

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

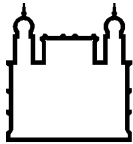
Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

**Influência dos inflamassomos AIM2, NLRP3 e da carga parasitária na
patogênese da leishmaniose tegumentar americana por
Leishmania (Viannia) braziliensis: estudo de preditores de prognóstico**

REGINA BARBOSA MOREIRA

Rio de Janeiro

Março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Regina Barbosa Moreira

**Influência dos inflamassomos AIM2, NLRP3 e da carga parasitária na
patogênese da leishmaniose tegumentar americana por
Leishmania (Viannia) braziliensis: estudo de preditores de prognóstico**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária

Orientadora: Profa. Dra. Claude Pirmez

RIO DE JANEIRO

Março de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M838 Moreira, Regina Barbosa

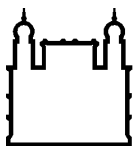
Influência dos inflamassomos AIM2, NLRP3 e da carga parasitária na patogênese da leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: estudo de preditores de prognóstico / Regina Barbosa Moreira. – Rio de Janeiro, 2017.
xviii, 105 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Bibliografia: f. 72-101

1. Imunidade inata. 2. Leishmaniose tegumentar americana. 3. LTA. 4. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 5. Inflamassomos. 6. NLRP3. 7. AIM2. 8. Carga parasitária. 9. Fatores prognósticos. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: REGINA BARBOSA MOREIRA

**Influência dos inflamassomos AIM2, NLRP3 e da carga parasitária na
patogênese da leishmaniose tegumentar americana por
Leishmania (Viannia) braziliensis: estudo de preditores de prognóstico**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Claude Pirmez

Aprovada em: 13/03/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Kátia da Silva Calabrese – (IOC) Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dra. Fátima da Conceição Silva – (IOC)

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello – (UERJ)

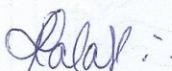
Rio de Janeiro, 13 de março de 2017

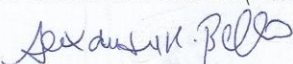


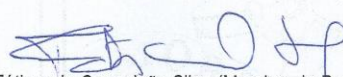
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Regina Barbosa Moreira**, sob orientação da Dr^a. Claude Pirmez. Ao décimo terceiro dia do mês de março de dois mil e dezessete, realizou-se às dez horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Influência dos inflamassomos AIM2, NLRP3 e da carga parasitária na patogênese da leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: estudo de preditores de prognóstico”** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Katia da Silva Calabrese - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Alexandre Ribeiro Bello - UERJ/RJ, Dr^a. Fátima da Conceição Silva - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Fernanda Nazare Morgado - IOC/FIOCRUZ e Dr. Luis Carlos Crocco Afonso – UFOP/MG. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 13 de março de 2017.


Dr^a. Katia da Silva Calabrese (Presidente da Banca):


Dr. Alexandre Ribeiro Bello (Membro da Banca):


Dr^a. Fátima da Conceição Silva (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

*Aos meus queridos pais Ivone e
Aroldo, a quem devo a minha vida e a
minha dignidade*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFRJ pela minha liberação. Fui pela Universidade acolhida há muitas décadas e lá permaneço! Obrigada a todos que viabilizaram o meu afastamento no DRH e na Reitoria.

Ao programa de Pós-Graduação da Biologia Parasitária, representado pelo seu coordenador Raphael Macieira, à secretária Rita pela sua competência e gentileza e a todos os outros funcionários da Secretaria que me atenderam com atenção e presteza.

Ao meu querido e jamais esquecido Wilhelm. A sua inteligência, competência e infinita bondade salvaram a minha existência.

À minha querida amiga Luiza, que me pegou literalmente pela mão e me ensinou com toda a paciência do mundo, muitas vezes a mesma coisa, até que não restasse dúvidas. Ao me inserir na rotina do laboratório, me ajudou a gostar da nova atividade que me pareceu tão difícil.

À sempre companheira Tainah, presente e atenta. Eu não sei como fazia, mas sempre adivinhava as minhas necessidades e providenciava com capricho e eficiência, antes de eu pedir, as soluções para os meus problemas.

À Marcia que me acolheu no laboratório. Fica registrado o meu agradecimento.

À Claude Pirmez generosa ao me aceitar como orientanda.

À Káris, por tudo que fez por mim em várias ocasiões. Fica aqui registrada a minha eterna gratidão.

Ao meu querido irmão Rodolpho, que sempre me socorre com carinho nas minhas dúvidas em edições de texto.

À galera da torcida Carla Aparecida, Ester Francisca e Denise Vigo e Rosimar Baptista. Eu sempre as senti perto de mim.

À minha querida professora Maria José pelo seu estímulo para eu continuar tentando.

Aos funcionários do Cardozo Fontes, todos prestativos e aos atenciosos colegas do LIPMED.

À Biblioteca da Fiocruz (ICIT), especialmente ao José Ricardo e Alessandra que gentilmente me atenderam com atenção e cordialidade.

À minha querida e amável filha, pela ajuda na formatação da tese.

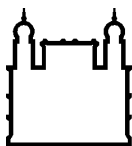
Agradeço à Dra. Kátia Calabrese pela atenção, amabilidade e correção cuidadosa da tese.

À minha querida amiga Magna pela ajuda na elaboração da apresentação da tese.

Ao Criador e a todos que me inspiraram nesta última etapa profissional.

“Da árvore do silêncio pende seu fruto, a paz”.

Arthur Schopenhauer



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Influência dos inflamassomos AIM2, NLRP3 e da carga parasitária na patogênese da leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: estudo de preditores de prognóstico

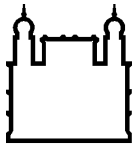
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Regina Barbosa Moreira

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por grande variedade de espécies do gênero *Leishmania*. A LTA apresenta intenso polimorfismo clínico, que pode variar desde quadro assintomático, até lesões desfigurantes. No Brasil *L. (V.) braziliensis* é a espécie dermatrópica mais amplamente distribuída.

Até recentemente a abordagem dos fatores imunes relacionados à LTA era quase que restrita ao estudo da imunidade adquirida. Entretanto, a relação entre parasita e hospedeiro começa a ser definida já na fase inicial da infecção, regida pela imunidade inata. Esta resposta é mediada nos fagócitos profissionais que interagem, entre outros, com um conjunto de receptores não clonais, denominados de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), destinados a reagir aos padrões moleculares relacionados aos patógenos (PAMP), ou padrões moleculares relacionados ao perigo (DAMP). Os inflamassomos canônicos são um conjunto de receptores citosólicos, que ao serem ativados por PAMP ou DAMP, iniciam um processo de montagem de plataforma proteica responsável pela ativação autocatalítica da pró-caspase-1, que irá ativar a IL-1 β e IL-18. O objetivo deste trabalho foi avaliar fatores preditores de evolução de doença através da análise dos inflamassomos canônicos AIM2 e NLRP3 e IL-1 β tanto *in vitro* como *in vivo* e a carga parasitária *in vivo*. Os estudos *in vivo* abordaram culturas de queratinócitos humanos HaCat e células de linhagem monocítica humana THP1 transformadas em macrófagos, cocultivadas com a cepa infectiva código internacional MHOM/BR/2000/LTCP-13396 de *L. (V.) braziliensis*. Nestes ensaios não foi possível relacionar as coculturas com a expressão gênica do NLRP3, AIM2 ou IL-1 β . Avaliamos ainda, lesões ativas de pacientes com LTA no Rio de Janeiro, área endêmica de *L. (V.) braziliensis* e relacionamos com apresentação clínica e resposta à terapia com Glucantime®. Na PCR em tempo real, a expressão gênica do AIM2 foi mais baixa na leishmaniose cutânea localizada, comparada com a forma mucosa. Houve uma redução da expressão do AIM2 nos pacientes com a leishmaniose cutânea localizada com boa resposta ao tratamento quando comparados com a pele normal, indicando que nesta forma deve haver um mecanismo de inibição da expressão do AIM2. Na análise pela imunohistoquímica observamos significativo aumento percentual de células AIM2⁺ em pacientes com má resposta ao tratamento, quando comparados aos pacientes que responderam bem ao tratamento. Encontramos ainda, um predomínio de células AIM2⁺, comparadas com células NLRP3⁺, demonstrando que o AIM2 foi mais abundante do que o NLRP3. Embora a expressão gênica do NLRP3 tenha sido detectada em cerca de 77% dos casos, foi possível visualizar células NLRP3⁺ em apenas 25% das amostras. Na literatura, a produção e a atividade do GP63, fator de virulência expresso nas espécies de *Leishmania*, vem sendo associada à uma redução da secreção da IL-1 β , possivelmente em decorrência da clivagem do NLRP3. Logo, o GP63 pode estar relacionado à escassez de células NLRP3⁺. Os nossos dados demonstram que o AIM2 é um inflamassomo importante na LTA e está diretamente associado à gravidade das lesões. Avaliamos também a carga parasitária pela PCR em tempo real com a quantificação absoluta utilizando a subunidade menor de *Leishmania* do gene RNA (SSR). Não encontramos uma relação entre a carga parasitária e os achados clínicos, mas os nossos dados confirmam a afirmação anterior de que infecções crônicas por *L. (V.) braziliensis* se associam com parasitismo escasso.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

The influence of the AIM2, NLRP3 and parasitic load in the pathogenesis of American cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (V.) braziliensis*: a study of prognostic predictors

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITOLOGICAL BIOLOGY

Regina Barbosa Moreira

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is caused by a great variety of *Leishmania* species and presents a great clinical pleomorphism. It varies in severity, from asymptomatic, to disfiguring and even fatal forms. In Brazil, *L. (V.) braziliensis* is the most widely distributed dermatotropic species.

Mostly works about immune response evaluation have been including factors restricted to acquired immune response. Still, the host-parasite relationship begins in the early phase of the infection, that is orchestrated by innate immune system. This response is mediated mostly by phagocytes and, among others, by a set of non-clonal receptors on cytosol, named pattern recognition receptors (PRR), that interact to pathogens-associated molecular patterns (PAMPs), or danger-associated molecular patterns (DAMPs). These events assemble a cytosolic proteic platform, named canonical inflammasome, that recruit and activates caspase-1. This enzyme activates IL-1 β and IL-18.

The objective of this work was to evaluate predictive factors of disease through the analysis of canonical inflammasomes AIM2 and NLRP3 and IL-1 β both *in vitro* and *in vivo* and the parasite load *in vivo*. The *in vitro* assay evaluated the inflammasomes AIM2, NLRP3 and IL-1 β in human keratinocytes HaCaT and in human lineage monocyte THP1 cell, co-cultivated with infective *L. (V.) braziliensis*, international code MHOM/BR/2000/LTCP-13396. It was not possible to relate these co-cultures with the gene expression of NLRP3, AIM2 or IL-1 β . We also evaluated the gene expression by real-time PCR, and the protein abundance by immunohistochemistry of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes in active lesions from patients in Rio de Janeiro state, an endemic area of ATL caused by *L. (V.) braziliensis*. Additionally, it was compared these findings with clinical presentation and response to therapy with Glucantime®. The real-time PCR showed lower AIM2 in cutaneous leishmaniasis, compared to mucosal leishmaniasis. Furthermore, the AIM2 gene expression was downregulated on good responders, compared to normal skin samples. This last result indicates that, in good responders, there is a mechanism, not described yet, of inhibition of expression of this receptor. By immunohistochemistry, there was a higher percentage of AIM2⁺ cells in poor responders, compared with good responders. It was also found, a predominance AIM2⁺ cells, compared to the NLRP3⁺ cells. Therefore, in this series the AIM2 is more abundant than the NLRP3 on ATL. The gene expression of NLRP3 was present in about 77% of samples tested, but cells NLRP3⁺ were visualized in only 25% of the fragments by immunohistochemistry. From literature review, the activity of the metalloprotease GP63, a virulence factor expressed by *Leishmania* species, was associated with a reduction of IL-1 β secretion, possibly due to a cleavage of the NLRP3 inflammasome. Thus, the GP63, may be related with scarcity of NLRP3⁺ cells on clinical samples. Our data indicate that the NLRP3 was not related to the clinical forms or with groups of response to therapy. Taken together, our data demonstrated that AIM2 is an important inflammasome in ATL and is directly associated with severity of lesions. It was also evaluated the parasite load by absolute quantification real-time PCR. *Leishmania* small subunit RNA gene (SSR) was used to access parasite load. It was not found a relation of parasite load and clinical outcomes, but our data provided contribution to previous statement that chronic *L. (V.) braziliensis* infections corresponded to scarce parasitism.

SUMÁRIO

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Resposta Imune na LTA.....	6
1.1.1 Resposta Imune Adquirida	6
1.1.2 Resposta Imune Inata.....	12
1.1.3 AIM2	19
1.1.4 NLRP3	20
1.1.5 Regulação Negativa dos Inflamassomos.....	25
1.1.6 Vias de Ativação dos Inflamassomos	26
1.1.7 Mecanismos de Defesa da Pele	28
1.1.8 Inflamassomos na LTA	31
1.1.9 Influência da Carga Parasitária na Patogenia da LTA.....	33
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Ensaios <i>in vitro</i>	35
3.1.1 Cultura de Parasitos	35
3.1.2 Cultura de Células (HaCaT e THP1).....	36
3.1.3 PCR em Tempo Real dos Ensaios <i>in vitro</i>	37

3.2 Casuística dos Pacientes no Estudo dos Inflamassomos	38
3.3 Expressão Relativa do AIM2, NLRP3, caspase-1 e ASC nas Amstras Clínicas	39
3.3.1 Isolamento do RNA e Síntese do cDNA	39
3.3.2 Escolha dos Iniciadores (“primers”)	40
3.3.3 PCR em Tempo Real.....	41
3.4 Técnica da Imunohistoquímica do NLRP3, AIM2 e ASC	41
3.5 Avaliação da carga parasitária na LTA	43
3.5.1 Casuística dos Pacientes no Estudo da Carga Parasitária.....	43
3.5.2 Parasitas e Células humanas	44
3.5.3 Isolamento de DNA.....	45
3.5.4 Escolha dos Iniciadores (“primers”)	45
3.5.5 PCR em Tempo Real.....	46
3.6 Análise Estatística	47
4. RESULTADOS	48
4.1 Expressão Gênica do AIM2 e NLRP3 em HaCaT.....	48
4.2 Expressão gênica do AIM2, NLRP3 e IL-1 β em THP1	48
4.3 Aspectos Clínicos e Demográficos dos Pacientes relacionados aos Inflamassomos	50
4.4 Expressão Relativa <i>in situ</i> do AIM2, NLRP3, ASC e caspase-1	51
4.5 Imunohistoquímica do AIM2, NLRP3, ASC.....	53
4.6 Imunohistoquímica da IL-1 β	55
4.7 Aspectos Clínicos e Demográficos dos Pacientes Relacionados à Carga Parasitária	55
4.8 Ensaio de Quantificação do Parasita	57
4.9 Carga Parasitária Tissular de <i>L. (V.) braziliensis</i> nas Formas Clínicas e Respostas ao Tratamento	57

4.10 Carga Parasitária Tissular de <i>L. (V.) braziliensis</i> Correlacionada com o Tempo de Evolução	59
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. ANEXO	102
9. ARTIGO ACEITO PARA A PUBLICAÇÃO NO IJID	
10. ARTIGO SUBMETIDO PARA A PUBLICAÇÃO	

Índice de Tabelas e Figuras

Figura 1.1	Representação esquemática da organização estrutural dos inflamassomos	18
Figura 1.2	Representação esquemática dos inflamassomos NLRP3 e AIM2	22
Tabela 3.1	Iniciadores (“primers”) da PCR em tempo real para AIM2, NLRP3, ASC, caspase-1 e GAPDH humanos em amostras clínicas e ensaios <i>in vitro</i>	41
Tabela 3.2	Iniciadores (“primers”) da SSR de <i>Leishmania</i> spp. e β -actina humana (ACT) para a quantificação da carga parasitária em amostras clínicas	46
Quadro 4.1	Valores da qPCR em tempo real das expressões gênicas para AIM2 e NLRP3 em ensaios <i>in vitro</i> com queratinócitos humanos (HaCaT) cocultivados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	48
Figura 4.1	Representação gráfica esquemática das expressões relativas dos genes AIM2, NLRP3 e IL-1 β em ensaios <i>in vitro</i> com células THP1 transformadas em macrófagos infectadas com <i>L. (V.) braziliensis</i>	49
Tabela 4.2	Dados demográficos, clínicos e evolutivos dos pacientes com LTA em estudo dos inflamassomos	50
Figura 4.2	Representação gráfica e esquemática das expressões relativas dos genes AIM2, NLRP3, ASC e caspase-1 em amostras clínicas	52
Figura 4.3	Imagens representativas e representação gráfica de fragmentos de lesão por <i>L. (V.) braziliensis</i> submetidos à imunohistoquímica para avaliação do AIM2, NLRP3 e ASC em lesões por <i>L. (V.) braziliensis</i> e a sua relação com as formas clínicas e respostas aos tratamentos	54
Figura 4.4	Imagens representativas e gráficas de fragmentos de lesão por <i>L. (V.) braziliensis</i> submetidos à técnica da histoquímica para avaliação da IL-1 β na LM e na LCL e nas respostas ao tratamento	55
Figura 4.5	Representação gráfica dos dados demográficos, clínicos e evolutivos dos pacientes com LTA em estudo da carga parasitária	56
Figura 4.6	Representação gráfica da razão entre o equivalente de parasitas por massa de DNA humano em lesões por <i>L. (V.) braziliensis</i>	58
Figura 4.7	Representação gráfica do equivalente de parasitas por massa de DNA humano com a LTA	59

