provindos de animais WT e IL-1R KO foram infectados com formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania infantum* (5 parasitos: 1 célula). Os neutrófilos selvagens e deficientes para IL-1R foram mantidos em cultura por 24 horas. Decorrido o período de incubação, as células foram estimuladas com o controle positivo (PMA) e a produção de espécies reativas de oxigênio foi mensurada por quimioluminescência dependente de luminol. Como demonstrado na **Figura 10**, nós não observamos diferença significativa na produção de ROS entre os neutrófilos

deficientes para IL-1R (**Fig.10C**) quando comparado aos neutrófilos selvagens. Esse conjunto de dados nos indica que a via de sinalização mediada por IL-1R não participa da ativação do polimorfonuclear na infecção por *L. infantum*.

Figura 10: A ausência de sinalização via IL-1R não altera no perfil de ativação de neutrófilos. Neutrófilos do baço de animais WT e IL-1R KO durante a 6ª semana de infecção foram marcados com anticorpos monoclonais e caracterizados como Ly6G⁺CD11b⁺. A expressão de moléculas relacionadas a ativação, como CD62L (**A**) e CD69 (**B**), foi determinada por citometria de fluxo. Análise da ativação de neutrófilos *in vitro*. Dosagem de ROS (*oxygen-reactive species*) por quimioluminescência dependente de luminol em neutrófilos isolados de medula óssea de animais WT e IL-1R (**C**) e estimulados com *L. infantum* por 24 horas. Os resultados são representativos de um único experimento e estão expressos como média $\pm$ DP, * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle WT infectado.

4.10) IL-1 α possui papel regulador sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos.

A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos é um dos principais mecanismos de eliminação de parasitos intracelular, incluindo as diversas espécies de *Leishmania* (Olekhnovitch e Bousso, 2015). Assim, nós avaliamos se a produção de NO é dependente de IL-1 durante a infecção *in vitro* por *L. infantum*.

Para isso, macrófagos diferenciados de precursores da medula óssea provenientes de animais WT, IL-1 α KO e IL-1R KO foram previamente primados com 10 ng/ml de IFN- γ recombinante por 4 horas e logo após infectados com formas promastigotas de *L. infantum* (5 parasitos:1 célula). Decorrido 48 horas de infecção as concentrações de nitrato foram mensuradas pelo método de Griess. Como demonstrado na **Figura 11**, nossos dados sugerem o envolvimento de IL-1 α , mas não de IL-1 β , na ativação de macrófagos, visto que a deleção gênica do receptor de IL-1 α e IL-1 β , o IL-1R, não afetou na produção de NO, quando comparado aos macrófagos WT. Enquanto que apenas a ausência de IL-1 α aumentou em aproximadamente 2 vezes na produção de óxido nítrico quando comparado aos macrófagos selvagens e aos deficientes para IL-1R.

Figura 11: IL-1 α regula negativamente a produção de óxido nítrico por macrófagos *in*

vitro. Macrófagos diferenciados de médula óssea de animais WT, IL-1R KO e IL-1 α KO foram previamente estimulados com IFN- γ (10 ng/ml) por 4 horas, seguido pela infecção das células com *L. infantum* (5 parasitos : 1 célula). A liberação de nitrito foi mensurada após 48 h de infecção pelo método de Griess. Os resultados são representativos de um único experimento e estão expressos como média $\pm$ DP, * P <0,05 comparado ao grupo controle WT estimulado com IFN- γ + *L. infantum* e média $\pm$ DP, # P <0,05 comparado ao grupo IL-1R KO estimulado com IFN- γ + *L. infantum*.

4.11) IL-1R regula a produção de IL-10 na infecção por *L. infantum*.

Com o intuito de compreender o mecanismo envolvido na regulação imune via IL-1R durante a infecção por *L. infantum*, nós avaliamos a produção de IL-10 em animais *Knockouts* e WT infectados, uma vez que essa citocina possui papel importante na regulação negativa da resposta imune protetora a *Leishmania*, o que promove a progressão da doença (Kane e Mosser, 2001). Nesse contexto, fragmento do fígado de animais WT e IL-1R KO na 4^a e 6^a spi foi coletado e pesado para dosagem de IL-10 por ELISA. Como demonstrado na **Figura 12A**, animais *knockouts* para IL-1R produzem aproximadamente 3 vezes menos IL-10 do que os animais selvagens na 6^a semana pós-infecção. Acreditamos na relevância desse dado, visto que a diminuída produção de IL-10 pode estar intimamente relacionado com o aumento de resposta protetora em animais IL-1R KO. A fim de determinar o papel de IL-1R sobre a produção de IL-10 no baço, células de animais WT e IL-1R na 6^a spi foram restimuladas in vitro com PMA e ionomicina para marcação intracelular. De maneira interessante, nossos dados demonstram que animais *knockouts* para IL-1R possuem menor frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10 (**Fig.12C**). No entanto, não encontramos diferença significativa em relação ao número absoluto de células (**Fig.12D**)