Lista de Siglas e Abreviaturas

aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ASC	Proteína “speck” associada à apoptose contendo domínio recrutador e ativador de caspase-1 (“apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-1 activation and recruitment domain”)
ATP	Adenosina trifosfato (“adenosine triphosphate”)
CD	Grupamento de diferenciação (“cluster of differentiation”)
DAMP	Padrão molecular associado ao perigo (“danger-associated molecular pattern”)
Foxp3 ⁺	Marcador molecular de Células T reguladoras “Forkhead box P3”
GAPDH	Glyceraldeído-3-fosfato desidrogenase <i>Homo sapiens</i> (“Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (“Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”)
GP63	Metaloprotease GP-63 (“metalloprotease GP-63”)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (“human immunodeficiency virus”)
IDRM	Reação intradérmica de Montenegro
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida (“inducible oxide nitric synthetase”)
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas-Fiocruz
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto (“kinetoplatic deoxyribonucleic acid”)
LC	Células de Langerhans (“Langerhans cells”)
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LIPMED	Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas-IOC
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea

LOD	Limite de detecção (“limit of detection”)
LRC	Leishmaniose recidiva cútis
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LPS	Lipopolissacarídeo de membrana das bactérias Gram negativas
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos (“macrophage colony stimulator factor”)
MLEE	Eletroforese de enzimas multilocus (“multilocus enzyme eletrophoresis”)
mtDAMP	Padrões moleculares associados ao perigo mitocondrial (“mitochondrial danger associated molecular pattern”)
mtROS	Espécies reativas de oxigênio mitocondrial (“mitochondrial reactive oxygen species”)
MYD-88	Fator de diferenciação mielóide-88 (“myeloid differentiation primary response gene-88”)
MSU	Monofosfato de uréia (“monophosphate urea”)
MS	Ministério da Saúde
NET	Redes neutrofílicas extracelulares (“neutrophil extracellular traps”).
NFκB	Fator nuclear κB (“nuclear factor κB”)
NK	Células assassinas naturais (“natural killer cells”)
NNN	Meio de cultura para <i>Leishmania</i> (Novy-MacNeal-Nicolle)
NO	Óxido nítrico (“nitric oxide”)
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/” World Health Organization”
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”)
PMA	Acetato de miristato forbol (“Phorbol-12-myristate-13-acetate”)
PAMP	Padrão molecular associado aos patógenos (“pathogens-associated molecular pattern”)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (“peripheral blood mononuclear cells”)
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões (“pattern

recognition receptors”).

PBS	Tampão fosfato salino (“Phosphate Buffered Saline”)
qPCR	PCR em tempo real quantitativo (“quantitative real-time PCR”)
RFLP	Polimorfismos dos sítios de restrição (“restriction site polymorphisms”)
RNA	Ácido ribonucleico (“ribonucleic acid”)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (“reactive oxygen species”)
RT-PCR	PCR em tempo real com transcrição reversa (“real-time reverse transcription PCR”)
SSR	Subunidade menor do gene de RNA ribossomal (“small subunit ribosomal RNA gene”)
TAE	Tampão Tris-acetato
T-bet	Fator de transcrição do tipo T-box
TCR	Receptores de células T (“T cells receptors”)
TGF- β	Fator de crescimento e de transformação β (“transforming growth factor β ”)
THP-1	Linhagem de células humanas de origem monocítica
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α (“tumoral necrosis fator- α ”)
TLR	Receptores da superfície celular ou dos endossomos tipo Toll (“Toll like receptors”).
TLR4	Receptor tipo Toll-4 (“Toll like receptor-4”).
T _{H1}	T auxiliador tipo 1 (“T helper 1”)
T _{H2}	T auxiliador tipo 2 (“T helper 2”)
T _{H17}	T auxiliador tipo 17 (“T helper 17”)
TRAF	Fatores receptores associados ao TNF (“TNF receptor associated factors”)
T _{Reg}	T auxiliador tipo regulador (“T helper regulator”)

1. Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* que são transmitidos para os mamíferos, inclusive para o homem, através dos flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) (Rangel & Lainson, 2003). Apresentam distribuição mundial, estão em expansão ao redor do mundo e a OMS/WHO (Organização Mundial de Saúde) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção, com 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea ao ano. São autóctones nas Américas e quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem nas fronteiras entre Bolívia, Brasil e Peru. Em 2014 Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão foram responsáveis por mais de 90% dos casos novos reportados a OMS/WHO (WHO, 2016). Os conflitos armados que provocam grandes movimentos populacionais, introduzem indivíduos suscetíveis em regiões onde há transmissão ativa da doença, provocando assim um aumento do número de casos (Desjeux, 2001; Berry & Berrang-Ford, 2016). Na América do Sul e, principalmente no Brasil, este processo de expansão também tem sido verificado, com o aparecimento de novos focos urbanos da doença. Na década de 1980 houve a notificação de casos autóctones em 19 estados, enquanto que no ano de 2003, foi confirmada a autoctonia em todas as Unidades Federadas do Brasil. Atualmente a leishmaniose tegumentar americana (LTA), é considerada um problema de Saúde Pública no Brasil (BRASIL, 2013). As alterações no meio ambiente em várias regiões do país, permitindo que haja a invasão de áreas peridomiciliares por mamíferos silvestres reservatórios de *Leishmania* spp., modificam o perfil epidemiológico das leishmanioses. Por este motivo, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a espécie mais amplamente distribuída no Brasil e as outras espécies oriundas destes locais recém desmatados, lideram os casos de leishmaniose tegumentar em nosso país (Aguilar *et al.*, 1989; Grimaldi *et al.*, 1989; Rangel & Lainson, 2003; BRASIL, 2013).

Leishmania spp. é um parasita digenético (heteroxeno), cujo ciclo vital se passa no hospedeiro vertebrado e no invertebrado, apresentando-se sob duas formas evolutivas: amastigotas e promastigotas. As primeiras são formas arredondadas, com flagelos inaparentes, que se localizam nos vacúolos

parasitóforos de células fagocitárias dos vertebrados, sobretudo nos macrófagos. As promastigotas, formas flagelares, tanto se desenvolvem no tubo digestório do inseto vetor como em culturas à temperatura ambiente. Ambas as formas possuem o cinetoplasto, que corresponde a uma mitocôndria modificada, contendo uma grande quantidade de DNA circular, com uma região conservada, comum a todo o gênero, e uma região variável (Grimaldi & Tesh, 1993). Estas características genéticas são importantes para a determinação da evolução das espécies (Degraeve *et al.*, 1994; Yurchenko *et al.*, 1999).

Estes parasitas fazem parte da família Trypanosomatidae, sendo descritas até o momento cerca de 30 espécies de *Leishmania* capazes de infectar os mamíferos. São divididas em dois subgêneros: no subgênero *Leishmania*, o desenvolvimento no flebotomíneo ocorre no tubo digestório médio e anterior; e nas espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* ocorre um desenvolvimento adicional no tubo digestório posterior (Lainson & Shaw, 1987 apud Cupolillo *et al.*, 1994). No Brasil, a leishmaniose tegumentar pode ser causada por seis espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, assim como por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (da Silva *et al.*, 2010), sendo observada uma maior diversidade de espécies na Amazônia (Rangel & Lainson, 2003). O método considerado padrão-ouro para a caracterização das espécies é a eletroforese de enzima multilocus (MLEE), que apresenta como principal dificuldade de execução, a necessidade de isolamento prévio do parasita em cultura (Cupolillo *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2010). Os métodos com base na PCR (reação em cadeia da polimerase) são utilizados para detectar quantidades mínimas de DNA do parasito. O DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp., é o alvo mais eficiente para detectar raros parasitas (Degraeve *et al.*, 1994; Yurchenko *et al.*, 1999; da Silva *et al.*, 2010).

Em hospedeiros mamíferos, o flebotomíneo libera, no sítio da picada, um conjunto de moléculas farmacológicas, imunomodulatórias e imunogênicas que exercem efeitos imediatos e duradouros no hospedeiro. A disponibilidade, nos dias atuais de técnicas de alto desempenho (“high-throughput performance”), principalmente através de transcriptomas específicos nos tecidos, tem facilitado a identificação destas moléculas do vetor, que tem a capacidade de afetar o

desenvolvimento do parasita, a sua capacidade de transmissão e o seu potencial para estabelecer a infecção no hospedeiro vertebrado (Oliveira *et al.*, 2009).

Na leishmaniose tegumentar americana a interação entre o vetor, o parasita e o hospedeiro, determina uma variedade de formas clínicas e diferentes evoluções da doença em decorrência do tratamento (revisto por Reithinger *et al.*, 2007; revisto por Kaye & Scott, 2011). O Ministério da Saúde sugere a classificação clínica baseada na fisiopatogenia a partir da picada do vetor, o aspecto e as localizações das lesões, incluindo as infecções inaparentes e a leishmaniose linfonodal. As doenças se apresentam nas formas clínicas de leishmaniose cutânea e de leishmaniose mucosa. Listamos, portanto, as formas clínicas e as suas principais características (BRASIL, 2013):

Infecção inaparente – ocorre em indivíduos moradores ou oriundos de área endêmica, sem lesões, nem história prévia de lesão, mas que apresentam dados laboratoriais ou a reação intradérmica de Motenegro (IDRM) positivos.

Leishmaniose linfonodal – observa-se apenas linfadenopatia satélite sem a associação com lesões cutâneas.

A leishmaniose cutânea manifesta-se de diferentes maneiras:

Leishmaniose cutânea (LC) - geralmente afeta as partes do corpo descobertas, que são acessíveis ao flebotomíneo. Após um período de incubação que varia entre uma semana até três meses, ocorre no sítio de inoculação uma pápula avermelhada, que se transforma em lesão nodular, evoluindo para úlcera, de contornos bem delimitados, com bordas induradas e elevadas, indolor e que, na maioria das vezes, cura sem necessitar do tratamento específico, mas costuma deixar cicatriz atrófica. Mais raramente são observadas lesões pápulo-tuberosas ou lesões vegetantes. As formas cutâneas são subdivididas em:

Leishmaniose cutânea localizada (LCL) – poucas lesões cutâneas ou mais comumente lesão única;

Leishmaniose disseminada (LD) - é causada muitas vezes por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Existe ainda a forma disseminada associada à aids. Esta forma se caracteriza pela multiplicidade de lesões com associação entre

lesões cutâneas e mucosa (Marsden, 1990; Grimaldi & Tesh, 1993; Carvalho *et al.*, 1994; Grevelink & Lerner, 1996; Oliveira-Neto & Matos, 2006);

Leishmaniose cutânea difusa (LCD) - No Brasil, é causada pela *L. (L.) amazonensis*. É uma doença grave, que em sua fase ativa induz anergia cutânea aos antígenos de *Leishmania* spp. pela deficiência específica da imunidade do tipo celular (BRASIL, 2013). A disseminação desta doença ocorre pela difusão por contiguidade de uma lesão cutânea ativa ou cicatricial (Silveira *et al.*, 2008). As lesões de pele são numerosas, nodulares, eritematosas. Nesta forma, a associação com as lesões mucosas ocorrem em até 1/3 dos casos e as lesões ulceradas são raras (Carvalho *et al.*, 1994). São difíceis de tratar, necessitando de medicamentos com doses mais elevadas e por um tempo maior e os parasitas são visualizados em abundância. Apesar do tratamento adequado os episódios de recidivas são frequentes (Marsden, 1986; Carvalho *et al.*, 1994). A forma cutânea disseminada ocorre em até 2% dos casos, e é causada predominantemente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Apresenta lesões múltiplas, podendo ocorrer lesão mucosa concomitante, podendo neste caso ser denominada de leishmaniose mucocutânea (LMC). A disseminação se dá por via hematogênica e/ou linfática. Nesta forma, se observa um parasitismo mais baixo, quando comparado ao parasitismo da forma cutânea difusa (Carvalho *et al.*, 1994);

Leishmaniose recidiva cútis (LRC) - a lesão inicial evolui para cicatrização, ocorrendo posteriormente reativação localizada, geralmente na borda da lesão.

Leishmaniose mucosa (LM) - observada nas Américas, é secundária à lesão cutânea inicial, com período de latência que pode variar de meses a anos. Na leishmaniose por *L. (V.) braziliensis* observa-se a ocorrência de lesão mucosa em 3 a 5% dos casos. É responsável por lesões deformantes de face, afeta com maior frequência a mucosa nasal, que inicialmente apresenta infiltração associada ao edema, seguida de lesões ulceradas e cursa, em alguns casos, com a perfuração do septo nasal. Pode acometer ainda os lábios, as bochechas e nas formas mais graves de LM observa-se lesão no palato mole, na faringe e/ou na laringe (Marsden, 1990; Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2008; BRASIL, 2013). A espécie predominante na LM é *L. (V.) braziliensis* (Carvalho *et al.*, 1994; de Oliveira Neto *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2008).

O medicamento de primeira linha para o tratamento das leishmanioses é o antimonial pentavalente, disponível comercialmente em duas formulações que são: o estibogluconato de sódio (Pentostan®; Burroughs Wellcome); e o antimoniato de meglumina (Glucantime®; Rhone Poulenc). Este último é o medicamento disponível no Brasil (Marsden, 1985; BRASIL, 2013). Outras drogas indicadas, tais como, a pentamidina e a Anfotericina B apresentam limitações ao uso muito semelhantes às do Glucantime®. Opções menos tóxicas vem sendo introduzidas, tais como, a Anfotericina B lipossomal (AmBisome®, Nextar Pharmaceuticals), a miltefosina oral e a paramomicina, com melhor tolerância aos efeitos colaterais além de se apresentarem como boas opções em caso de resistência. O custo elevado e refratariedade em algumas regiões são fatores limitantes para o uso destes fármacos em larga escala (Oliveira-Neto & Matos, 2006; Alvar *et al.*, 2006).

No estado do Rio de Janeiro a LTA é endêmica, sendo causada por *L. (V.) braziliensis*. A característica mais marcante nesta região é a evolução clínica benigna na maioria dos casos e uma excelente resposta ao tratamento com o antimoniato de meglumina. Os dados de um estudo de coorte realizado no Instituto Nacional de Infectologia (INI-Fiocruz-RJ), demonstrou que a forma mais frequente de apresentação de doença, totalizando 87,2% dos casos, foi a leishmaniose cutânea localizada (LCL), com o predomínio de lesão única. O acometimento mucoso (LM) foi encontrado em 12,7% dos casos. Destes casos, apenas 3,5% dos pacientes desenvolveram a forma mucocutânea (LMC) ou disseminada. Esta última modalidade foi associada à ausência de tratamento ou tratamento incompleto na fase inicial. Quando o tratamento foi precocemente introduzido para tratar as lesões primárias, houve uma redução do número de pacientes com o envolvimento de mucosas, que ocorreu em apenas 0,4% dos casos. Nesta região, o esquema com baixas doses de antimoniato de meglumina, de 5mg/Kg/dia, aplicada via intramuscular por trinta dias, foi tão eficiente quanto à dose padrão do Glucantime® recomendada pelo Ministério da Saúde de 20mg/Kg/dia por três a quatro semanas (Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Oliveira-Neto & Matos, 2006; BRASIL, 2013). A grande vantagem da dose reduzida, além do menor risco de ocorrência de efeitos adversos, é a facilidade de condução do tratamento, que pode ser realizado em regime ambulatorial.

O esquema de tratamento da leishmaniose tegumentar, em qualquer área diferente da área do Rio de Janeiro, é o preconizado pelo MS: 1) Leishmaniose Cutânea – antimoniato de meglumina na dose de 10 a 20 mg/Sb/Kg por dia por 20 dias; 2) Leishmaniose cútis difusa - antimoniato de meglumina na dose de 20 mg/Sb/Kg/dia por no mínimo 20 dias (BRASIL, 2013).

1.1 Resposta imune na leishmaniose tegumentar americana

1.1.1 Resposta imune adquirida

Nos seres humanos a infecção por *Leishmania* spp. se inicia com a picada do flebotomíneo infectado. Na pele, as formas promastigotas metacíclicas infectantes são internalizadas por células fagocíticas locais, tais como, macrófagos, células de Langerhans (LC), ou neutrófilos, se transformando, nos fagossomos, nas formas amastigotas intracelulares obrigatórias (revisto por Laskay *et al.*, 2003; De Trez *et al.*, 2009; revisto por Gollob *et al.*, 2014). Embora esses parasitas possam ser encontrados facilmente nos neutrófilos, há evidências de que as principais células responsáveis pelos eventos relacionados à infecção são os macrófagos (Peters *et al.*, 2008; Conceição *et al.*, 2016). A maioria dos estudos que aborda a sobrevivência dos parasitas no meio intracelular utiliza as formas promastigotas que, ao que tudo indica, inibem a incorporação dos lisossomos aos fagossomos. As células dendríticas após sofrerem ativação, migram pela via linfática e ao atingirem os gânglios linfáticos, apresentam antígenos do protozoário às células T CD4⁺ e T CD8⁺ (revisto por Kaye & Scott, 2011; revisto por Gollob *et al.*, 2014).