Tendo em vista que as células T reguladoras possuem papel descrito nas leishmanioses pela importante capacidade de supressão de respostas efectoras, favorecendo assim a replicação do parasito (Belkaid, Piccirillo *et al.*, 2002), buscamos investigar se IL-1R poderia influenciar na migração desse tipo celular para o sítio infeccioso. Assim, o baço de animais selvagens e deficientes para IL-1R foram coletados na 4ª e 6ª semana pós-infecção e avaliados quanto à presença de células T $CD4^+ Foxp3^+$. Conforme demonstrado na figura 12, a frequência (**Fig. 12F**) e o número absoluto de células T regs (**Fig.12G**) não foram alterados na ausência de IL-1R. Em conjunto, os dados da **Figura 12** demonstram que a produção de IL-10, mas não a migração de células T regs, é dependente de IL-1R na infecção por *L. infantum*.

Figura 12: Papel regulador de IL-1R é dependente de IL-10 e independente de células T reguladoras. Camundongos WT e IL-1R KO foram infectados com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* por via intravenosa. Fragmentos do fígado dos

animais durante a 4^a e 6^a semana de infecção foram pesados e triturados em inibidor enzimático para quantificação de IL-10 por ELISA (**A**). A fenotipagem de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 foi determinada no baço de animais WT e IL-1R KO durante na 6^a spi, como demonstrado no dot plot representativo (**B**), frequência (**C**) e número absoluto de células (**D**). A análise de células T regs foi realizada dentro da população de linfócitos T CD4⁺ Foxp3⁺ no baço na 4^a e 6^a spi, como demonstrado no dot plot representativo da 4^a spi (**E**), frequência (**F**) e número absoluto de células (**G**). Os dados (**B-G**) foram determinados por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de um único experimento e estão expressos como média ± DP,

* P <0,05 comparado ao grupo controle WT infectado.

Discussão

5) Discussão

A compreensão dos aspectos fisiopatológicos das leishmanioses, bem como o entendimento dos mecanismos que resultam em um perfil de resistência ou suscetibilidade à infecção são fundamentais para que medidas preventivas e/ou de controle sejam futuramente desenvolvidas. Nesse sentido, a identificação das vias de sinalização ativadas, tal como dos mediadores gerados em resposta ao parasito tornam-se de extrema importância. No presente trabalho nós demonstramos que a sinalização via IL-1R, com prevalente papel de IL-1 α , confere suscetibilidade durante a infecção por *L. infantum* através da regulação negativa da diferenciação de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de IFN- γ e IL-17, migração de neutrófilos para os órgão alvo da doença e produção de NO por macrófagos.

A produção de IL-1 tem sido demonstrada durante às infecções *in vitro* pelos parasitos do gênero *Leishmania* (Cillari, Dieli *et al.*, 1989; Delfino, Chiofalo *et al.*, 1995) e diversos grupos tem investigado a participação dessa citocina no controle das leishmanioses. Entretanto, dados da literatura indicam o papel pleiotrópico da IL-1. Charmoy e colaboradores mostraram recentemente que IL-1 β , IL-1R e as moléculas do inflamassoma (ASC, Nlrp3 e Caspase-1/11) são requeridas para suscetibilidade durante à infecção experimental por *L. major*, uma vez que camundongos deficientes possuem melhor capacidade de controle da infecção (Charmoy, Hurrell *et al.*, 2016). Enquanto que durante a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* a IL-1 parece conferir papel protetor através da redução de parasitos e tamanho de lesão (Lima-Junior, Costa *et al.*, 2013).

Considerando a ausência de informações consistentes acerca desta citocina na leishmaniose visceral e tendo em vista que à infecção por *L. infantum* induz a expressão

e produção de IL-1, buscamos identificar os mecanismos envolvidos na via de sinalização do seu receptor, o IL-1R. De maneira interessante, evidenciamos que essa molécula favorece a progressão da doença, visto que animais *knockouts* (IL-1R KO) são mais resistentes à infecção. De fato, alguns estudos sugerem que a ausência de sinalização via IL-1R pode conferir proteção ao hospedeiro. Em modelo experimental de *Toxoplasma gondii*, a deleção gênica de IL-1R conferiu resistência aos animais, uma vez que essa molécula promove a destruição das células de paneth no intestino delgado via produção de IFN- γ , o que favorece a desregulação da homeostase e consequente aumento de mortalidade (Villeret, Brault *et al.*, 2013). Em infecções virais, encontrou-se associação entre o bloqueio de IL-1R e a melhora da doença desencadeada pelo *Ebolavirus*, visto que a presença do antagonista de IL-1R (*IL-1Ra*) possui papel importante no controle da inflamação (Hill-Batorski, Halfmann *et al.*, 2015). No que se refere as leishmanioses, Voronov E *et al.*, (2010) demonstraram que a ausência de IL-1 α e IL-1 β conferiu resistência a camundongos infectados com *L. major* (Voronov, Dotan *et al.*, 2010); já na infecção por *L. amazonensis* foram encontrados dados silimares, uma vez que a administração local de IL-1 β em animais C57BL/6 infectados acelerou a progressão da doença e induziu a produção exacerbada de citocinas como IL-10 e IFN- γ (Xin, Li *et al.*, 2007). Contudo, nós demonstramos nesse estudo que IL-1R atua como um regulador negativo da resposta inflamatória na infecção por *L. infantum*.

Diversos estudos demostram que a ativação de MyD88 via TLR/IL-1R/IL-18R possui papel importante na polarização de diferentes perfis de linfócitos TCD4⁺ (Chang, Burkett *et al.*, 2013; O'donnell, Pham *et al.*, 2014) e é classicamente descrito que os subtipos Th1 e Th17 e as citocinas geradas por estes perfis de respsota estão relacionados com proteção na LV (Goto e Das Gracas, 2009; Sacramento, Cunha *et al.*, 2014; Nascimento, Carregaro *et al.*, 2015). Em nosso modelo, observamos que IL-1R

modula negativamente a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e IL-17, visto que há um expressivo aumento dessas subpopulações celulares no baço de animais *knockouts* durante a fase crônica de infecção. Corroborando com os nossos dados já havia sido evidenciado que durante a infecção por *L. major*, animais BALB/c deficientes para IL-1 α e IL-1 β produzem quantidades elevadas de IFN- γ por células CD3⁺ (Voronov, Dotan *et al.*, 2010); outro estudo recente envolvendo camundongos de linhagem C57BL/6 demonstrou dados correlatos, em que a ausência de IL-1R promoveu o aumento no número de células T CD4⁺ positivas para IFN- γ e IL-17 na lesão de camundongos infectados por *L. major*, o que conferiu diminuição na carga parasitária (Charmoy, Hurrell *et al.*, 2016). Ao investigar os mecanismos envolvidos na diferenciação de linfócitos T *naïves* para os perfis de resposta Th1 e Th17, nós encontramos um aumento significativo na produção de IL-12p40 no fígado de animais IL-1R KO na 4^a e 6^a semana de infecção, acreditamos na relevância desse dado, uma vez que essa subunidade (IL-12p40) é compartilhada por citocinas como IL-12 e IL-23, importantes na diferenciação de linfócitos Th1 e Th17, respectivamente (Cooper e Khader, 2007). No entanto, nós não descartamos a possibilidade de IL-1R possuir papel regulador sobre a produção de outras citocinas importantes na diferenciação de linfócitos T *helpers*, como a IL-18 e o TGF- β (Dinarello, 1999; Alexander e Bryson, 2005; Zhu e Paul, 2008; Hirahara, Ghoreschi *et al.*, 2010). Em conjunto, o aumento de resposta protetora, com a participação dos linfócitos Th1 e Th17 justifica o perfil de resistência observado em animais *knockouts*.

O IFN- γ desempenha papel central na defesa contra os parasitos do gênero *Leishmania*, principalmente pela geração de NO via indução de iNOS, o que intensifica os mecanismos microbicidas dos fagócitos (Bogdan, Rollinghoff *et al.*, 2000). Em trabalho publicado pelo nosso grupo, foi demonstrado que a citocina IL-17 possui papel

protetor na infecção por *L. infantum* e atua em cooperação com o IFN- γ , potencializando a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados (Nascimento, Carregaro *et al.*, 2015). Além do aumento de linfócitos Th1 e Th17 no baço de animais IL-1R KO, observamos elevada produção de IFN- γ e IL-17 no fígado desses animais durante a 4^a e 6^a semana de infecção, o que consolida a nossa hipótese de que a sinalização via IL-1R regula negativamente a resposta inflamatória na LV.

A ativação de IL-1R é dependente de sua interação com as citocinas IL-1 α e IL-1 β , o que resulta na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, importantes na indução de genes inflamatórios (O'Neill e Greene, 1998). Aqui, nós fornecemos evidências experimentais que suportam a hipótese de que IL-1 α possui papel mais importante do que IL-1 β na progressão da leishmaniose visceral, uma vez que animais IL-1 α KO são resistentes à infecção por *L. infantum* e possuem significativo aumento na produção de citocinas protetoras (IFN- γ e IL-17) em órgãos-alvo da infecção, enquanto que os animais deficientes para Caspase 1/11 (enzimas essenciais para a liberação da forma ativa de IL-1 β) possuem apenas um discreto aumento na produção de IFN- γ por células CD3⁺, o que não interferiu no controle do número de parasitos no baço e fígado.