Na LTA à semelhança do que ocorre com outras infecções por parasitas intracelulares, é observada uma grande variedade de formas clínicas, desde a infecção assintomática, até a infecção disseminada (revisto por Kaye & Scott, 2011). Estas formas clínicas apresentam um caráter de bipolaridade. No polo anérgico, se encontra a forma cutânea difusa também se encontra nesta modalidade de resposta imune. No polo hiperérgico, se encontra a forma mucosa, onde se observa uma resposta imunológica exacerbada. Entre estes dois polos, está a leishmaniose cutânea que, com maior frequência, evolui com lesão única e tende à cura espontânea (Bomfim *et al.*, 1996).

Os processos envolvidos na imunopatogênese da leishmaniose tegumentar podem ser estudados através de modelos experimentais com animais infectados por várias espécies de *Leishmania*, de estudos *in vitro* com cultura de células e de estudos em seres humanos (Yardley & Croft, 1999; revisto por Reithinger *et al.*, 2007). Os parâmetros clássicos utilizados para avaliar a imunopatogenia na leishmaniose tegumentar são diversos e incluem a avaliação da intensidade da proliferação *in vitro* após o estímulo com antígenos de *Leishmania* spp. em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados; aferição da reação intradérmica de Montenegro, que avalia a resposta imune celular do tipo retardada; análise da produção *in vitro* de Interleucinas (IL); Fatores estimuladores de colônias de células de origem hematopoiética (CSF); Fator de necrose tumoral α (TNF- α); Fator de necrose tumoral β (TNF- β); Interferons (IFN) entre outros (Kupper, 1990, revisto por Reithinger *et al.*, 2007; revisto por Gollob *et al.*, 2014).

Estudos experimentais em modelos animais para a avaliação da resposta imune, são úteis ao estabelecer uma analogia com a infecção natural humana. No entanto, estes modelos apresentam limitações, principalmente pelo fato de não ser possível criar condições semelhantes à infecção natural ao se utilizar hospedeiro com comportamento imunológico diferente do ser humano (Alexander & Bryson, 2005; revisto por Reithinger *et al.*, 2007; revisto por Kaye & Scott, 2011).

Na leishmaniose tegumentar há uma boa correlação entre a forma clínica e a resposta de hipersensibilidade retardada, que é aferida através da reação intradérmica de Montenegro (IDRM). Nas formas regressivas, que apresentam uma evolução clínica benigna, observa-se uma forte reação, enquanto que nos pacientes com as formas recorrentes, a IDRM é fracamente positiva. Nos pacientes com recaída, a IDRM é mais fraca, quando comparada às dos pacientes com reinfecção (Bosque *et al.*, 2000). Na fase ativa das leishmanioses difusas, os pacientes não reagem aos antígenos de *Leishmania* spp. (anergia cutânea) (revisto por Reithinger *et al.*, 2007) e nos pacientes com leishmaniose mucosa ocorre uma resposta à reação intradérmica de Montenegro maior, quando comparada à leishmaniose cutânea localizada (Pirmez *et al.*, 1993; Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998; Sassi *et al.*, 1999). A resposta *in vitro* aos antígenos de

Leishmania spp. pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em indivíduos infectados, onde se observa a proliferação e a produção de citocinas por estas células, incluindo o IFN- γ , também é útil para a avaliação da resposta imune. Nos pacientes com a forma mais branda da doença, a leishmaniose cutânea localizada, ocorre uma tendência à resposta proliferativa e produção do IFN- γ , predominando, portanto, a resposta do tipo T_{H1}. Os pacientes com recaída apresentam pouca resposta proliferativa, liberação de baixas concentrações de IFN- γ e altas concentrações de IL-4, a principal citocina da resposta do tipo T_{H2} (Ajday *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2016). Naqueles pacientes que apresentam a forma difusa, há uma queda seletiva relacionada a *Leishmania* spp. da imunidade mediada por células. Observa-se nestes casos que em sua fase ativa, não há a expressão do IFN- γ , mas sim a expressão da IL-2, IL-4 e IL-10. Após o tratamento, com a regressão transitória da doença, ocorre a expressão do IFN- γ e baixas concentrações da IL-10. Embora haja uma associação entre o aparecimento da expressão do INF- γ e a melhor resposta clínica, este fator isoladamente não é suficiente para prevenir recaídas nestes pacientes. Nesta forma, é descrita ainda anergia cutânea à reação intradérmica de Montenegro e a ausência de resposta de proliferação específica dos PBMC (revisto por Reithinger *et al.*, 2007).

O modelo classicamente utilizado de dicotomia da resposta imune adquirida em resposta do tipo T_{H1} ou resposta do tipo T_{H2} é muito simplificado. Os eventos relacionados ao controle da infecção, ou à progressão da doença vem se revelando mais complexos, à medida em que surgem novos conhecimentos da imunidade adquirida (revisto por Reithinger *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2016). A resposta do tipo T_{H2} caracteriza-se pela secreção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β , que inibem da ativação dos macrófagos, além de impedirem a secreção de citocinas inflamatórias, exercendo, portanto, uma importante função de redução dos danos nos tecidos afetados, mas facilitando a sobrevivência dos parasitas nas lesões (Scott, 2005; revisto por Lazarevic & Glimcher, 2011; revisto por Kaye & Scott, 2011). A polarização da resposta T_{H2} nunca explicou totalmente a gravidade da leishmaniose humana e um número de subconjuntos de células T, incluindo as células T_{Reg} e as células T_{H17} apresentam papéis importantes na suscetibilidade e na resistência, tanto na leishmaniose experimental, como na

leishmaniose humana (revisado por Nylen & Gautam, 2010). Na forma mucosa, ocorre uma mistura entre a resposta T_{H1} e T_{H2} , com elevados níveis de IL-2, IL-4, IL-5 e de TNF- α , o que pode explicar a incapacidade de evolução para a cura espontânea, pois a resposta T_{H2} tende a predominar quando os dois tipos de respostas são ativados (Scott, 2005; revisado por Reithinger *et al.*, 2007). A resposta T_{H1} se caracteriza pela transcrição e tradução da IL-12, IFN- γ , TNF- α e pela regulação negativa (inibição), da produção da IL4, IL-10, IL-13 e do fator de crescimento e transformação- β (TGF- β) (Scott, 2005; revisado por Gollob *et al.*, 2014).

As células T derivadas de uma única linhagem de linfócitos T $CD4^+$ podem se diferenciar em células T “helper” T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} e T_{Reg} , dependendo da expressão dos fatores de transcrição específicos para cada linhagem. Distintas células T “helper” possuem a habilidade de produzir um conjunto diferente de citocinas. A expressão do fator de transcrição T-bet na resposta do tipo T_{H1} , induz a síntese de IFN- γ , que exerce a ação mais potente na ativação dos macrófagos e das células dendríticas (Ajday *et al.*, 2000). Este tipo de resposta se associa à uma evolução mais favorável de doença por micro-organismos intracelulares, podendo ocorrer inclusive uma cura espontânea, além de estimular a produção de anticorpos pelos linfócitos B e a expansão clonal de linfócitos T citotóxicos (revisado por Fearon & Locksley, 1996; revisado por Kaye & Scott, 2011). Ao ocorrer uma falha na expressão do T-bet, observa-se uma resposta T_{H1} deficiente, havendo predisposição às infecções mais graves, mas por outro lado, a expressão em excesso deste fator de transcrição provoca o surgimento de doenças autoimunes (revisado por Lazarevic & Glimcher, 2011). O T-bet exerce ainda um papel chave na regulação da migração, proliferação e sobrevivência das células T_{Reg} . Estas células são divididas em duas categorias: células T reguladoras $Foxp3^+$ natural (nT_{Reg}) e células T_{Reg} induzíveis (iT_{Reg}), que são geradas na periferia. Ambas as populações são fontes de IL-10 (Anderson *et al.*, 2005) e antagonizam a resposta inflamatória limitando o dano tissular, estando relacionadas à tolerância aos parasitas em células da pele e em outras superfícies epiteliais (Belkaid *et al.*, 2002). As células T_{H17} e T_{Reg} exercem funções importantes na indução e no controle da resposta inflamatória. Estes subconjuntos de células T apresentam um grau mais alto de plasticidade quanto à sua decisão de diferenciação quando

comparadas com as células T convencionais, responsáveis pela resposta T_{H1} e T_{H2} , capacitando-as a responder à diferentes sinais que ocorrem nos ambientes que ocupam (revisto por Nylen & Gautam, 2010). A produção de IL-10 ocorre em uma grande variedade de células, incluindo entre outras, a célula T reguladora $CD4^+ CD25^+$ (Belkaid *et al.*, 2002), células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ (Belkaid *et al.*, 2001), células B (Ronet *et al.*, 2010) e células NK (Maroof *et al.*, 2008). A ausência de células T_{Reg} é observada em condições autoimunes (revisto por Nylen & Gautam, 2010).

As células T_{H17} atuam como células pró inflamatórias e secretam a IL-17 exercendo funções que conectam a imunidade adaptativa à inata. A IL-17 estimula a produção da IL-1 β , responsável pelo recrutamento principalmente dos neutrófilos e em menor escala dos monócitos para o sítio de infecção (Korn *et al.*, 2007). As doenças autoimunes estão relacionadas à superexpressão desta citocina (Chung *et al.*, 2009; revisto por Lazarevic & Glimcher, 2011; Taberkiewicz *et al.*, 2015). A resposta T_{H17} atua na proteção de superfícies corpóreas que entram em contato com o meio externo, exercendo ações contra bactérias extracelulares e fungos (revisto por Nylen & Gautam, 2010) e provavelmente por este motivo, é induzida na leishmaniose mucosa (Boaventura *et al.*, 2010; Maretti-Mira *et al.*, 2012). As células T_{H17} e as células NK produzem ainda a IL-22 que estimula a produção de peptídeos antimicrobianos (revisto por Nylen & Gautam, 2010; revisto por Sonnenberg *et al.*, 2011). A avaliação da secreção da IL-17 nos PBMC pela PCR em tempo real nos pacientes com leishmaniose por *L. (L.) braziliensis* detectou níveis mais elevados desta citocina nas amostras dos indivíduos com infecção subclínica, quando comparadas com pacientes com a doença (LCL), sugerindo a participação da T_{H17} no controle da infecção (Novoa *et al.*, 2011).

O fator nuclear kappa B (NF κ B) é um fator de transcrição que coordena a expressão de uma grande gama de genes importantes para o funcionamento da resposta imune. Ao ser ativado por uma variedade de estímulos, incluindo patógenos, sinais de estresse e citocinas inflamatórias, tais como as espécies reativas de oxigênio (ROS), TNF e IL-1, sofre a translocação para o núcleo, onde se liga ao seu DNA cognato (revisto por Li & Verma, 2002; revisto por Ghosh & Dass, 2016). Este fator regula tanto a resposta imune inata como a adaptativa

(Imler & Hoffmann, 2000) e está envolvido, entre outras coisas, na produção da IL-18 e do IFN- γ , que são necessários para a execução das funções das células T_{H1} (Kojima *et al.*, 1999). Exerce ainda, papel importante na proliferação dos linfócitos. É um dos fatores mais importantes para a regulação da expressão de genes pró-inflamatórios induzindo a transcrição de citocinas inflamatórias, quimiocinas, metaloproteinases (MMP), ciclo-oxigenases (COX2) e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) (Tak & Firestein, 2001). Atua ainda na ativação da inflamação, sendo responsável pela expressão dos inflamassomos canônicos NLRP3, AIM2 e pela expressão da pró-IL-1 β (Hornung *et al.*, 2009). Paradoxalmente o NF κ B exerce também função anti-inflamatória, mediada pela superexpressão do receptor de autofagia p62, responsável pelo que reconhecimento e remoção das mitocôndrias danificadas (Zhong *et al.*, 2016).

A resolução da LTA ocorre principalmente pela reposta imune mediada por célula e não por imunidade humoral (revisto por Reithinger *et al.*, 2007). O processo de cura da lesão em todas as espécies de *Leishmania* é geralmente associado à formação de granulomas (revisto por Kaye & Beattie, 2016). A manutenção por longo prazo das células T de memória ocorre pela apresentação contínua de antígenos, que é possível porque alguns parasitas podem permanecer nas lesões cicatriciais (Schubach *et al.*, 1998). Esta não eliminação completa do parasita concorre para a estimulação da resposta imune antígeno específica para *Leishmania* spp. impedindo assim a reinfecção (Coutinho *et al.*, 2002).

Os linfócitos T CD8⁺ parecem exercer uma função de prevenção à reinfecção (Muller *et al.*, 1993). Foi ainda proposto por Novais e colaboradores que, a morte celular, ao liberar padrões moleculares associados ao perigo (DAMP), age como “feedback” positivo potencializando os linfócitos T CD8⁺ (Novais *et al.*, 2015).

1.1.2 Resposta imune inata

O sistema imune inato é responsável pela rápida detecção e eliminação dos micro-organismos patogênicos. No decorrer do processo da evolução das espécies, manteve a sua função original, mas vem sofrendo constantes mudanças em decorrência da pressão seletiva imposta pelos patógenos. Ao adquirir novas funções, desenvolveu gradativamente mecanismos que permitiram uma interação com a resposta imune adaptativa, que ocupa posição mais recente na escala evolutiva e é encontrada apenas nos organismos vertebrados. A resposta imune constitutiva reconhece os agentes invasores, identifica-os como estranhos e os elimina seletivamente, preservando de danos o seu próprio corpo (Medzhitov & Janeway, 1997; revisto por Martinon *et al.*, 2009; revisto por Liu & Cao, 2016). Os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), são derivados de componentes essenciais para a sobrevivência dos micro-organismos e por este motivo, são conservados evolutivamente. Sendo assim temos o ácido teicóico que é encontrado na parede de todas as bactérias gram positivas, os lipopolissacárides (LPS) presentes na parede das bactérias gram negativas, o RNA de dupla hélice existente nos vírus RNA e as mananas que fazem parte da parede celular dos fungos (Medzhitov & Janeway, 1997; Herwald & Egesten, 2016). Para os protozoários, o espectro de moléculas conhecidas por estimular o sistema imune inato é mais extenso (revisto por Clay *et al.*, 2014). Os componentes da parede celular ativam a imunidade inata, por exemplo as lipofosfoglicanas (LPG) da *Leishmania (L.) donovani*, inibem a resposta inflamatória dos macrófagos (Descoteaux *et al.*, 1992; revisto por Geiger *et al.*, 2016). Embora os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) não possuam a capacidade de distinguir os micro-organismos como patogênicos ou comensais pois ambos produzem PAMP, apenas os germes patogênicos desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, mecanismos para obterem acesso aos compartimentos do meio interno do hospedeiro, onde os PRR são capazes de detectá-los deflagrando uma resposta imune (Medzhitov & Janeway, 2002). A vigilância por meio destes receptores exerce um monitoramento do espaço extracelular e dos compartimentos subcelulares para a detecção de sinais relacionados à infecção, ao dano ou a outro estressor celular (revisto por Latz *et al.*, 2013). A resposta imune inata é mediada principalmente

por neutrófilos e macrófagos, que são responsáveis pela fagocitose e pela destruição dos micro-organismos. Além disso, pela sua capacidade de produzir uma grande variedade de mediadores inflamatórios e citocinas, a imunidade inata, atua também na coordenação de outra modalidade de resposta. A expressão de um conjunto de quimiocinas derivadas dos macrófagos tissulares residentes altera a expressão de receptores para quimiocinas nas células dendríticas, induzindo a sua migração via linfática. Nas fases mais avançadas da resposta imune, a indução de um conjunto de quimiocinas potencializa o recrutamento de células do sistema imune inato para os sítios de inflamação (revisto por Luster, 2002).

Os eventos da fase inicial da resposta imune frente à infecção, dependem da resposta imune constitutiva ou inata, mas a resolução do processo infeccioso ocorre através da resposta imune adaptativa (Aderem & Ulevitch, 2000; Bosque *et al.*, 2000; Otvos, 2016).

A Inflamação é definida como a resposta do hospedeiro à agentes infecciosos, danos tissulares ou a irritantes celulares. Os sinais clínicos clássicos da inflamação são: rubor; calor, tumor e dor (revisto por Stutz *et al.* 2009; revisto por Kulkarni *et al.*, 2016). A Interleucina-1 é a principal mediadora da resposta imune inata. São sete os componentes desta família: IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ . Todas as células do sistema imune inato ou expressam estas citocinas ou são afetadas por membros desta família. Além disto, estas citocinas exercem funções na diferenciação de células linfóides (revisto por Garlanda *et al.*, 2013). Observa-se uma homologia tridimensional entre a IL-18 e as citocinas da família IL-1 (Takeda *et al.*, 1998). A transcrição da pró-IL-1 β é induzida pela ativação do NF κ B, enquanto que a pró-IL-18 é constitutivamente expressa e aumenta após a ativação celular. A resposta inflamatória é mediada principalmente pela IL-1 β e pela IL-18, responsáveis pelo estabelecimento de uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa. Estas duas citocinas são produzidas no citoplasma em suas formas inativas, sendo nesta fase denominadas de pró-IL-1 β e pró-IL-18 e necessitam da ativação que ocorre através da proteólise pela caspase-1 recrutada pelos inflamassomos canônicos (Dinarello, 1998; Guey & Pétrilli, 2016). Os mecanismos de controle da transcrição e da liberação da IL-1 β em mamíferos são essenciais, pois a liberação não modulada desta citocina pode ser extremamente deletéria, e por este motivo, as duas etapas consecutivas de

ativação por meio da maturação da pró-caspase-1 e subsequente ativação da citocina são importantes para evitar os efeitos indesejáveis de sua ativação exagerada (revisto por Stutz *et al.*, 2009; revisto por Kulkarni *et al.*, 2016). A IL-18, também denominada fator indutor de IFN- γ (Monteforte *et al.*, 2000), promove ainda a proliferação de células T_{H1} e a ativação de células NK (Okamura *et al.*, 1995; Dinarello, 1998; Compajen *et al.*, 2000). É capaz ainda, de ativar as vias clássicas da IL-1 tais como myD88, TRAF e NF κ B. Em modelos experimentais de infecção de *L. (L.) major*, a IL-18 parece promover a produção do IFN- γ , no entanto, um efeito de pró-polarização da resposta T_{H1}, só ocorre quando as células são inicialmente sensibilizadas pela IL-12 (Takeda *et al.*, 1998). A IL-1 α também pode ativar o receptor da interleucina-1 (IL-R1), contribuindo para a resposta inflamatória *in vivo*. A IL-1 α , ao contrário da IL-1 β , é expressa constitutivamente em muitas linhagens celulares e, embora seja objeto de controvérsia, parece não precisar ser processada para exercer sua atividade biológica. Logo, esta forma, mesmo não ativada, é capaz de promover a resposta inflamatória no microambiente extracelular, ao ser liberada pela necrose celular. A IL-1 α também é secretada em resposta a numerosos ativadores do NLRP3, mas sua liberação não é estritamente dependente deste inflamassomo (Dostert *et al.*, 2013; revisto por Latz *et al.*, 2013). Níveis muito altos de IL-1 β e IL-18 provocam resposta imune exacerbada, estando associados ao choque séptico, às doenças autoimunes ou degenerativas (Dinarello, 1998; Schulte *et al.*, 2013.). O principal efeito da IL-1 no sistema nervoso central é a febre. Observa-se ainda a hipotensão arterial associada à vasodilatação, o estímulo à hematopoese e à angiogênese, a ativação dos linfócitos, a atração e extravasamento para o meio extracelular dos leucócitos, e a síntese dos anticorpos (Garlanda *et al.*, 2013). Esta citocina, produzida principalmente pelos monócitos e macrófagos, é também responsável pelo prolongamento da vida e pelo estímulo às funções efetoras dos neutrófilos e macrófagos (Reiner, 1987; Mantovani *et al.*, 2011). A IL-1 induz moléculas de adesão no endotélio vascular, estimula a produção e a liberação de quimiocinas que resultam no recrutamento de leucócitos, aprimorando a resposta imune inata (revisto por Uthaisangsook *et al.*, 2002). Estas citocinas controlam a diferenciação e a função das células linfóides do sistema imune adaptativo (revisto por Garlanda *et al.*, 2013). Um papel proeminente da IL-1 β na imunidade

adaptativa é o estímulo para a diferenciação de células T para a resposta T_{H17} (Kryczek *et al.*, 2007; revisto por Mills *et al.* 2013). A IL-33 está envolvida principalmente na resposta imune do tipo T_{H2}. Parece exercer uma importante função na manutenção da homeostase da pele, através de um efeito inibitório, ou seja, de redução da lesão tecidual que ocorre, por exemplo, após a exposição aos raios UVB. No entanto, este efeito ao longo prazo, pode ser facilitador para o câncer de pele (Byrne *et al.*, 2011). A IL-33, liberada por células necróticas, é necessária para uma potente resposta de linfócitos T CD8⁺ (Bonilla *et al.*, 2012).

As caspases foram inicialmente identificadas como enzimas mediadoras da apoptose, principal mecanismo de morte celular (Cohen, 1997). Posteriormente, foram identificadas as caspases inflamatórias, que exercem funções diferentes, pois após sofrerem um processo autoproteolítico, são responsáveis pela ativação catalítica das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18. Nos seres humanos, as caspases inflamatórias conhecidas são a caspase-1, caspase-4 e caspase-5 (Martinon & Tschopp, 2005; revisto por Kerse *et al.*, 2007). Além das atividades relacionadas à IL-1 β e à IL-18, esta enzima inativa a IL-33, que é ativada pela calpaína (revisto por Martinon *et al.*, 2009; revisto por Stutz *et al.*, 2009).

Os inflamassomos são assim denominados por serem capazes de ativar a resposta inflamatória. São receptores compostos por um conjunto de proteínas com alto peso molecular, solúveis no citoplasma e que funcionam como um dos mediadores da resposta imune inata (Martinon *et al.*, 2002; revisto por Martinon *et al.*, 2009; revisto por Stutz *et al.*, 2009). Denominados também de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), funcionam como sensores citosólicos de moléculas específicas dos patógenos, geradas após degradação de micro-organismos invasores. Os PRR são expressos em células dos vertebrados, tais como células epiteliais e células efectoras do sistema imune inato, predominantemente neutrófilos e macrófagos, que geralmente são as primeiras células a interagir com os patógenos durante a fase inicial da infecção (revisto por Uthaisangsook *et al.*, 2002). Após esta etapa de reconhecimento dos agentes invasores, ocorre a ativação autocatalítica da caspase1 via aposição de dois ou mais de seus monômeros, deflagrando processo inflamatório, que irá tentar eliminar a ameaça ainda no sítio primário de infecção (Cohen, 1997; revisto por Medzhitov, 2008; revisto por Stutz *et al.*, 2009). Além disto, a ativação dos

inflamassomos causa uma rápida forma pró-inflamatória de morte celular, denominada de piroptose, com características mistas entre apoptose e necrose. A indução da lise celular ocorre por um processo rápido que envolve condensação nuclear com fragmentação de DNA, degradação da actina e uma perda da integridade da membrana celular pela formação de poros (revisado por Stutz *et al.*, 2009; Broz *et al.* 2010a; revisado por Latz *et al.*, 2013). A piroptose pode ser muito importante para eliminar os patógenos intracelulares, através da exposição destes, aos mecanismos mais robustos de defesa extracelulares (Broz *et al.*, 2010a). Além dos PAMP, os padrões moleculares associados ao perigo (DAMP), também denominados de alarminas, são liberados após a lesão celular. A ativação dos inflamassomos pelos PAMP ou DAMP funciona tanto como estímulo para o recrutamento de mais células do sistema imune ao sítio de infecção, como também para dar início ao processo de reparo tecidual (revisado por Medzhitov, 2008). Os primeiros PRR descobertos foram o tipo Toll (TLR), que são os receptores localizados na superfície celular ou nos endossomos. Após o descobrimento destes receptores foram identificadas duas outras famílias: os receptores do tipo NOD (NLR); e os RIG-helicases (RLH). Os NLR, também denominados de inflamassomos, vem assumindo cada vez mais importância (Meylan *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2005; Johnson & Gale, 2006; Van Opendenbosch *et al.*, 2014). A função de uma grande parte dos inflamassomos é ainda desconhecida, no entanto, a sua importância na estratégia de defesa é sinalizada pelo fato de serem expressos em células que atuam na fase inicial da resposta imune, tais como células epiteliais, neutrófilos, assim como macrófagos e células dendríticas residentes (Cohen, 1997; revisado por Medzhitov, 2008; Van Opendenbosch *et al.*, 2014).

A família dos NLR é transcrita a partir de um conjunto de 22 genes humanos. Há pelo menos três membros destas subfamílias, NLRP1, NLRP3 e NLRC4 que são conhecidos por sua capacidade de montar uma plataforma de grande peso molecular e são capazes de ativar a caspase-1. Embora o AIM2 não contenha a proteína NLR, é considerado um inflamassomo. Cada uma destas plataformas proteicas é ativada por estímulos diferentes (Schroder & Tschopp, 2010; revisado por Clay *et al.* 2014). Os inflamassomos canônicos mais

bem caracterizados são NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 e PYRIN (revisado por Lamkanfi & Dixit, 2014).

As células epiteliais, que configuram nos seres humanos, a primeira barreira contra as bactérias expressam os inflamassomos NOD1, NOD2, NLRP3 e NAIP (Kufer *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2007; Vinzing *et al.*, 2008). O NLRP1 é amplamente encontrado, enquanto que o NLRP3 está presente principalmente nas células do sistema imune, células epiteliais e osteoblastos (McCall *et al.*, 2008; Feldmeyer *et al.*, 2010; Guarda *et al.*, 2011). Até o momento, a principal função da proteína do tipo “speck” associada à apoptose (ASC), também conhecida como Pycard ou TMS1, é funcionar como um adaptador que une tanto o NLRP3 como o AIM2 à caspase-1 (Mariathasan *et al.*, 2004; revisado por Jin & Xiao, 2015). Após a ocorrência de estímulos diferenciados para cada inflamassomo ocorre a “montagem” da plataforma proteica responsável pelo recrutamento da caspase-1 como ilustrado a seguir.

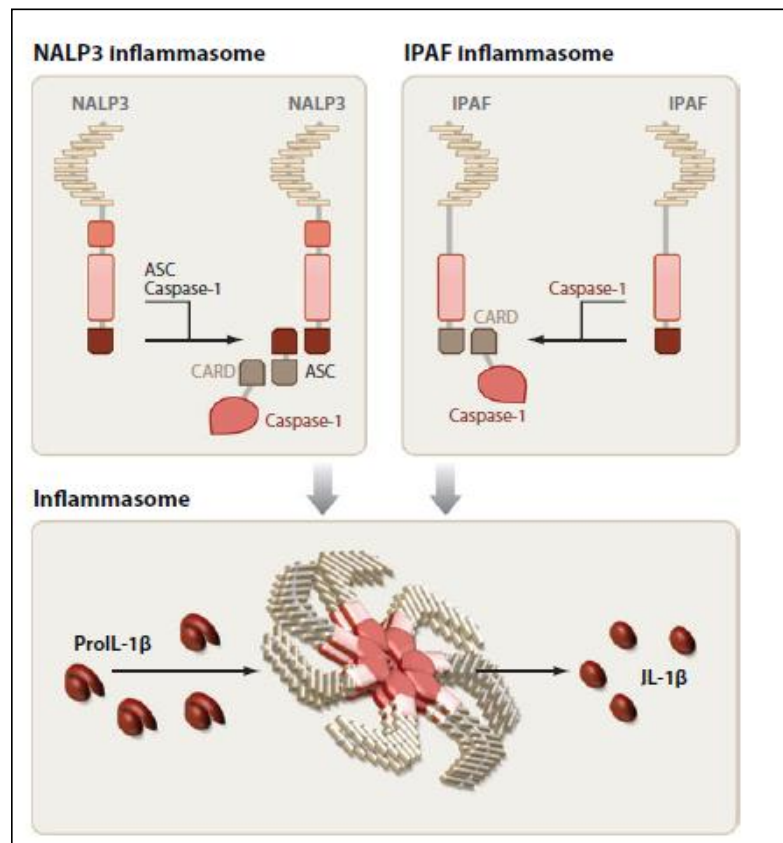


Figura 1.1: representação gráfica da organização estrutural dos inflamassomos NALP3 (NLRP3) e IPAF (NLRC4). A estrutura central é formada pelo NALP3, o adaptador ASC e a caspase-1. As interações entre PYD-PYD (“PYRIN domain”) e CARD-CARD (“caspase-recruitment domain”), são essenciais para o recrutamento e para a ativação da caspase inflamatória pela união com o adaptador ASC. O IPAF recruta a caspase-1 diretamente pela interação da CARD-CARD (não precisa do ASC). O NALP3 ou o IPAF ativa a indução da oligomerização do domínio NACHT, formando então o inflamassomo. Após estes eventos, ocorre a ativação da caspase-1 e da IL-1 β . Fonte: Martinon *et al.* The inflammasomes: Guardians of the body. *Ann. Rev. Immunol.*, 2009.

1.1.3 AIM2

O inflamassomo AIM2 foi inicialmente descrito como um complexo proteico, que quando expresso nos melanócitos, os tornava resistentes à transformação em células malignas. Dá-se o nome a estas proteínas de “Absent in Melanoma-2” (AIM2), pois a ausência do receptor AIM2 nestas células favorece mutações genéticas que resultarão no melanoma (DeYoung *et al.*, 1997). O AIM2, também denominado de receptores ausentes em melanoma (RAM), pertence à família HIN-200 (“Haematopoietic-expression-Interferon-inducible-nature-Nuclear-localization”), funcionando como receptor para moléculas de dupla fita de DNA intracelulares é dependente do adaptador ASC para exercer sua atividade inflamatória. O DNA citoplasmático, que pode ser derivado da infecção viral, de outros micro-organismos patogênicos, dano tissular ou ainda oriundos dos lipossomos catiônicos, é um potente ativador da resposta por Interferon tipo I (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009; Hornung *et al.*, 2009; revisto por Latz *et al.*, 2013). O AIM2 se encontra ainda expresso nos leucócitos do sangue periférico, nas células dendríticas e nos queratinócitos (Roberts *et al.*, 2009; Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009). O INF- γ induz a expressão do AIM2 nos queratinócitos e nos macrófagos (Dombrowski *et al.*, 2011; de Koning *et al.*, 2012; Kopfnagel *et al.*, 2011). As análises das estruturas cristalizadas do domínio HIN do AIM2 revela que os 200 aminoácidos do domínio HIN, se dobram em duas estruturas em *tandem* ligantes de oligonucleotídeo/oligossacarídeo (OB), que são mantidas unidas firmemente através de uma interface hidrofóbica (Shaw *et al.*, 2014). A resposta imune é ativada após detecção do DNA intracitoplasmático, o que contribui para a resolução de infecções por patógenos intracelulares (Jones *et al.*, 2010). Este inflamassomo é identificado, até o momento, como o principal ativador da caspase-1 em resposta ao DNA citoplasmático (Kopfnagel *et al.*, 2011). A piroptose está envolvida na atividade supressiva de tumores atribuídas ao AIM2 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009). A ativação da resposta inflamatória parece ocorrer através de uma ação sinérgica entre o NLRP3 (sensor de perigo) e o AIM2 (sensor de DNA). Embora à primeira vista, possa parecer redundante que ocorra a ativação destes dois inflamassomos, esta ativação ocorre por mecanismos diferentes e são complementares (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009).

1.1.4 NLRP3

O NLRP3 é o inflamassomo mais bem estudado. É capaz de responder a estímulos diversos, relacionados à infecção, estresse celular ou dano tissular (Schroder & Tschop, 2010; revisto por Latz *et al.*, 2013). Há controvérsias quanto à sua ativação. Uma das teorias propõe que este evento ocorra em duas etapas: a primeira promoveria o recrutamento dos componentes do inflamassomo e o segundo envolveria a montagem da estrutura multimérica para o processamento da IL-1 β (revisto por Franchi *et al.*, 2009). O fator de transcrição NF κ B seria ativado na segunda etapa deste processo, denominada de fusão, aumentando a expressão do NLRP3 e da pró-IL-1 β (O'Connor *et al.*, 2003). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são necessárias para que ocorra a ativação deste fator de transcrição (Bauernfeind *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2011; revisto por Dunn *et al.*, 2015). Uma outra teoria relaciona a primeira etapa de recrutamento dos componentes dos inflamassomos à ativação do receptor do tipo Toll, que induz a síntese do NLRP3 e da IL-1 β dependentes do NF κ B. A segunda etapa ocorreria pela ativação dos inflamassomos e a consequente ativação da caspase-1 (revisto por Afonina *et al.*, 2015). O NLRP3 é ativado após detectar distúrbios da homeostase celular (revisto por Davis *et al.*, 2011; revisto por Dunn *et al.*, 2015). Ainda permanece incerto se o NLRP3 atua na vigilância da integridade das mitocôndrias, detectando o dano mitocondrial ou se as mitocôndrias servem apenas como uma plataforma física para a montagem deste complexo (Elliott & Sutterwala, 2015). Este inflamassomo seria ativado em consequência à disfunção das mitocôndrias, sinalizadas pela exposição de mtDAMP no citosol ou por alterações nos níveis de metabólitos e/ou aumento de mtROS (revisto por Dunn *et al.*, 2015). Um acúmulo de mitocôndrias danificadas ativa o NLRP3. Uma chaperona relacionada à autofagia, a p62, é capaz de reconhecer as mitocôndrias danificadas e promover a sua remoção (Geisler *et al.*, 2010). Este fato pode ser comprovado pela observação de que há um acúmulo de mitocôndrias danificadas em macrófagos deficientes de p62 (Zhong *et al.*, 2016).