Embora IL-1 α e IL-1 β utilizem o mesmo receptor de membrana para ativação celular, alguns trabalhos sugerem que essas citocinas podem desempenhar funções diferentes. Em 2011, Rider P et al, caracterizaram em ensaios de inflamação estéril, que IL-1 α desempenha papel na migração de neutrófilos no início da inflamação, ao passo que IL-1 β foi requerida apenas para o recrutamento de macrófagos em fases tardias (Rider, Carmi *et al.*, 2011). Outro importante diferencial tem sido relatado em estudos de carcinogênese. Krelin et al, (2007) evidenciaram que animais *knockouts* para IL-1 β são mais resistentes ao desenvolvimento tumoral (*Melanoma B16*) do que os deficientes em IL-1 α (Krelin, Voronov *et al.*, 2007). Em modelo de carcinoma, os autores

encontraram observações opostas entre os ligantes de IL-1R, visto que IL-1 β está associado com a progressão da patologia, enquanto que IL-1 α confere proteção ao estabelecimento do tumor (Marhaba, Nazarenko *et al.*, 2008).

Já nos processos infecciosos, as distinções entre IL-1 α e IL-1 β tem sido extensivamente investigadas. Estudo com *Mycobacterium tuberculosis* demonstrou que o bloqueio de IL-1 α , mas não de IL-1 β conferiu suscetibilidade aos animais infectados (Guler, Parihar *et al.*, 2011). Em 2006, foi sugerido que tanto IL-1 α quanto IL-1 β conferem proteção à infecção por *Candida albicans*, mas de maneira interessante, as duas citocinas utilizam de mecanismos diferentes. Enquanto IL-1 β está associada ao recrutamento de granulócitos, IL-1 α foi requerida para ativação do polimorfonuclear (Vonk, Netea *et al.*, 2006). Caffrey A *et al.*, (2015) demonstraram em notável estudo publicado na revista *Plos Pathogens*, que a ausência de IL-1R ou a depleção de IL-1 α proporciona forte suscetibilidade aos camundongos infectados pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, devido a uma deficiência na produção de quimiocinas como o Cxcl1, o que dificulta a migração dos neutrófilo para o sítio inflamatório. Enquanto que IL-1 β e as moléculas do inflamassoma foram requeridas apenas para ativação de macrófagos, o que possui menor relevância no controle desse tipo de infecção (Caffrey, Lehmann *et al.*, 2015). Diferentemente de IL-1 β , a IL-1 α pode ser produzida por células não hematopoiéticas (Dinarelli, 2011), nós sugerimos que durante as fases crônicas da infecção por *L. infantum*, possivelmente ocorra uma ativação dessas células (fibroblastos, hepatócitos e esplenócitos) em órgãos-alvo (baço e fígado), o que poderia promover forte liberação de IL-1 α e consequente interação com o seu receptor, o IL-1R.

Os neutrófilos possuem papel importante no controle da LV (Sacramento, Trevelin *et al.*, 2015; Quirino, Nascimento *et al.*, 2016), e é classicamente descrito que a IL-1 regula positivamente a migração do polimorfonuclear para o sítio inflamatório.

Como por exemplo, em infecções por *Legionella pneumophila* (Mascarenhas, Pereira *et al.*, 2015) e *Streptococcus agalactiae* (Biondo, Mancuso *et al.*, 2014) a ausência de IL-1R afetou significativamente a migração dos neutrófilos, o que conferiu suscetibilidade aos animais. Em modelo de inflamação crônica induzida por TPMD (2,6,10,14 tetramethylpentadecane) IL-1 α e IL-1R induzem a produção de Cxcl5, quimiocina importante para a migração do polimorfonuclear (Lee, Kumagai *et al.*, 2011). No entanto, nós evidenciamos um acentuado aumento de neutrófilos no baço de animais IL-1R KO na 4^a e 6^a semana pós-infecção quando comparado aos animais WT, o que sugere que IL-1R regula negativamente a migração do polimorfonuclear para o sítio inflamatório.

Outro achado que fortalece a nossa hipótese diz respeito à expressão de Cxcl1, que encontra-se aumentada nos camundongos geneticamente deficientes de IL-1R durante a sexta semana de infecção no baço. Cxcl1 é expressa por fagócitos em sítios de inflamação, e conduz o recrutamento local dos neutrófilos de vasos sanguíneos para os tecidos, por promover a adesão do polimorfonuclear as células endoteliais e a transmigração para os tecidos (Schumacher, Clark-Lewis *et al.*, 1992; Singer e Sansonetti, 2004). Aqui, nós propomos que a maior migração do polimorfonuclear observado em animais IL-1R KO, pode ser devido a um efeito indireto de citocinas produzidas por células da imunidade adaptativa, como o IFN- γ e a IL-17, uma vez que esses mediadores exercem papéis importantes na indução de quimiocinas e na produção de outras citocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos, como a IL-6 e o TNF- γ (Meda, Gasperini *et al.*, 1994; Jablonska, Kiluk *et al.*, 2002; Datta, Novotny *et al.*, 2010)

Para investigar se IL-1R exerce papel direto nos neutrófilos avaliamos o perfil de ativação dessas células. Entretanto, de maneira inesperada, observamos que a

ausência de IL-1R não altera a expressão de moléculas como CD62L e CD69 em neutrófilos do baço durante a sexta semana de infecção. O CD62L (L-selectina) é expresso de maneira constitutiva na superfície do polimorfo e participa ativamente dos mecanismos de rolamento e adesão ao endotélio, uma vez que a clivagem desse marcador tem sido associado a ativação celular (Von Andrian, Chambers *et al.*, 1993; Hafezi-Moghadam, Thomas *et al.*, 2001). Estudo *in vitro* investigando a capacidade de migração transendotelial dos eosinófilos, demonstrou que IL-1 β induz eficiente proteólise de L-selectina (Ebisawa, Bochner *et al.*, 1992). Já o CD69 é uma glicoproteína de membrana expressa em timócitos imaturos, neutrófilos, eosinófilos, células NK e em linfócitos, o qual possui funções relacionadas a proliferação e transdução de sinal (Ziegler, Ramsdell *et al.*, 1993; Ziegler, Ramsdell *et al.*, 1994).

Outro parâmetro avaliado em nosso modelo, foi a capacidade dos neutrófilos em produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) quando estimulados *in vitro* por *L. infantum*. A geração de ROS por células do sistema fagocitário é um dos mecanismos mais eficientes no controle das leishmanioses. Trabalho de 2015, demonstrou que a inibição de ROS em monócitos infectados por *L. braziliensis* permitiu o crescimento de promastigotas viáveis no sobrenadante na cultura (Carneiro, Conceicao *et al.*, 2016). Em relação aos neutrófilos, Falcão (2015) encontrou resultados semelhantes, visto que a exposição dessas células à infecção por *Leishmania* induziu forte produção de espécies reativas de oxigênio (Falcao, Weinkopff *et al.*, 2015). Alguns pesquisadores tem sugerido o envolvimento da sinalização via IL-1R na geração de ROS. Nesse sentido, na infecção por *T. cruzi*, a liberação de IL-1 β via inflamassoma (ASC/Caspase-1) promoveu intensa produção de ROS, conferindo resistência aos macrófagos humanos e murinos (Dey, Sinha *et al.*, 2014). No entanto, nesse estudo evidenciamos que neutrófilos geneticamente deficientes para IL-1R produzem quantidades similares de

ROS que os WT, o que nos levou a descartar o envolvimento de IL-1 na ativação do polimorfonuclear.

Enquanto que IL-1R não interfere no perfil de ativação de neutrófilos, macrófagos geneticamente deficientes para IL-1 α e infectados com *L. infantum* possuem maior produção de NO. De modo interessante, a ausência de IL-1R não interferiu nesse aspecto. Esse dado suporta a nossa hipótese de que IL-1 α desempenha papel mais importante do que IL-1 β em conferir suscetibilidade na LV, visto que a ausência de IL-1 α /IL-1 β (pela deleção gênica do receptor IL-1R) não alterou a produção de NO, enquanto apenas a ausência de IL-1 α potencializou esse perfil de resposta. Lima-Junior et al, (2013) já haviam demonstrado que IL-1 β induz proteção na *L. amazonensis*, atuando juntamente com o IFN- γ na produção de óxido nítrico em macrófagos infectados (Lima-Junior, Costa *et al.*, 2013). Em modelo de sepse em ratos, os autores descreveram que a administração de IL-1Ra (antagonista de IL-1R) diminuiu drasticamente a produção de NO no líquido cefalorraquidiano dos animais (Wahab, Tazinafo *et al.*, 2015). Dessa maneira, acreditamos que o nosso trabalho demonstra pela primeira vez que IL-1 α atua como um regulador negativo sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos.

O estudo sobre o mecanismo pelo qual a sinalização via IL-1R promove suscetibilidade na infecção por *L. infantum* nos levou a investigar a produção de citocinas de perfil regulador no nosso modelo. Já se sabe que a IL-10 possui função inibitória sobre a resposta imunologia, o que mantém o controle homeostático em alguns processos inflamatórios (Fiorentino, Bond *et al.*, 1989). No entanto, diversos trabalhos tem sugerido a participação dessa citocina na exacerbação das leishmanioses (Belkaid, Hoffmann *et al.*, 2001; Kane e Mosser, 2001; Buxbaum, 2013; Bhowmick, Ravindran *et al.*, 2014; Buxbaum, 2015). Assim, encontramos forte associação entre os

mecanismos de regulação conferidos pela sinalização de IL-1R e a produção de IL-10, visto que animais *knockouts* possuem acentuada diminuição dessa citocina no fígado durante a sexta semana de infecção. Em conformidade com os nossos achados, Souza e col (2003) evidenciaram em modelo de lesão isquêmica, que o bloqueio de IL-1R afeta potencialmente a produção de IL-10 (Souza, Guabiraba *et al.*, 2003). Na infecção por *L. major* a produção de IL-10 é dependente da sinalização via IL-1R, visto que a deleção gênica do receptor diminuiu a produção dessa citocina no local de lesão nos animais (Charmoy, Hurrell *et al.*, 2016). Em 2007, foi demonstrado que a administração de IL-1 β recombinante em camundongos infectados com *L. amazonensis*, induziu forte aumento na produção de IL-10 nesses grupos de animais (Xin, Li *et al.*, 2007).