O NLRP3 é o único identificado até o momento entre os NLR, que necessita de dois pontos distintos de checagem para a sua ativação nas células em repouso: o primeiro é a regulação transcricional; e o segundo é o processo de deubiquitinação deste complexo proteico, possivelmente envolvendo espécies

reativas de oxigênio (ROS) (revisto por Latz *et al.*, 2013). O ATP derivado da morte de células em altas concentrações no meio extracelular, ativa este complexo. Linfócitos T citotóxicos, células da micróglia e monócitos humanos, também liberam o ATP para o meio extracelular (Filippini *et al.*, 1990; Ferrari *et al.*, 1997; Piccini *et al.*, 2008; Netea *et al.*, 2009). Doenças inflamatórias como gota e pseudogota, que são induzidas por cristais de urato monossódico e pirofosfato de cálcio respectivamente, ativam a inflamação dependente do NLRP3 e da IL-1 β (Martinon *et al.*, 2006). Cristais de urato monossódico (MSU) liberados por células necróticas também ativam o NLRP3 (Shi *et al.*, 2003), assim com o efluxo de potássio das células (Pétrilli *et al.*, 2007). As espécies reativas de oxigênio (ROS) se associam à ativação do NLRP3. Quando se inativa as ROS com N-acetil-cisteína, observa-se o impedimento da formação do inflamassomo pelo ATP e MSU (Pétrilli *et al.*, 2007).

Estudos recentes indicam que a ativação do NLRP3 está associada a uma ampla gama de doenças autoimunes e inflamatórias, transformando estas moléculas em um objeto de estudo atraente, na tentativa de descobrir novas drogas para tratamento destas condições (revisto por Abderrazak *et al.*, 2015). Os componentes proteicos que constituem cada unidade monomérica dos dois inflamassomos escolhidos para o estudo se encontram representados abaixo.

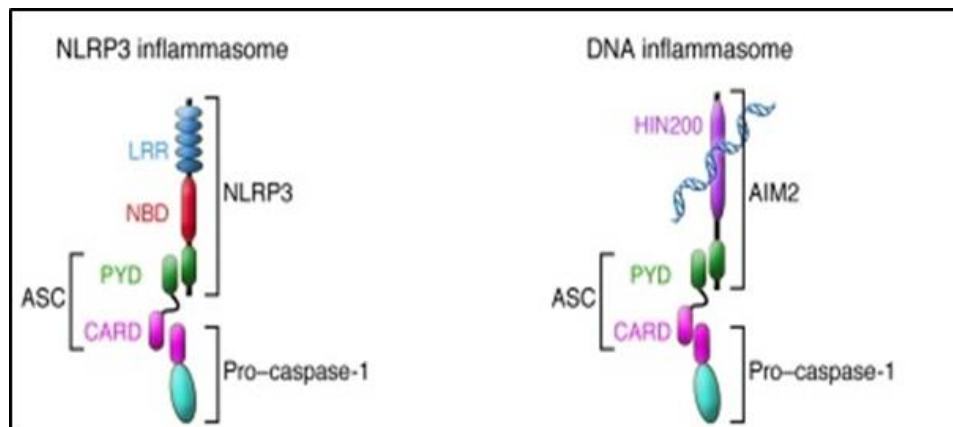


Figura 1.2: representação gráfica dos inflamassomos em destaque: o NLRP3 necessita do adaptador ASC para ativar a pró-caspase-1; o AIM2 apresenta um domínio PYRIN, que se liga ao domínio PYRIN do adaptador ASC, responsável pelo recrutamento da pró-caspase; e no extremo oposto o domínio HIN200, se liga ao DNA de dupla fita no citoplasma. **Fonte:** Stutz *et al.* Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Invest.*, 2009.

A resposta imune inata é responsável pelo posicionamento rápido das células fagocíticas nos sítios de inflamação e a subsequente captura e destruição dos patógenos. Os neutrófilos, granulócitos polimorfonucleares, são as células efetoras primárias da resposta inflamatória aguda e atuam na destruição dos patógenos invasores no sítio primário da infecção (revisto por Laskay *et al.*, 2003). As picadas dos flebotomíneos, ou a inoculação por agulha com a saliva destes insetos, independente da presença do parasita, induzem uma intensa, rápida e persistente infiltração neutrofílica na pele (Peters *et al.*, 2008). Ao se induzir em um modelo experimental murino a infecção com *Leishmania (L.) major* na pele, observa-se o início imediato da resposta inflamatória. Dentro de poucas horas após o desafio cutâneo com 10^6 parasitas ocorre a primeira “onda” migratória neutrofílica. Após dois ou três dias, observa-se a segunda “onda” de células, com o afluxo ao sítio da infecção de monócitos e macrófagos (Sunderkotter *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2012; revisto por Yang *et al.* 2016). Formas promastigotas são capazes de induzir a migração de polimorfonucleares pela liberação do fator quimiotático da *Leishmania* spp., que exerce uma potente ação atrativa para os neutrófilos, mas não para os outros leucócitos, tais como os monócitos e as células NK. Os neutrófilos participam do recrutamento e da ativação das células NK e das células T_{H1} , através da secreção de uma quimiocina (CXC-IFN- γ -proteína-10 induzível), capaz de regular o desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra os patógenos

intracelulares (Cassatella *et al.*, 1997; revisto por Laskay *et al.*, 2003). Produzem ainda uma série de proteases, elastases e catepsina G, capazes de processar a IL-1 β , a apenas alguns aminoácidos a montante do sítio de clivagem da caspase-1. No entanto, a atividade desta Interleucina ativada por este mecanismo é menor do que quando ativada pela via canônica através da caspase-1 (Black *et al.*, 1988; Hazuda *et al.*, 1991; revisto por Afonina *et al.*, 2015). É provável que, em certas condições inflamatórias caracterizadas pela liberação no meio externo da pró-IL-1 β , as proteases derivadas dos neutrófilos e dos mastócitos sejam importantes na ativação desta citocina. Além disto, estas proteases podem agir secundariamente à indução da piroptose pela caspase-1, com a liberação das formas ainda inativadas das citocinas inflamatórias para o microambiente extracelular (revisto por Afonina *et al.*, 2015). Demonstrou-se em um modelo experimental murino que os neutrófilos internalizam tanto formas amastigotas como promastigotas, principalmente após o parasita sofrer a opsonização com anticorpos específicos para *L. (L.) amazonensis*. A captação deste parasita resultou na ativação dos neutrófilos e na indução do estresse oxidativo (“oxidative burst”). É descrita diferenças na resposta dos neutrófilos às formas amastigotas ou promastigotas. Embora as duas formas sejam fagocitadas pelos neutrófilos peritoniais, as amastigotas são altamente resistentes aos mecanismos microbicidas e induzem a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10, enquanto que as promastigotas, ativam a secreção do TNF- α e são mais suscetíveis de serem eliminadas pelos neutrófilos (Carlsen, 2013). Há dois mecanismos básicos de reconhecimento de micro-organismos pelos neutrófilos: reconhecimento opsonina dependente; e opsonina independente. Na captação independente de opsoninas, os PRR reconhecem os PAMP, presentes na superfície dos micro-organismos, induzindo o processo de fagocitose denominada de não opsônica (revisto por Uthaisangsook *et al.*, 2002). A maioria dos micro-organismos são mortos imediatamente nos neutrófilos, mas alguns patógenos sobrevivem mesmo em ambientes hostis. A sobrevivência destes agentes pode ser explicada por mecanismos distintos: escape dos fagossomos, permanecendo no citoplasma das células; bloqueio da fusão fagossomo-lisossomo; ou inibição do estresse oxidativo (revisto por Laskay *et al.*, 2003). Este último mecanismo é o utilizado pela *Leishmania* spp., tanto *in vitro* como *in vivo* (Laufs *et al.*, 2002). A sobrevivência

dos patógenos intracelulares obrigatórios, tais como *Leishmania* spp. no hospedeiro depende do reconhecimento e da internalização celular destes micro-organismos. Após esta etapa, estes, devem escapar dos agentes antimicrobianos imunes e não imunes. Os neutrófilos são capazes de oferecer, em determinadas circunstâncias, condições favoráveis para manutenção de parasitas viáveis (Carlsen *et al.*, 2013). O tempo de vida dos neutrófilos é curto, cerca de 6 horas, na circulação sanguínea, sofrendo, após este período, apoptose constitutiva. *Leishmania* spp. é responsável pelo prolongamento do tempo de vida dos neutrófilos, pela indução de um efeito antiapoptótico. De acordo com a teoria do cavalo de Tróia, as condições para a manutenção da *Leishmania* spp. nos macrófagos são facilitadas, quando os parasitas se encontram no interior do neutrófilo que está sofrendo apoptose. A ingestão pelos macrófagos de células que sofreram este processo de morte celular fisiológica, e por este motivo não libera DAMP, pode resultar na tolerância aos micro-organismos intracelulares, ao não ativar os mecanismos antimicrobianos que se relacionam aos danos (revisado por Laskay *et al.*, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2007). No entanto, resultados diferentes são observados ao se analisar o comportamento de espécies distintas de *Leishmania* spp. em relação aos neutrófilos e aos macrófagos. A interação entre os macrófagos, *L. (L.) major* e os neutrófilos, favorecem a multiplicação do parasita. De outro modo, resultado oposto foi encontrado, utilizando o mesmo modelo com *L. (V.) braziliensis*, que resultou em uma redução significativa da carga parasitária (Novais *et al.*, 2009).

A NETose é uma forma de morte dos neutrófilos na qual ocorre a liberação para o meio externo de uma substância amorfa, denominada de armadilha extracelular de neutrófilos (“neutrophils extracellular trap-NET”), formada por cromatina descondensada associada com proteínas citoplasmáticas e granulares. As formas amastigotas extracelulares ao serem envolvidas pela NET sofrem a captura e morte (Morgado *et al.*, 2015).

As células NK são citotóxicas pré-ativadas, sendo capazes de responder rapidamente sem a necessidade de memória prévia, desempenhando um papel importante nas fases iniciais da resposta imune inata. Exercem as funções citotóxicas, proliferativas e indutoras de citocinas. São importantes produtoras do IFN- γ , fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator

estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), TNF- α , IL-3, IL-8. A indução da produção de citocinas ocorre pelo seu efeito sinérgico com a IL-12, o TNF- α e a IL-1 (Scott & Trinchieri, 1995). A IL-18 secretada pelos macrófagos ativados induzem a produção do IFN- γ , além de potencializar a atividade celular das células NK, assim como, quando associada à sensibilização prévia destas células com a IL-12, estimular a resposta T_{H1} (Takeda *et al.*, 1998). A infecção por *Leishmania (L.) major* é mais grave em ratos com depleção de células NK. Estas células são necessárias para o controle da infecção em modelo murino infectado com *Leishmania (L.) amazonensis* (Laskay *et al.*, 1993). Além disto, em indivíduos com a infecção subclínica, desempenham função protetora podendo ser relacionadas à cura (Maasho *et al.*, 1998).

A resposta imune inata pode ser um fator importante para o controle da infecção por *Leishmania* spp. A hipótese de que a imunidade adaptativa possa ser a única responsável pelo desfecho favorável da infecção é refutada pelo fato de a resposta do tipo I ser mais intensa em pacientes, quando comparada com indivíduos com a forma subclínica. Uma resposta imune adaptativa mais fraca pode estar relacionada a uma maior eficiência em controlar, ainda na fase inicial, a infecção através da resposta imune inata (Follador *et al.*, 2002; Novoa *et al.*, 2011).

1.1.5 Regulação negativa dos inflamassomos

A resposta inflamatória deve retroceder, quando não for mais necessária. A liberação da IL-1 β e da IL-18 precisa ser inibida após a deflagração dos eventos relacionados à resposta imune adaptativa ser obtida. Os linfócitos T CD4⁺ efetores, ou de memória e o IFN- γ derivado das células T possuem a capacidade de inibir, por contato, a ativação do NLRP1 e do NLRP3 (revisito por Latz *et al.*, 2013). Mecanismos de evasão dos micro-organismos também podem inibir o NLRP3. Este fato foi observado *in vitro* em um estudo com cultura de células de linhagem monocítica humana (THP1), diferenciada por PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), exposta à GP63 purificada e exossomos contendo GP63 derivada de *L. (L.) mexicana*. Houve a inibição da maturação e da liberação da IL-1 β pelos macrófagos, associada como a inibição das espécies reativas de

oxigênio (ROS), que são potentes ativadoras do NLRP3 (Shio *et al.*, 2015). Um outro mecanismo descrito está relacionado aos autofagossomos que ao se fundirem com os lisossomos degradam estes elementos citoplasmáticos, processo descrito tanto para o AIM2 como para o NLRP3. O bloqueio da autofagia potencializa a atividade dos inflamassomos (Shi *et al.*, 2012).

1.1.6 Vias de ativação dos inflamassomos (Via canônica e não canônica)

As caspases são uma família das proteases envolvidas na inflamação e na apoptose. A ativação da caspase-1 é deflagrada por uma variedade de agentes infecciosos ou estímulos nocivos e parece ser mais complexa do que foi inicialmente descrita, sendo um evento chave na resposta imune inata nos macrófagos. (Broz *et al.*, 2010a). Esta enzima é constitutivamente expressa (revisto por Diamond *et al.*, 2015), produzida como um precursor citosólico que por proximidade induz a autoativação. O recrutamento da caspase-1 nos complexos multiproteicos, denominados inflamassomos canônicos, é suficiente para que ocorra a sua autoativação sem o seu processamento (Elliott *et al.*, 2008; Broz *et al.*, 2010b). O recrutamento do adaptador ASC provavelmente altera a conformação dos dímeros da pró-caspase-1, de uma maneira que permita a sua autoativação lítica (Broz & Monack, 2011). Recentemente, vem sendo descrita uma via alternativa de ativação da caspase-1, denominada de via não canônica (revisto por Viganò & Mortellaro, 2013), que em camundongos é controlada pela caspase-11. A análise do papel da caspase-11 na inflamação foi possível após a identificação de que em estudos iniciais com camundongos “knockout” para a caspase-1 gene (*Casp1^{-/-}*) havia uma associação não identificada de “knockout” também para o gene da caspase-11 (*Casp11^{-/-}*) (Kuida *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995; revisto por Viganò & Mortellaro, 2013). Este fato se deve à proximidade dos genes codificantes da caspase-1 e da caspase-11, tornando difícil a segregação por recombinação, das mutações para a caspase-1 e para a caspase-11. Portanto, nestes primeiros ensaios ocorreu o viés da anulação tanto da via clássica quanto da via não canônica (Kayagaki *et al.*, 2011). A caspase-11 medeia a morte celular via piroptose independente dos inflamassomos e a liberação das formas ativas da família das IL-1 (Casson *et al.*, 2015). É um membro da subfamília das caspases

que compartilha 46% de identidade com a caspase-1 murina (revisto por Diamond *et al.*, 2015). Os seres humanos não codificam a caspase-11, ao invés disto, com base na homologia da sequência de aminoácidos, os genes homólogos podem codificar tanto a caspase-4 como a caspase-5 (revisto por Viganò & Mortellaro, 2013), que são responsáveis pela inflamação. A caspase-4 exerce um papel crítico na regulação da via não canônica dos inflamassomos e é necessária para a liberação da IL-1 α e para a morte através da piroptose (Casson *et al.*, 2015). Após a distinção e a separação entre as duas caspases nos modelos animais, ou seja, a distinção entre camundongos com genes *Casp1^{-/-}/Casp11^{-/-}* dos camundongos apenas com genes *Casp1^{-/-}* ou *Casp11^{-/-}*, foi possível identificar mecanismo alternativo de ativação dos inflamassomos, denominados de via não canônica (Kayagaki *et al.*, 2011). A expressão da caspase-11 necessita da estimulação prévia da resposta inflamatória (revisto por Viganò & Mortellaro, 2013). Há duas hipóteses para a ativação da caspase-11. A primeira propõe que a indução da expressão da caspase-11 seria necessária para a sua própria ativação (modelo de autoativação) (Rathinam *et al.*, 2012). A outra possibilidade é que a ativação da caspase-11 ocorreria em decorrência da montagem de uma plataforma proteica (Broz *et al.*, 2012). O LPS, produto da degradação das bactérias Gram negativas que foram degradadas nos fagolisossomos, é responsável pela ativação de um “sensor” não canônico, que seria responsável pela ativação da caspase-11 murina. Esta via é independente do receptor de membrana tipo “Toll” TLR4 que é ativado pelo LPS (revisto por Diamond *et al.*, 2015). A caspase-1 não é necessária para que ocorra a ativação da caspase-11 e nem para a morte por piroptose dos macrófagos induzida pela via não canônica dos inflamassomos (Kayagaki *et al.*, 2011). No entanto, a caspase-11 parece potencializar os efeitos da caspase-1 (revisto por Viganò & Mortellaro, 2013). Esta via considerada alternativa é responsável pela ativação de muitas funções previamente consideradas dependentes de via clássica dos inflamassomos. A maioria dos estudos que abordam a via não canônica na resposta inflamatória, avaliam, no modelo murino, a interação entre as bactérias e a caspase-11 (Kayagaki *et al.*, 2011; Viganò & Mortellaro, 2013; Hagar & Miao, 2014), ou no ser humano, onde se avalia a caspase-4, codificada pelo gene ortólogo ao gene da caspase-11 murina (Casson *et al.*, 2015). A ação da

caspase-11 na infecção pelo *Toxoplasma gondii* correlaciona animais “knockout” para caspase-11 com uma melhora da sobrevivência na infecção aguda, uma redução da inflamação local e sistêmica. No entanto, na fase tardia da infecção se associa à uma resposta inflamatória mais exacerbada no sistema nervoso central e à uma maior carga parasitária nos cistos (Coutermarsh-Ott *et al.*, 2016). Portanto, nas infecções por protozoários, esta via parece exercer um papel importante na resposta inflamatória e deve ser avaliada em estudos posteriores que abordem a resposta imune inata. Há ainda evidências de que a caspase-11 module a polimerização da actina induzindo a fusão entre os vacúolos contendo bactérias aos lisossomos. Esta fusão, além de limitar a multiplicação dos patógenos, pode causar a liberação de bactérias presentes nos vacúolos para o citosol (Akhter *et al.*, 2012). A hiperativação da caspase-11 através do LPS na sepse pode ser mais nociva do que benéfica (revisto por Diamond *et al.*, 2015).