Conclusão

6) Conclusão

Em conjunto, no presente trabalho demonstramos que a sinalização via IL-1R, com prevalente papel de IL-1 α , promove suscetibilidade na infecção experimental por *Leishmania infantum*. Os mecanismos pelo qual a progressão da doença são induzidas estão relacionados com regulação positiva de IL-10, diminuída resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e IL-17, falha na migração de neutrófilos para o sítio infeccioso e regulação negativa na produção de óxido nítrico por macrófagos.

Referências Bibliográficas

- AL MOUSSAWI, K.; KAZMIERCZAK, B. I. Distinct contributions of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and IL-1beta to innate immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 10, p. 4204-11, Oct 2014.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunol Lett**, v. 99, n. 1, p. 17-23, Jun 15 2005.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 18, p. 2993-3002, Sep 1999.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334-+, Apr 2008.
- ANDRADE, M. F. et al. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 387-94, Feb 2013.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, Sep-Oct 1996.
- BADARO, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003-11, Dec 1986.
- BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502-7, Dec 5 2002.
- BELKAID, Y. et al. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 8, p. 3992-4000, Apr 15 2002.
- BELKAID, Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 10, p. 1497-506, Nov 19 2001.
- BERDA-HADDAD, Y. et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 51, p. 20684-9, Dec 20 2011.
- BHATTACHARYA, P. et al. Induction of IL-10 and TGFbeta from CD4+CD25+FoxP3+ T Cells Correlates with Parasite Load in Indian Kala-azar Patients Infected with *Leishmania donovani*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 2, p. e0004422, Feb 2016.
- BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. IL-4 contributes to failure, and colludes with IL-10 to exacerbate *Leishmania donovani* infection following administration of a subcutaneous leishmanial antigen vaccine. **Bmc Microbiology**, v. 14, p. 8, 2014.

BIONDO, C. et al. Essential Role of Interleukin-1 Signaling in Host Defenses Against Group B Streptococcus. **Mbio**, v. 5, n. 5, Sep-Oct 2014.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, p. 17-26, Feb 2000.

BORASCHI, D.; TAGLIABUE, A. The interleukin-1 receptor family. **Semin Immunol**, v. 25, n. 6, p. 394-407, Dec 15 2013.

BUFFET, P. A. et al. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 9, p. 2167-8, Sep 1995.

BUXBAUM, L. IL-10 from T cells, but not macrophages is required for chronic disease in *Leishmania mexicana* infection. **Journal of Immunology**, v. 190, May 1 2013.

BUXBAUM, L. U. Interleukin-10 from T Cells, but Not Macrophages and Granulocytes, Is Required for Chronic Disease in *Leishmania mexicana* Infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1366-1371, Apr 2015.

CAFFREY, A. K. et al. IL-1 alpha Signaling Is Critical for Leukocyte Recruitment after Pulmonary *Aspergillus fumigatus* Challenge. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 1, Jan 2015.

CARLSEN, E. D. et al. Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance. **J Innate Immun**, v. 7, n. 4, p. 354-63, 2015.

CARLSEN, E. D. et al. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 182, n. 2, p. 109-18, Nov 2015.

CARNEIRO, P. P. et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Plos One**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 2016.

CHANG, J. et al. MyD88 is essential to sustain mTOR activation necessary to promote T helper 17 cell proliferation by linking IL-1 and IL-23 signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 6, p. 2270-5, Feb 5 2013.

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

CHINTAKUNTLAWAR, A. V.; CHODOSH, J. Chemokine CXCL1/KC and its receptor CXCR2 are responsible for neutrophil chemotaxis in adenoviral keratitis. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 10, p. 657-66, Oct 2009.

CILLARI, E. et al. Enhancement of macrophage IL-1 production by *Leishmania major* infection in vitro and its inhibition by IFN-gamma. **Journal of Immunology**, v. 143, n. 6, p. 2001-5, Sep 15 1989.

CONTROL OF THE LEISHMANIASES Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 Introduction. **Control of the Leishmaniasis**, v. 949, p. Xii+, 2010.

COOPER, A. M.; KHADER, S. A. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. **Trends Immunol**, v. 28, n. 1, p. 33-8, Jan 2007.

CURRY, A. J.; KAYE, P. M. Recombinant interleukin-1 alpha augments granuloma formation and cytokine production but not parasite clearance in mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 10, p. 4422-6, Oct 1992.

DANESHBOD, Y. et al. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. **Arch Pathol Lab Med**, v. 135, n. 4, p. 478-82, Apr 2011.

DATTA, S. et al. IL-17 regulates CXCL1 mRNA stability via an AUUUA/tristetraprolin-independent sequence. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1484-91, Feb 1 2010.

DAVID, C. et al. Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, n. 1, p. 7-9, Jan-Feb 1993.

DELFINO, D. et al. Induction of interleukin 1 alpha in murine macrophages infected in vitro with different species and strains of *Leishmania*. **Microb Pathog**, v. 18, n. 2, p. 73-80, Feb 1995.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 305-18, Sep 2004.