1.1.7 Mecanismos de defesa da pele

A pele é constituída por duas camadas separadas pela membrana basal. A epiderme, a mais superficial, é responsável pela interface com o meio ambiente e é constituída principalmente pelos queratinócitos, em vários estágios de diferenciação, dispostos lado a lado em várias camadas. Na última, a mais superficial, estas células sofrem um processo de apoptose, sendo transformadas em corneócitos. Forma-se então o *stratum corneum*, que é composto por estes corpúsculos inativos e anucleados, preenchidos por queratina. Na epiderme, observa-se ainda pequena população de células de Langerhans (LC) e os melanócitos, produtores de pigmentos. A derme, camada mais profunda, é constituída por fibroblastos, que são responsáveis pela produção da matriz extracelular e pelo tecido conjuntivo composto de colágeno, fibras elásticas, uma mistura de outras proteínas, numerosas terminações nervosas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e uma variedade de células do sistema imune, tais como macrófagos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos T. Novas funções para os queratinócitos tem sido descobertas, através do estudo de mecanismos envolvidos na imunidade inata (Kawai & Akira 2007), assim como para as LC (Mitsui *et al.*, 2004; Sugita *et al.*, 2007) e para os mastócitos, responsáveis pela

atração dos neutrófilos para o sítio de infecção, através da secreção de TNF- α (Matsushima *et al.*, 2004). A manutenção da integridade da pele depende do reconhecimento e do combate das agressões, que podem ser de natureza biológica, física ou química. As biológicas ocorrem já no momento do nascimento, quando se inicia o processo de colonização da pele por uma grande variedade de micro-organismos comensais e patogênicos. Os mecanismos de defesa da pele precisam ser eficientes para combater os micro-organismos patógenos e ao mesmo tempo ser tolerantes aos comensais, de tal maneira que a resposta imune ocorra na medida certa. As doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes são decorrentes de um exagero destas respostas. As agressões de origem física são predominantemente associadas aos raios solares, mais especificamente à radiação ultravioleta B (UVB), que acima das doses consideradas fisiológicas, provocam dano tissular, induzindo uma resposta inflamatória em decorrência da ativação do NLRP3 (Feldmeyer *et al.*, 2007). Por último, as substâncias químicas, que estão permanentemente em contato com a pele, podem provocar inflamação. Um bom exemplo é a reação de hipersensibilidade de contato, que pode ser dividida em duas etapas: a fase inicial de sensibilização, dependente dos inflamassomos, da caspase-1, da IL-1 β e da IL-18 (Shornic *et al.*, 1996; Zepter *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002); e a fase tardia é mediada pelas células T (Cavani *et al.*, 2007).

Em resposta ao dano, a pele desencadeia um programa para restaurar a homeostase. Este processo é organizado em três fases distintas, mas interdependentes: a primeira é a fase inflamatória onde ocorre o recrutamento e a ativação de células do sistema imune; a seguir a fase proliferativa é responsável pela indução da angiogênese e reepitelização (migração dos queratinócitos para resolução da lesão); e por último a fase de remodelamento, onde ocorrem os processos de alteração da arquitetura e da matriz extracelular (Lee *et al.*, 2015).

Os queratinócitos, além da sua participação na sustentabilidade plástica da pele, exercem um papel importante na regulação das respostas inflamatória e imune. São responsáveis pela produção de um grande número de citocinas tais como Interferons, TNF- α , IL-17 e IL-20, que ativam as células dendríticas e as células T (Nestle *et al.*, 2009). Estudos experimentais demonstram que os queratinócitos, embora não sejam células imunes “profissionais”, atuam para que

ocorra interação entre os inflamassomos e os PAMP ou os DAMP, e o consequente recrutamento e a ativação através do adaptador ASC da caspase-1, responsável pela ativação da IL-1 β e a IL-18 (Feldmeyer *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2008). Estas células são responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias IL-1 β e pró-IL-1 α em quantidade comparável à produzida pelos macrófagos (Feldmeyer *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Faustin *et al.* 2007). Há ainda várias evidências de que os queratinócitos constituam a principal fonte de IL-1 na pele (Feldmeyer *et al.*, 2007). Até o momento, atribui-se ao inflamassomo NLRP3 o protagonismo na maturação e na secreção da IL-1 β , embora esta função também possa ser exercida pelo NLRP1 e pelo AIM2 (Feldmeyer *et al.*, 2007; Dombrowski *et al.*, 2011). A técnica da PCR em tempo real permitiu a comprovação de que a ativação do NLRP3, da ASC e da caspase-1 ocorre em consequência de um grande número de estímulos nocivos externos. A ativação do sistema imune através do contato da pele com substâncias que podem provocar uma reação de hipersensibilidade, foi comprovada pelo experimento que expôs queratinócitos humanos ao *Dermatophagoides pteronyssinus*, um ácaro encontrado na poeira doméstica, associado à expressão do inflamassomo NLRP3, do adaptador ASC e da caspase-1, com consequente secreção de IL-1 β e IL-18 (Dai *et al.*, 2011). Outro estudo avaliou a expressão exagerada destes mediadores inflamatórios na psoríase. Nesta condição, os queratinócitos super expressavam caspase-1, caspase-4, caspase-5, ASC, NLRP1 e NLRP3, presentes tanto nos fragmentos de pele com lesão, quanto naqueles fragmentos aparentemente sem lesão (Salskov-Iversen *et al.*, 2011). Embora inicialmente as informações relacionadas à imunidade inata nas infecções cutâneas estivessem associadas ao estudo dos TLR, mais recentemente os inflamassomos vem ganhando importância na ativação da resposta inflamatória na pele (Dinarello, 2009).

1.1.8 Inflamassomos na leishmaniose tegumentar americana

Os mecanismos relacionados aos inflamassomos deflagrando resposta imune inata e resposta inflamatória na leishmaniose tegumentar americana são pouco conhecidos. Na fase inicial da infecção, a interação entre as formas promastigotas metacíclicas e as células fagocíticas na primeira linha de defesa, induz uma série de eventos objetivando a contenção do processo infeccioso. Os inflamassomos, “sensores” intracitoplasmáticos para patógenos ou danos, são ativados após a internalização e o posicionamento de *Leishmania* spp. nos fagossomos (revisto por Clay *et al.*, 2014). Para que ocorra a interação entre *Leishmania* spp. e os inflamassomos há a necessidade da liberação para o citosol do parasita ou do produto da sua digestão, com a exposição do DNA, no caso do AIM2, à semelhança do que foi descrito com a bactéria *Francisella novicida* (Juruj *et al.*, 2013), ou a indução de dano no caso do NLRP3. Este estímulo deflagra uma resposta inflamatória em consequência da ativação dos inflamassomos (Martinon *et al.*, 2002; revisto por Martinon *et al.*, 2009; revisto por Davis *et al.*, 2011). A resposta inflamatória pode exercer tanto efeitos benéficos como deletérios, dependendo da interação entre parasita-hospedeiro. As primeiras abordagens para investigar estas questões, utilizaram animais de experimentação (múltiplos modelos murinos) infectados basicamente com duas espécies de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*; e *L. (L.) major*.

O efeito protetor dos inflamassomos foi demonstrado em um estudo em que linhagens de camundongos “knockout” para os genes *NOS2*, *ASC*, *caspase-1* e *NLRP3*, infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentavam um aumento percentual de células infectadas, carga parasitária intracelular aumentada e maior potencial de injúria no local de inoculação, quando comparadas aos camundongos de linhagem selvagem. A IL-1 ao se ligar ao receptor IL-1R e MyD88, estimula a óxido nítrico-sintetase induzida (iNOS) nos macrófagos, favorecendo a destruição dos parasitas (Lima-Junior *et al.*, 2013).

Resultados opostos foram obtidos ao se infectar com *L. (L.) major*, camundongos BALB/c, naturalmente suscetíveis à infecção. As manifestações clínicas foram atenuadas na ausência de um dos genes *IL-1* (*IL-1 α ^{-/-}* ou *IL-1 β ^{-/-}*). Observou-se ainda, uma maior gravidade das lesões, quando se bloqueou os antagonistas de receptores IL-1 (IL-1Ra) (Voronov *et al.*, 2010). A infecção por

uma cepa mais virulenta de *L. (L.) major*, a (*LmSd*), em camundongo C57BL/6 foi associada à uma superexpressão de IL-1 β , que estava diretamente relacionada à persistência dos parasitas e à maior gravidade das lesões no sítio de inoculação. Camundongos deficientes em NLRP3, ASC ou com deficiência de receptores para a IL-1 β ou a IL-1, apresentaram evolução clínica mais favorável (Charmoy *et al.*, 2016). Uma ativação deficiente de NLRP3 exerce um papel protetor contra o potencial patogênico da infecção por *L. (L.) major*. A resistência aumentada à infecção em camundongos deficientes para o NLRP3, está associada à uma redução das citocinas da resposta T_{H2} e a um aumento das citocinas T_{H1} (Gurung *et al.*, 2015).

Os mecanismos da resposta inflamatória em seres humanos são fundamentais para a manutenção da homeostase, no entanto a exacerbação deste processo se associa às doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes (Martinon *et al.*, 2002; revisado por Martinon *et al.*, 2009; revisado por Davis *et al.*, 2011). O fato de a infecção por *Leishmania* spp. deflagrar uma resposta inflamatória, tanto pode exercer um efeito benéfico no controle da infecção, como exacerbar os efeitos patogênicos. Em uma região onde ocorre uma superposição da mutação de caráter familiar que induz um ganho de função da IL-1 β e da transmissão endêmica de *L. (L.) mexicana*, foi possível observar que o aumento constitucional de IL-1 β , associava-se às formas clínicas de maior gravidade, com maiores cargas parasitárias. Avaliou-se também pela técnica de imunohistoquímica, a distribuição da IL-1 β em lesões de pele. A distribuição difusa da IL-1 β foi observada em pacientes com alta carga parasitária, tanto na leishmaniose cutânea localizada (LCL) como na leishmaniose cutânea difusa (LCD), enquanto que nos pacientes com LCL com uma menor carga parasitária, a IL-1 β era visualizada apenas no meio intracelular. Este estudo demonstra que a IL-1 β , como fator isolado, é importante para exacerbação da resposta inflamatória, contribuindo para o pior prognóstico da doença (Fernández-Figueroa *et al.*, 2012).

O único trabalho até o momento, que correlaciona inflamassomos canônicos em fragmentos de lesões cutâneas com leishmaniose tegumentar por *L. (V.) braziliensis*, identificou uma alta expressão de genes associados ao AIM2 e

ao NLRP3 através de estudo genômico transcricional de alta performance (Novais *et al.*, 2015).

1.1.9 Influência da carga parasitária na patogenia da leishmaniose tegumentar americana por *L. (V.) braziliensis*

Observa-se na leishmaniose tegumentar uma grande variabilidade de manifestações clínicas assim como diferentes respostas ao tratamento (revisado por Kaye & Scott, 2011). Embora a correlação entre a resposta imune e as várias formas de apresentação da doença seja indiscutível, fatores inerentes ao parasita também podem ser relevantes para explicar as diversas formas clínicas associadas às espécies distintas ou até mesmo cepas diferentes deste protozoário (revisado por Reithinger *et al.*, 2007; revisado por Kaye & Scott, 2011). No espectro de doenças causadas por *L. (V.) braziliensis* uma menor abundância de parasitas é observada com frequência tanto nas lesões cutâneas como nas mucosas. Estudos anatomopatológicos das lesões provocadas por esta espécie de protozoário demonstram a visualização de um número maior de parasitas na pele do que na mucosa (Magalhães *et al.*, 1986), assim como um menor rendimento de isolamento em cultura do parasita nas lesões mucosas, quando comparado ao percentual mais elevado de positividade nas culturas coletadas das lesões cutâneas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (Barral *et al.*, 1987).

Mais recentemente um estudo realizado no Peru utilizando a técnica da qPCR confirmou este achado anatomopatológico, evidenciando uma menor abundância de kDNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* na forma mucosa do que na leishmaniose cutânea (Jara *et al.*, 2013). Em determinadas condições a carga parasitária pode estar relacionada à gravidade da doença, como por exemplo na leishmaniose difusa causada por *L. (L.) amazonensis*, onde os parasitas são visualizados em abundância (Marsden, 1986; Carvalho *et al.*, 1994). Em infecções experimentais por *L. (L.) major* que mimetizam a transmissão natural em camundongos se observa que doses do inóculo mais altas induzem lesões maiores, enquanto que inóculos menores induzem lesões mais brandas, embora, neste último caso, possa ser observada na fase crônica uma maior

abundância de parasitas (Kimblin *et al.*, 2008). Na medida em que as técnicas moleculares e principalmente a PCR se tornou disponível para o uso na prática clínica tem sido demonstrada cada vez mais utilidade desta ferramenta tanto para o diagnóstico, como para a avaliação do prognóstico e resposta ao tratamento em algumas doenças virais tais como a aids (Goldschmid *et al.*, 2016; revisto por Peter *et al.*, 2017) e a infecção crônica pelo vírus da hepatite B (Avettand-Fenoel *et al.*, 2014). Das doenças por protozoários a análise da carga parasitária pela PCR no sangue periférico tem se mostrado útil para acompanhamento clínico dos pacientes com doença de Chagas aguda ou crônica (Hernández *et al.*, 2016) e dos pacientes com leishmaniose visceral (Mary *et al.*, 2004; Pourabbas *et al.*, 2013; Mourão *et al.*, 2014; Sudarshan *et al.*, 2015). No entanto, na leishmaniose tegumentar a análise do sangue periférico não constitui um alvo ideal para o diagnóstico pois apresenta rendimento baixo (26,2%) (de Oliveira Camera *et al.*, 2006). Além deste impedimento foram encontrados resultados falso positivos para PCR do kDNA em monócitos do sangue periférico, em consequência da reação cruzada entre o kDNA e o genoma humano (Vergel *et al.*, 2005). Na tentativa de se estabelecer uma correlação entre a carga parasitária da leishmaniose por *Leishmania (Viannia)* e os parâmetros clínicos foi conduzido um estudo utilizando a qPCR do kDNA de *Leishmania (Viannia)*, no entanto, não foi possível identificar uma associação significativa entre a carga parasitária e os parâmetros clínicos idade, número de lesões e mediana do total de lesões em cada paciente. No entanto, houve uma correlação inversamente proporcional entre a carga parasitária com o tempo de duração da doença (Jara *et al.*, 2013).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel dos inflamassomos AIM2 e NLRP3, do ASC, caspase-1 e IL-1 β e carga parasitária na patogênese da LTA por *L. (V.) braziliensis*.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar a expressão gênica do AIM2 e do NLRP3 *in vitro* em cultura de queratinócitos ou macrófago humanos estimulados com *L. (V.) braziliensis*

2.2.2. Estabelecer uma relação entre a expressão gênica relativa *in situ* dos inflamassomos AIM2 e NLRP3 e da caspase-1 e do ASC em pacientes com diferentes formas clínicas de doença e a qualidade da resposta ao tratamento.

2.2.3. Identificar, por imunohistoquímica, a expressão *in situ* de AIM2, do NLRP3 e da IL-1 β nas lesões de pacientes com LTA e correlacionar com a forma clínica e a resposta ao tratamento.