DEY, N. et al. Caspase-1/ASC inflammasome-mediated activation of IL-1beta-ROS-NF-kappaB pathway for control of *Trypanosoma cruzi* replication and survival is dispensable in NLRP3-/- macrophages. **Plos One**, v. 9, n. 11, p. e111539, 2014.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-32, Apr 7 2011.

DINARELLO, C. A. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. **J Allergy Clin Immunol**, v. 103, n. 1 Pt 1, p. 11-24, Jan 1999.

EBISAWA, M. et al. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. I. Role of endothelial and eosinophil adhesion molecules in IL-1 beta-induced transendothelial migration. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 12, p. 4021-8, Dec 15 1992.

ENGLEN, M. D. et al. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Expressed and Secreted in Cultures of Murine L929 Cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 2, p. 281-283, Aug 18 1995.

FALCAO, S. A. et al. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003601, Mar 2015.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. 2 Types of Mouse T-Helper Cell .4. Th2 Clones Secrete a Factor That Inhibits Cytokine Production by Th1 Clones. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081-2095, Dec 1 1989.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-1018, Dec 12 2013.

GOTO, H.; DAS GRACAS, M. Immunoactivation and Immunopathogeny during Active Visceral Leishmaniasis. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241-246, Sep-Oct 2009.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 293-307, Jun 2012.

GULER, R. et al. Blocking IL-1 alpha but not IL-1 beta increases susceptibility to chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 6, p. 1339-1346, Feb 1 2011.

HAFEZI-MOGHADAM, A. et al. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 7, p. 863-72, Apr 2 2001.

HILL-BATORSKI, L. et al. Loss of Interleukin 1 Receptor Antagonist Enhances Susceptibility to Ebola Virus Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, p. S329-S335, Oct 1 2015.

HIRAHARA, K. et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 21, n. 6, p. 425-34, Dec 2010.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: Biology of the parasite. **Journal of Infection**, v. 39, n. 2, p. 101-111, Sep 1999.

HURRELL, B. P. et al. Rapid Sequestration of Leishmania mexicana by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 5, p. e1004929, May 2015.

JABLONSKA, E. et al. Priming effects of GM-CSF, IFN-gamma and TNF-alpha on human neutrophil inflammatory cytokine production. **Melanoma Res**, v. 12, n. 2, p. 123-8, Apr 2002.

JONES, D. A. et al. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. **Biophys J**, v. 65, n. 4, p. 1560-9, Oct 1993.

JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A. Interleukin-1beta in innate inflammation, autophagy and immunity. **Semin Immunol**, v. 25, n. 6, p. 416-24, Dec 15 2013.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, Jan 15 2001.

KAUTZ-NEU, K. et al. IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in Leishmania-resistant mice. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 1, p. 77-78, Jan 2011.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117-21, Nov 3 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 604-15, Aug 2011.

KILLICKKENDRICK, R. Phlebotomine Vectors of the Leishmaniases - a Review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, Jan 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, May-Jun 1999.

KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 7, p. 1830-5, Jul 2010.

KOPF, M. et al. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 3, p. 1127-36, Sep 1 1996.

KOSTKA, S. L. et al. Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania major* infections. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 7, p. 1582-9, Jul 2006.

KRELIN, Y. et al. Interleukin-1 beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. **Cancer Res**, v. 67, n. 3, p. 1062-1071, Feb 1 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. Dermal and Visceral Leishmaniasis and Their Causative Agents. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 4, p. 702-703, 1987.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol**, v. 11, n. 5, p. 210-4, May 2003.

LEE, P. Y. et al. IL-1alpha modulates neutrophil recruitment in chronic inflammation induced by hydrocarbon oil. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 3, p. 1747-54, Feb 1 2011.

LEE, Y. S. et al. Interleukin-1 (IL-1) Signaling in Intestinal Stromal Cells Controls KC/CXCL1 Secretion, Which Correlates with Recruitment of IL-22-Secreting Neutrophils at Early Stages of *Citrobacter rodentium* Infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 8, p. 3257-3267, Aug 2015.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4794-7, Jun 15 1990.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4306-10, Dec 15 1990.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-15, Jul 2013.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039-46, Mar 1 2009.

LYONS, S.; VEEKEN, H.; LONG, J. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. **Tropical Medicine & International Health**, v. 8, n. 8, p. 733-9, Aug 2003.

MARHABA, R. et al. Opposing effects of fibrosarcoma cell-derived IL-1 alpha and IL-1 beta on immune response induction. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 1, p. 134-145, Jul 1 2008.

MASCARENHAS, D. P. A. et al. Interleukin 1 Receptor-Driven Neutrophil Recruitment Accounts to MyD88-Dependent Pulmonary Clearance of Legionella pneumophila Infection In Vivo. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 2, p. 322-330, Jan 15 2015.

MATTHEWS, D. J. et al. IL-13 is a susceptibility factor for Leishmania major infection. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1458-1462, Feb 1 2000.

MCFARLANE, E. et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with Leishmania donovani. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 532-541, Feb 2008.

MEDA, L. et al. Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon. **Cell Immunol**, v. 157, n. 2, p. 448-61, Sep 1994.

MURPHY, M. L. et al. IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 10, p. 2848-56, Oct 2001.

MURPHY, P. M. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. **Semin Hematol**, v. 34, n. 4, p. 311-8, Oct 1997.

NASCIMENTO, M. S. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against Leishmania infantum infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015-26, Mar 15 2015.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 88-102, Oct 2007.

O'DONNELL, H. et al. Toll-like receptor and inflammasome signals converge to amplify the innate bactericidal capacity of T helper 1 cells. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 213-24, Feb 20 2014.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection. **Trends Parasitol**, v. 31, n. 12, p. 653-64, Dec 2015.

O'NEILL, L. A.; GREENE, C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. **J Leukoc Biol**, v. 63, n. 6, p. 650-7, Jun 1998.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. **Immunological Reviews**, v. 213, p. 159-79, Oct 2006.

PIOLI, P. A. et al. Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 11, p. 6647-55, Jun 1 2006.

PITTA, M. G. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani. **J Clin Invest**, v. 119, n. 8, p. 2379-87, Aug 2009.

QUIRINO, G. F. et al. Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 8, p. 2289-98, Aug 2016.

RIDER, P. et al. IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 9, p. 4835-43, Nov 1 2011.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Development of Infective Stage Leishmania Promastigotes within Phlebotomine Sand Flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 3, p. 456-459, 1985.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 11, p. 845-58, Nov 2002.

SACRAMENTO, L. et al. Toll-like receptor 9 signaling in dendritic cells regulates neutrophil recruitment to inflammatory foci following Leishmania infantum infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 12, p. 4604-16, Dec 2015.

SACRAMENTO, L. A. et al. Protective role of 5-lipoxygenase during Leishmania infantum infection is associated with Th17 subset. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 264270, 2014.

SANZ, M. J.; KUBES, P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 278-83, Feb 2012.

SCHARTON-KERSTEN, T. et al. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5320-30, May 15 1995.

SCHUMACHER, C. et al. High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 21, p. 10542-6, Nov 1 1992.

SHAW, S. E.; LANGTON, D. A.; HILLMAN, T. J. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector? **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 281-285, Aug 26 2009.

SINGER, M.; SANSONETTI, P. J. IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of Shigella-induced colitis. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 6, p. 4197-206, Sep 15 2004.

SOLLBERGER, G. et al. Caspase-1: the inflammasome and beyond. **Innate Immun**, v. 20, n. 2, p. 115-25, Feb 2014.

SOUZA, D. G. et al. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 9, p. 4759-66, May 1 2003.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1065-78, Mar 2012.

STRAZZULLA, A. et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 805108, 2013.

SUTTON, C. et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1685-1691, Jul 10 2006.

TERRAZAS, C. et al. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **Faseb Journal**, v. 30, n. 3, p. 1135-43, Mar 2016.

THEODOS, C. M. et al. The effect of treating with anti-interleukin-1 receptor antibody on the course of experimental murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 16, n. 11, p. 571-7, Nov 1994.

THOMAS, H. E. et al. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. **Diabetes**, v. 51, n. 2, p. 311-6, Feb 2002.

TITUS, R. G. et al. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol**, v. 7, n. 5, p. 545-55, Sep 1985.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 641-4, Nov 2003.

VIGANO, E.; MORTELLARO, A. Caspase-11: the driving factor for noncanonical inflammasomes. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 9, p. 2240-5, Sep 2013.

VILLERET, B. et al. Blockade of IL-1R signaling diminishes Paneth cell depletion and *Toxoplasma gondii* induced ileitis in mice. **Am J Clin Exp Immunol**, v. 2, n. 1, p. 107-16, 2013.

VON ANDRIAN, U. H. et al. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. **Blood**, v. 82, n. 1, p. 182-91, Jul 1 1993.

VONK, A. G. et al. Endogenous interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 10, p. 1419-1426, May 15 2006.

VORONOV, E. et al. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. **International Immunology**, v. 22, n. 4, p. 245-257, Apr 2010.

WAHAB, F. et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases cerebrospinal fluid nitric oxide levels and increases vasopressin secretion in the late phase of sepsis in rats. **Endocrine**, v. 49, n. 1, p. 215-21, May 2015.

WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Selective release of a processed form of interleukin 1 alpha. **Cytokine**, v. 6, n. 6, p. 597-601, Nov 1994.

WHO (2010) Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. WHO Technical Report Series

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB-dendritic cell subset and priming Leishmania amazonensis-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 5018-26, Oct 2007.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-69, Sep 1 2008.

ZIEGLER, S. F. et al. Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1643-8, Jul 1993.

ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M. R. The activation antigen CD69. **Stem Cells**, v. 12, n. 5, p. 456-65, Sep 1994.