2.2.4. Comparar em lesões nas diversas formas de apresentação da LTA e nas respostas clínicas ao tratamento os resultados obtidos através da expressão gênica relativa pela PCR em tempo real para o AIM2 e o NLRP3, com os dados obtidos pela técnica da imunohistoquímica para os mesmos alvos;

2.2.5. Investigar a associação entre a carga parasitária em pacientes com leishmaniose tegumentar por *L. (V.) braziliensis* originários do Rio de Janeiro com as diversas formas clínicas e a qualidade de suas respostas ao tratamento.

3. Materiais e Métodos

3.1 Ensaio *in vitro*

3.1.1 Cultura de parasitos

Promastigotas infectivas do isolado de *L. (V.) braziliensis* de um paciente oriundo da Bahia, com a forma disseminada da doença, obtida na CLIOC (Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz), sob o número IOCL-2483, código internacional MHOM/BR/2000/LTCP-13396, foram cultivadas no meio

Schneider's (Sigma-Adrice, SP, BR), suplementado com 20% de soro fetal bovino, urina humana e mantidas em estufa a 28°C.

3.1.2 Cultura de células (HaCat e THP1)

A linhagem HaCaT de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados, foi cedida por Dr. Francisco Groppo, do Departamento de Ciências Fisiológicas e Farmacologia, UNICAMP e foi cultivada em estufa a 37°C + 5% CO₂ no meio DMEM (GIBCO-Life Technologies-Carlsbad, CA, EUA), suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, SP, BR), 2mM L-glutamina (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA), 100UI/mL de penicilina + 50µg/mL de estreptomicina. Para o experimento, utilizamos a concentração inicial de células de 2X10⁴ em cada poço, em uma placa de 12 poços, com o volume total por poço de 2ml. e para cada condição. Após serem mantidas em incubação por 24 horas, atingiram a confluência de 80 a 90%. Foi então trocado o meio DMEM, para o mesmo meio, mas sem a adição do soro fetal bovino, no volume total de 200µl para cada poço e para cada tempo. Foi iniciado o protocolo de infecção, com *L. (V.) braziliensis*, na concentração de 2X10⁵/poço. Utilizamos como controle positivo, o LPS na concentração de 10µl/poço. A cada tempo, 0, 6 e 24h após o estímulo, coletamos, depois de desprezar o sobrenadante, as células em 500µl de Trizol (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), e armazenamos a 20°C para futura extração de RNA.

A linhagem de monócitos THP-1 (ATCC, Manassas, VA, EUA), foi mantida em cultura na estufa a 37°C e a 5% de CO₂, no meio RPMI 1640 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA), suplementado com soro fetal bovino a 10% (HyClone Laboratories, Logan, UT, EUA), 2mM L-glutamina (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA), 100UI/mL de penicilina + 50µg/mL de estreptomicina, 4500 mg/L de glicose, 1 mM de piruvato de sódio, 10 mM de HEPES, 1500mg/L de bicarbonato de sódio (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) e 50 µM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Para o experimento, foram utilizadas placas de 24 poços. Após ter sido acrescentado 200µl do meio RPMI sem soro fetal bovino em cada poço foram adicionadas as células THP1 na concentração de 10⁵/poço. Para a transformação das células em macrófagos, foi

então o acrescentado o PMA (acetato miristato de forbol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na concentração de 50ng/ml, sendo as placas então cultivadas em estufa por 48 horas. Após este período, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino estéril (PBS) e as placas foram mantidas em cultivo por cinco dias em meio RPMI com soro fetal bovino em estufa a 37° C +5% CO₂. Terminado este prazo, cada poço foi lavado com tampão fosfato-salino estéril, tendo sido então adicionada a concentração de 10⁶ parasitas/poço. Após 3, 6 e 24 horas, após o descarte do sobrenadante, foram coletadas as células em Trizol (Invitrogen, San Diego, CA, EUA) e armazenadas a -20°C para futura extração de RNA.

3.1.3 PCR em tempo real do AIM2 e do NLRP3 em ensaios “in vitro” em cultura de queratinócitos humanos (HaCaT) e em cultura de células de linhagem monocítica humana (THP1) cocultivadas com *L. (V.) braziliensis*.

Para o isolamento do RNA dos experimentos de infecção em cultura de células, com os queratinócitos humanos HaCaT e com os monócitos humanos THP-1 o RNA total foi extraído com o Trizol (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), segundo o protocolo do fabricante. A seguir foi quantificado por espectrofotometria e a qualidade do produto foi monitorada com a execução de gel de agarose a 2%. Após o devido tratamento com DNase (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), para eliminar as possíveis contaminações com DNA genômico, os DNA complementares foram sintetizados, com oligo hexâmeros randômicos e High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os ensaios da qPCR nos queratinócitos foram realizados com “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 400nM de cada iniciador e volume final de 15µl. Foi utilizado o Termociclador “StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Plataforma RJ-RPT09B). Para os ensaios de expressão gênica de alvos de *L. (V.) braziliensis*, 400nM de cada iniciador foi utilizado, em um volume final de 15µl. As curvas padrão foram então construídas para validar a aplicação do método do $\Delta\Delta CT$ ou $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) para os alvos em questão e o cDNA de *L. (V.) braziliensis*

(MHOM/BR/75/2903) que foi utilizado como normalizador para a avaliação da expressão gênica.

3.2. Casuística dos pacientes no estudo dos inflamassomos

Foi selecionado um total de 39 pacientes com LTA por *L. (V.) braziliensis*, atendidos no Ambulatório de Leishmaniose do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-Fiocruz-RJ). Estes pacientes eram oriundos de áreas endêmicas da região sudeste do Brasil, sendo a maioria deles (92%), residentes no estado do Rio de Janeiro. O atendimento destes casos deu origem a um banco de dados e de amostras sob curadoria do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz/RJ). O protocolo de atendimento destes pacientes consistia na coleta de materiais biológicos: sangue em frascos heparinizados ou com EDTA; e fragmento de lesão obtida por biópsia. Após a confirmação diagnóstica foi instituído o tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime® - Rhodia Farma/Sanofi-Aventis), nas doses que variaram de 5 a 20mg/Kg peso/dia, para os pacientes com lesão cutânea. O esquema com as doses mais baixas de Glucantime® foi proposto por Oliveira-Neto para tratamento de LCL em casos provenientes do estado do Rio de Janeiro (Oliveira-Neto *et al.*, 1997). Os pacientes com a forma mucosa foram submetidos ao tratamento com as doses preconizadas pelo Ministério de Saúde, na administração diária de 20mg/Kg peso de Glucantime®, com a duração média de 60 dias (BRASIL, 2013).

Os fragmentos de tecidos foram obtidos por biópsia incisional ou por *punch* da borda da úlcera, após a assepsia e a antissepsia e a anestesia local com xilocaína a 2%. Cada amostra coletada foi dividida em três partes: uma foi colocada em tubo de 1,5 ml (Eppendorf®-Hamburg, Alemanha), imediatamente congelada e armazenada a -20°C para ser submetida posteriormente à análise pela técnica da PCR; um segundo fragmento foi utilizado para a impressão em lâmina e a seguir embebido em formalina a 10% e emblocado em parafina, para o estudo histopatológico; a última amostra foi incluída em resina O.C.T. (Tissue Tek, Sakura Finetek, EUA) e estocada em nitrogênio líquido. Algumas amostras tiveram ainda fragmentos enviados para a cultura em meio NNN.

Os casos selecionados obtiveram o diagnóstico parasitológico comprovado por pelo menos um dos métodos utilizados de rotina: impressão em lâmina; histopatologia; cultura em meio NNN ou pela PCR.

Os 39 pacientes selecionados foram subdivididos de acordo com a apresentação clínica, LCL (n=28 casos) e LM (n=11 casos). Os casos de LCL foram ainda classificados de acordo com a evolução da doença em pacientes bons respondedores (n=15 casos). Nestes casos, houve a completa epitelização da lesão, acompanhada do desaparecimento do eritema, induração ou pápulas e ausência de lesões metastáticas ou lesões mucosas no período de até três meses após o término da terapia. Identificou-se como pacientes maus respondedores (n=13 casos), aqueles que não evoluíram para a cura clínica, sem a completa epitelização das lesões, em três meses ou ainda que apresentaram recidivas ou, o surgimento de novas lesões três meses após do término do esquema terapêutico. Como controle, utilizamos fragmentos de peles normais obtidos de cirurgias plásticas estéticas colhidas aleatoriamente (n=7).

Pela técnica da imunohistoquímica foram analisadas 16 amostras de pacientes divididos em pacientes com LCL (n=12), incluindo 6 pacientes que apresentaram boa resposta ao tratamento e 6 pacientes classificados como maus respondedores ao tratamento; e lesões mucosas (n=4), oriundas de pacientes com LM.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz, sob o protocolo CAE02765312.7.0000.5248.

3.3 Expressão relativa dos genes das amostras clínicas relacionadas aos inflamassomos

3.3.1 Isolamento do RNA e síntese do cDNA

Fragments de tecidos obtidos por biópsias diagnósticas de pele, coletadas da borda lesões ativas de leishmaniose, imediatamente mergulhadas em O.C.T (Tissue Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e preservadas em nitrogênio líquido. Uma série de 35 e 40 seções de tecidos na espessura de 5µm foi obtida de cada amostra, utilizando-se o criostato Leica Jung 1800 (Nussloch, Alemanha). O RNA total foi então isolado a partir destas amostras tanto da lesão mucosa de

pacientes com leishmaniose mucosa (n=9) como da lesão pele coletada de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (n=15). Foram utilizadas peles normais como controle (n=7). A extração de RNA utilizou o protocolo descrito pelo fabricante (RBC, BioAmerica Inc, Miami, FL, EUA). A transcrição reversa foi realizada utilizando oligo ddCT (PerkinElmer, Waltan, MA, EUA) e Superscript II RT (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA). Após esta fase os cDNA foram armazenados a - 20°C.

3.3.2 Escolha dos iniciadores (“primers”)

Foram realizados ensaios para determinar a eficiência dos iniciadores desenhados e para checar as concentrações ideais de análise. Os iniciadores para a caspase-1, o NLRP3, o AIM2 e o ASC foram obtidos na literatura (Atianand *et al.*, 2011), assim como para o controle endógeno GAPDH (Memoli *et al.*, 2005). Foram realizadas curvas padrão de cDNA de células humanas THP1 mantidas em cultura em diluições seriadas. Os iniciadores enfim, tiveram suas eficiências compatíveis e as concentrações ideais de trabalho determinadas. O método do ddCT (Pfaffl, 2001) foi adotado. Controles negativos em duplicata, sem a etapa de adição de cDNA, foram também incluídos. O gene de referência adotado como controle endógeno foi GAPDH. A integridade dos amplicons foi verificada pela visualização das bandas características em gel de agarose a 2,0%, após coloração pelo brometo de etídio e através da curva de desnaturação (“melt curve”) demonstrados nos Anexos

Tabela 3.1 Sequência dos iniciadores usados para a reação da RT-PCR. A sigla pb se refere ao número de pares de bases dos fragmentos amplificados.

Gene	Orientação		Pb
	Senso	Anti-senso	
Caspase-1 XM_017018396 .1	TGG GAC TCT CAG CAG ATC AA	CTG CCG ACT TTT GTT TCC AT	192
NLRP3 XM_011544055 .2	GGC ATA TCA CAG TGG GAT TC	GAT CTT CGC TGC GAT CAA C	107
AIM2 XM_005245616 .4	GTT TGA GAC CCA AGA AGG CA	CAC ACG TGA GGC GCT ATT TA	184
ASC NM_013258.4	CCC TCC TCA GTC GGC AG	AGG CTG GTG TGA AAC TGA	200
GAPDH NM_001289746 .1	TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC	ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC	189

3.3.3 PCR em tempo real

A RT-PCR em tempo real foi realizada com Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA), iniciadores na concentração de 400nM e um passo inicial e único de 95°C por 10 minutos, mais 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Posteriormente, uma curva de desnaturação foi adotada, para a verificação da especificidade dos produtos da amplificação. Os ensaios foram realizados no ViiA7™ RT-PCR system (Life Technologies) (Plataforma RJ RPT09A).

3.4 Técnica da Imunohistoquímica para detecção do NLRP3, AIM2 e ASC

Os fragmentos de pele ou de mucosa obtidos por biópsias incisionais ou por *punch* de pacientes com leishmaniose tegumentar por *L. (V.) braziliensis*, nas duas formas de apresentação da doença, leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutânea localizada (LCL), foram analisados pela técnica da imunohistoquímica. Os fragmentos fixados pela formalina a 10% e emblocados em parafina, foram seccionados com uma espessura de 4µm em micrótomo Leica RM 2235 (Alemanha) e montados em lâminas para microscópio silanizadas. A

técnica da imunohistoquímica foi realizada da seguinte forma: as secções foram desparafinadas em xileno; e hidratadas em uma série de concentrações de etanol. Procedeu-se então, a recuperação antigênica utilizando-se tampão citrato (citrato de sódio 10mM + Tween 0,05% com pH 6.0 durante 30 minutos a 95°C). As secções foram então incubadas com peróxido de hidrogênio a 3%, com o objetivo de bloquear as peroxidases endógenas, seguido do mesmo procedimento com a albumina de soro bovino (Sigma, EUA), para inibir a ligação não específica. As amostras foram então incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C, cada uma com um dos seguintes anticorpos primários: anti-AIM2 policlonal de coelho; anti-caspase-1 policlonal de rato; anti-IL-1 β policlonal de coelho; anti-ASC2 policlonal de coelho; e anti-NLRP3 de rato (ABCAM, Cambridge, Reino Unido). Após a incubação com os anticorpos secundários biotinilados apropriados (Dako Carpinteria, CA, EUA), as amostras foram tratadas com peroxidase conjugada com estreptoavidina-horseradish (GE Healthcare, San Francisco, CA, EUA) e com o substrato diaminobenzidina (DAB) (Biogen, Cambridge, MA, EUA), que foram aplicados por 30 minutos. Após esta etapa, a reação (cor castanha) foi interrompida utilizando-se água corrente. Todas as lâminas para controle negativo foram tratadas da mesma maneira, excluindo-se, no entanto, os anticorpos primários, ou utilizando-se anticorpos irrelevantes, mas que ocupam o mesmo epitopo dos anticorpos monoclonais primários. A contra coloração foi efetuada com hematoxilina de Harris (Merck, Damstadt, Alemanha) por 2 minutos e depois de secas, as lâminas foram montadas em meio Entellan (Merck, Damstadt, Alemanha). As células demonstrando o núcleo visível e a precipitação de coloração acastanhada/avermelhada foram consideradas positivas. O número de células positivas contidas no infiltrado inflamatório foram determinadas através da contagem de um total de 500 células no aumento de 10X1000. Estes números foram expressos em percentual de células positivas. Todas as contagens foram realizadas às cegas.

3.5 Avaliação da carga parasitária na LTA

3.5.1 Casuística dos pacientes no estudo da carga parasitária

Foi selecionado um total de 126 pacientes com LTA por *L. (V.) braziliensis*, atendidos no Ambulatório de Leishmaniose do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-Fiocruz-RJ). Todos os pacientes eram residentes no estado do Rio de Janeiro. Foram excluídos deste estudo os casos em que foram identificadas comorbidades clínicas tais como diabetes e hipertensão arterial e pacientes com infecção pelo HIV. O atendimento destes casos deu origem a um banco de dados e de amostras sob curadoria do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz-RJ). O protocolo de atendimento destes pacientes consistia na coleta de materiais biológicos: sangue em frascos heparinizados ou com EDTA; e fragmento de lesão obtida por biópsia. Após a confirmação diagnóstica foi instituído o tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime® - Rhodia Farma/Sanofi-Aventis), nas doses que variaram de 5 a 20mg/Kg peso/dia, para os pacientes com lesão cutânea. Os pacientes com a forma mucosa foram submetidos ao tratamento com as doses preconizadas pelo Ministério de Saúde, na administração diária de 20mg/Kg peso de Glucantime®, com a duração média de 60 dias (BRASIL, 2013).

Os fragmentos de tecidos foram obtidos por biópsia incisional ou biópsia por *punch* da borda da úlcera, após a assepsia e a antissepsia e a anestesia local com xilocaína a 2%. Cada amostra coletada foi dividida em três partes: uma foi colocada em tubo de 1,5 ml (Eppendorf®-Hamburg, Alemanha), imediatamente congelada e armazenada a -20°C para ser submetida posteriormente à análise pela técnica da PCR; um segundo fragmento foi utilizado para a impressão em lâmina e a seguir embebido em formalina a 10% e embocado em parafina, para o estudo histopatológico; a última amostra foi incluída em resina O.C.T. (Tissue Tek, Sakura Finetek, EUA) e estocada em nitrogênio líquido. Algumas amostras tiveram ainda fragmentos enviados para cultura em meio NNN.

Os casos selecionados obtiveram o diagnóstico parasitológico comprovado por pelo menos um dos métodos utilizados de rotina: impressão em lâmina; histopatologia; cultura em meio NNN ou pela PCR.

O total dos pacientes selecionados foi subdividido de acordo com a apresentação clínica, em: leishmaniose cutânea localizada LCL (n=71 casos);

leishmaniose cutânea recidivante REC, (n=15); LM (n=18 casos); leishmaniose mucocutânea LMC, quando foi descrita concomitância de lesão cutânea e mucosa (n=14) e cicatrizes cutâneas de lesões de leishmaniose (n=8). Os casos de LCL foram ainda classificados de acordo com a evolução da doença após esquema terapêutico em pacientes que responderam bem ao tratamento (BR) (n=54 casos). Nestes casos, houve a completa epitelização da lesão, acompanhada do desaparecimento do eritema, induração ou pápulas e ausência de lesões metastáticas ou lesões mucosas no período de três meses após o término da terapia. Identificou-se como pacientes que responderam mal ao tratamento (MR) (n=17 casos), aqueles que não evoluíram para a cura clínica, sem a completa epitelização das lesões, em três meses ou ainda que apresentaram recidivas ou, o surgimento de novas lesões três meses após do término do esquema terapêutico. Os pacientes foram ainda agrupados de acordo com o tempo de duração da doença até que ocorresse a total cicatrização em: precoce até 3 meses (n=43); intermediária entre 3 e 12 meses (n=18) e tardia quando o período para a completa resolução foi superior a 12 meses (n=10). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz, sob o protocolo 0033.0.011.346-11. O Termo de Consentimento informado foi obtido de todos os pacientes selecionados. A coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC, <http://clioc.fiocruz.br>) está registrada na Federação Mundial para Coleções de Cultura (WFCC-WDCM 731).

3.5.2 Parasitas e células humanas

Para a condução deste estudo foi utilizada uma cepa obtida da coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), *L. (V.) braziliensis* cepa de referência (MHOM/BR/1975/M2903). As formas promastigotas foram cultivadas à temperatura de 25°C no meio de *Drosophila* Schneider contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), penicilina na concentração de 100 UI/ml e estreptomicina 50µg/ml (Sigma, St Louis, MO, EUA).

Foram ainda utilizadas células humanas obtidas no Banco de células do Rio de Janeiro, ATCC TIB-202 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA), originárias de um paciente com leucemia aguda monocítica, as células THP1, que foram cultivadas à uma temperatura de 37°C e 5% de CO² no meio de RPMI 1640

(Sigma Chemicals, St Louis, MO, EUA) suplementado por soro fetal bovino a 10% (Cultilab, RJ, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA), 100 UI/ml de penicilina, 50µg de estreptomicina (Sigma, St Louis, MO, EUA), 10mM HEPES e 0,05 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemicals, St Louis, MO, EUA).

3.5.3 Isolamento do DNA

O DNA foi purificado nas amostras de parasitas, na cultura de células humanas THP1 e nos fragmentos de tecidos obtidos por biópsias diagnósticas de pele, coletadas da borda lesões ativas de leishmaniose, imediatamente mergulhadas em O.C.T (Tissue Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e preservadas em nitrogênio líquido. Nas amostras de tecidos humanos uma série de 35 e 40 secções de tecidos na espessura de 5µm foi obtida de cada fragmento, utilizando-se o criostato Leica Jung 1800 (Nussloch, Alemanha). Para a purificação do DNA foi utilizado, seguindo instruções do fabricante, o “Kit” Illustra Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin (GE Health care, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). O DNA foi então quantificado no NanoDrop (Thermo Scientific, Waltan, MA, EUA) e diluído, quando necessário, em tampão TE para a concentração de 25 ng/µl e estocado a -20°C.

3.5.4 Escolha dos iniciadores (“primers”)

Para determinar a carga parasitária foi realizada a quantificação absoluta pela PCR em tempo real (qPCR). Os iniciadores para a subunidade menor do gene de RNA ribossomal (SSR) de *L. (V.) braziliensis* foram obtidos na literatura (Prina *et al.*, 2007; Bezerra-Vasconcelos *et al.*, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2015) e utilizados para acessar a carga parasitária. A β-actina humana (ACT) (Rodrigues *et al.*, 2011) foi incluída para a correção da variação do conteúdo do DNA e para a avaliação da interferência de inibidores entre as amostras. Foram realizadas curvas padrão de DNA das células humanas THP1 mantidas em cultura em diluições seriadas. Os iniciadores enfim, tiveram suas eficiências compatíveis e as condições ideais de trabalho determinadas. As curvas padrão foram preparadas com diluições em log da cultura de *Leishmania* spp. e a massa de DNA (ng) de

células THP1 para a análise respectivamente de SSR e de ACT. A carga parasitária foi definida como o número de equivalentes (Eq) de parasitas por massa de DNA de células do hospedeiro (ng). Foram analisados um DNA total de até no máximo 50ng por reação. As amostras negativas foram classificadas como indeterminadas quando o ciclo de quantificação (Cq) da SSR correspondia a um Cq de ACT superior ao limite de detecção (LOD), ou seja, a concentração que pode ser detectada com uma certeza razoável (95% probabilidade é comumente utilizada) (Bustin et al., 2009).

Tabela 3.2 Sequência dos iniciadores usados para a reação da qPCR.

Gene	Orientação		Pb
	Senso	Anti-senso	
Leishmania unidade menor RNA (SSR) M80292	TAC.TGG.GGC,GTC.AGA.G	GGG.TGT.CAT.CGT.TTG.C	153
β -Actina humana (ACT) NM001101	TAA.TGT.CAC.GCA.CGA.TTT.CC C	TCA.CCG.AGC.GCG.GCT	60

3.5.5 PCR em tempo real com quantificação absoluta

A quantificação absoluta pela PCR em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando StepOne™ Real Time System (Applied Biosystems Foster City, CA, EUA) com Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O perfil térmico envolveu um passo inicial e único de 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por um 1 minuto e um passo de leitura a 75°C por 30 segundos. Posteriormente, uma curva de desnaturação foi adotada, para a verificação da especificidade dos produtos da amplificação de 65°C a 95°C. A integridade dos amplicons foi confirmada pela visualização das bandas características em gel de agarose a 2,0%, após coloração pelo brometo de etídio.

3.6 Análise Estatística

Em todos os ensaios foram executadas análises estatísticas no programa computacional GraphPad Prism vs 6.0 e no EXCEL. Os dados foram representados como média \pm SEM. A significância estatística foi determinada pelo teste não paramétrico de Mann-Witney U para a comparação de 2 grupos e pelo teste de Kruskal-Wallis para três variáveis. O teste de Fisher foi utilizado para análise das tabelas de contingência. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1 Expressão gênica *in vitro* do AIM2 e NLRP3 em queratinócitos (HaCaT)

Foi realizado um experimento piloto e as amostras foram coletadas nos tempos 0, 6 e 24 horas sendo então executada a RT-qPCR. Não foi possível detectar a expressão dos alvos do inflamassomos AIM2 e NLRP3 em queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados da linhagem HaCaT durante a infecção com *L. (V.) braziliensis* cepa IOCL-2483 código internacional MHOM/BR/2000/LTCP-13396, em contraponto com o gene endógeno humano GAPDH que foi amplificado (**Quadro 4.1**).

Amostra	Alvo	CT	TM
NTC	AIM	Undetermined	62,604
NTC	AIM	Undetermined	60,993
CN 0h	AIM	33,591	75,628
CN 0h	AIM	32,645	75,494
CP 0h	AIM	33,951	75,494
CP 0h	AIM	Undetermined	91,606
2483 0h_1	AIM	34,550	75,494
2483 0h_1	AIM	37,847	75,628
2483 0h_2	AIM	Undetermined	61,530
2483 0h_2	AIM	Undetermined	61,664

Alvo	CT	TM
NLRP3	Undetermined	61,664
NLRP3	Undetermined	61,396
NLRP3	Undetermined	61,664
NLRP3	Undetermined	61,396
NLRP3	Undetermined	61,396
NLRP3	Undetermined	61,664
NLRP3	Undetermined	61,396
NLRP3	Undetermined	61,396

Alvo	CT	TM
GAPDH	Undetermined	82,878
GAPDH	Undetermined	83,281
GAPDH	17,527	85,027
GAPDH	17,718	85,161
GAPDH	18,497	85,161
GAPDH	18,488	85,161
GAPDH	19,761	85,027
GAPDH	19,584	85,027
GAPDH	22,985	85,161
GAPDH	22,998	85,161

CN 6h	AIM	32,385	75,494
CN 6h	AIM	31,989	75,494
CP 6h	AIM	Undetermined	61,127
CP 6h	AIM	Undetermined	61,530
2483 6h_1	AIM	35,862	75,628
2483 6h_1	AIM	Undetermined	85,564
2483 6h_2	AIM	34,414	75,494
2483 6h_2	AIM	Undetermined	61,127

NLRP3	34,598	77,776
NLRP3	Undetermined	61,127
NLRP3	Undetermined	61,261
NLRP3	Undetermined	61,396
NLRP3	33,642	77,776
NLRP3	Undetermined	60,859

GAPDH	19,168	85,161
GAPDH	18,867	85,295
GAPDH	17,816	85,161
GAPDH	17,804	85,161
GAPDH	18,280	85,161
GAPDH	17,902	85,161
GAPDH	19,783	85,027
GAPDH	19,294	85,027

CN 24h	AIM	28,907	75,628
CN 24h	AIM	30,877	75,628
CP 24h	AIM	30,020	75,359
CP 24h	AIM	30,427	75,494
2483 24h_1	AIM	27,876	75,494
2483 24h_1	AIM	28,478	75,494
2483 24h_2	AIM	32,258	75,359
2483 24h_2	AIM	31,600	75,494

NLRP3	Undetermined	61,396
NLRP3	Undetermined	61,396
NLRP3	Undetermined	61,261
NLRP3	Undetermined	61,261
NLRP3	Undetermined	61,530
NLRP3	Undetermined	61,530

GAPDH	17,318	84,892
GAPDH	17,698	85,027
GAPDH	18,111	85,027
GAPDH	18,287	85,027
GAPDH	17,639	85,161
GAPDH	17,466	85,027
GAPDH	18,224	85,161
GAPDH	18,255	85,161

Quadro 4.1: demonstração pela técnica da RT-qPCR, dos valores de CT e TM para as amostras de queratinócitos sob diferentes estímulos. Estão indicados os valores para as células sem estímulo (CN - controle negativo), sob o estímulo com LPS (CP - controle positivo) e após cocultivo com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (isolado 2483) em diferentes tempos (0, 6 e 24h após o estímulo). NTC corresponde ao branco do ensaio da PCR em tempo real, sem o carregamento de cDNA. CT – “Cycle Threshold” (limiar do ciclo), TM – “melting temperatures” (temperatura de desnaturação).

4.2 Expressão gênica *in vitro* do AIM2 e NLRP3 e IL-1 β nos macrófagos de linhagem THP1

Ao se analisar os dados referentes aos ensaios da PCR em tempo real com as células monocíticas humanas de linhagem THP1, transformadas pelo PMA em macrófagos, infectadas com *L. (V.) braziliensis* cepa IOCL-2483 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão relativa dos genes do AIM2 (**Fig 4.1A**) do NLRP3 (**Fig 4.1C**) ou da IL-1 β (**Fig 4.1B**).

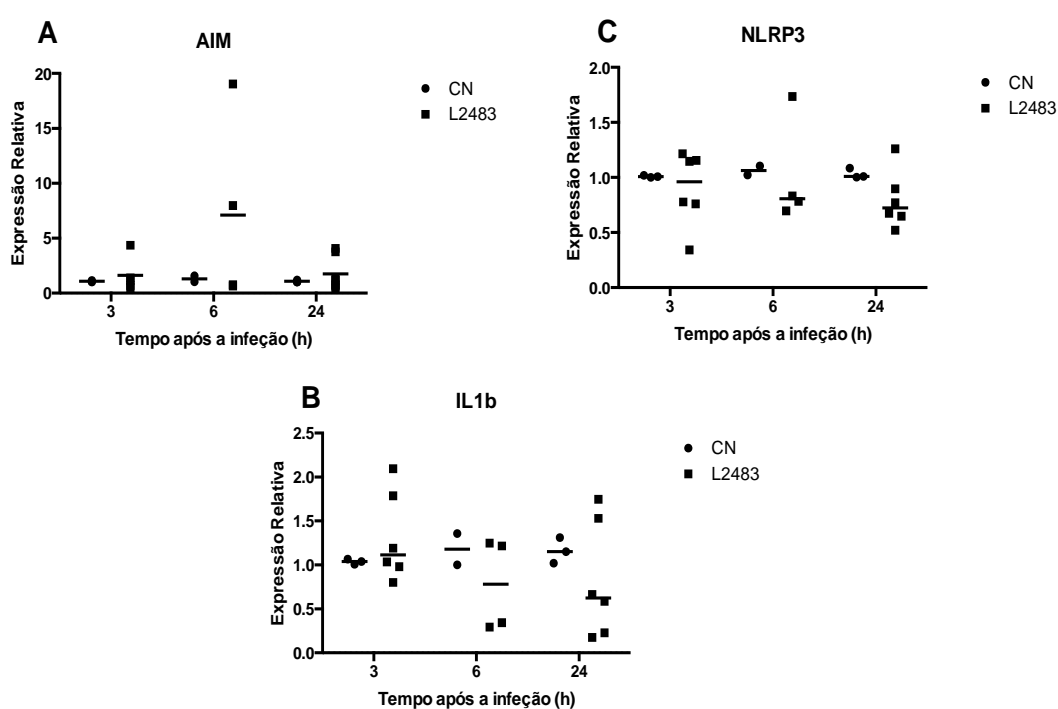


Figura 4.1: representação gráfica da expressão relativa dos genes AIM2 (**A**); NLRP3 (**B**); IL-1 β (**C**) pela técnica da PCR em tempo real de células THP1 transformadas em macrófagos, nos tempos de infecção 3h, 6h e 24 horas. CN corresponde ao branco do ensaio da PCR em tempo real, sem o carregamento de cDNA.

4.3 Aspectos Clínicos e Demográficos dos pacientes relacionados aos inflamassomos

Ao analisarmos as duas formas clínicas estudadas, a leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose cutânea localizada (LCL), encontramos diferenças estatisticamente significativas quanto os dados demográficos, clínicos e aferição da resposta imune do tipo retardada. Observa-se no grupo LM um predomínio do gênero masculino ($p < 0,05$), com faixa etária mais elevada ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo LCL. Além disto a duração da doença dos pacientes com LM era mais prolongada do que nos pacientes com LCL ($p < 0,001$). Quanto à reação intradérmica de Montenegro não houve diferenças significativas entre os pacientes de LM e LCL e nem nas diferentes respostas à terapia. Estes dados são demonstrados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: dados demográficos, clínicos e evolutivos dos pacientes, incluindo a reação intradérmica de Montenegro (IDRM). Os valores de idade estão representados pela média \pm erro padrão (SEM).

Pacientes	LCL		LM
	Boa	Má	-
Resposta à terapia			
Gênero N (%)*			
Masculino	06(40)	07(54)	10(91)
Feminino	09(60)	06(46)	01(09)
Idade em anos*			
Média \pm SEM	32 \pm 4.8	34 \pm 4.3	49 \pm 6.6
Duração de doença N (%)**			
\leq 3 meses	12(80)	08(62)	0(0)
> 3 meses	02(13)	03(23)	09(82)
NI	01(07)	02(15)	02(18)
Lesões N (%)			
1	10(67)	09(69)	-
> 1	05(33)	02(15.5)	-
NI	0(0)	02(15.5)	-
IDRM, mm			
média \pm SEM	32 \pm 4.1	31 \pm 5.2	50 \pm 9.7

* $p < 0,05$, LCL vs LM ** $p < 0,01$, LCL vs LM; LCL=lesões cutâneas localizadas; LM=lesões mucosas; NI-não informado

4.4 Expressão relativa *in situ* do AIM2, NLRP3, ASC e caspase-1 nas duas formas clínicas e respostas ao tratamento

A análise da expressão relativa através da PCR em tempo real detectou a presença de AIM2, ASC e caspase-1 em todos os casos. Houve ainda diferenças estatisticamente significativas com a maior expressão do AIM2 no grupo de pacientes com leishmaniose mucosa (LM), quando comparado ao grupo de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) ($p < 0,05$). Observa-se também uma redução na expressão de AIM2 nos pacientes com boa resposta ao tratamento, quando comparados com as peles normais ($p < 0,05$) (**Fig 4.2A**). Não foram observadas variações significativas na transcrição de NLRP3 ou do ASC, quando analisadas as amostras das diferentes formas clínicas e respostas ao tratamento (**Fig 4.2B** e **Fig 4.2C** respectivamente). Os níveis de caspase-1 se mostraram significativamente maiores nas lesões mucosas da LM quando comparados com os das lesões cutâneas na LCL ($p < 0,05$). Não foram observadas variações entre os grupos dos pacientes bons e dos pacientes maus respondedores, no entanto, estes dois grupos separados exibiram um aumento significativo na expressão de caspase-1, quando comparados à pele normal, na leishmaniose cutânea localizada com boa resposta ao tratamento versus pele normal ($p < 0,05$) e leishmaniose cutânea localizada com má resposta ao tratamento versus pele normal ($p < 0,01$) (**Fig.4.2D**).

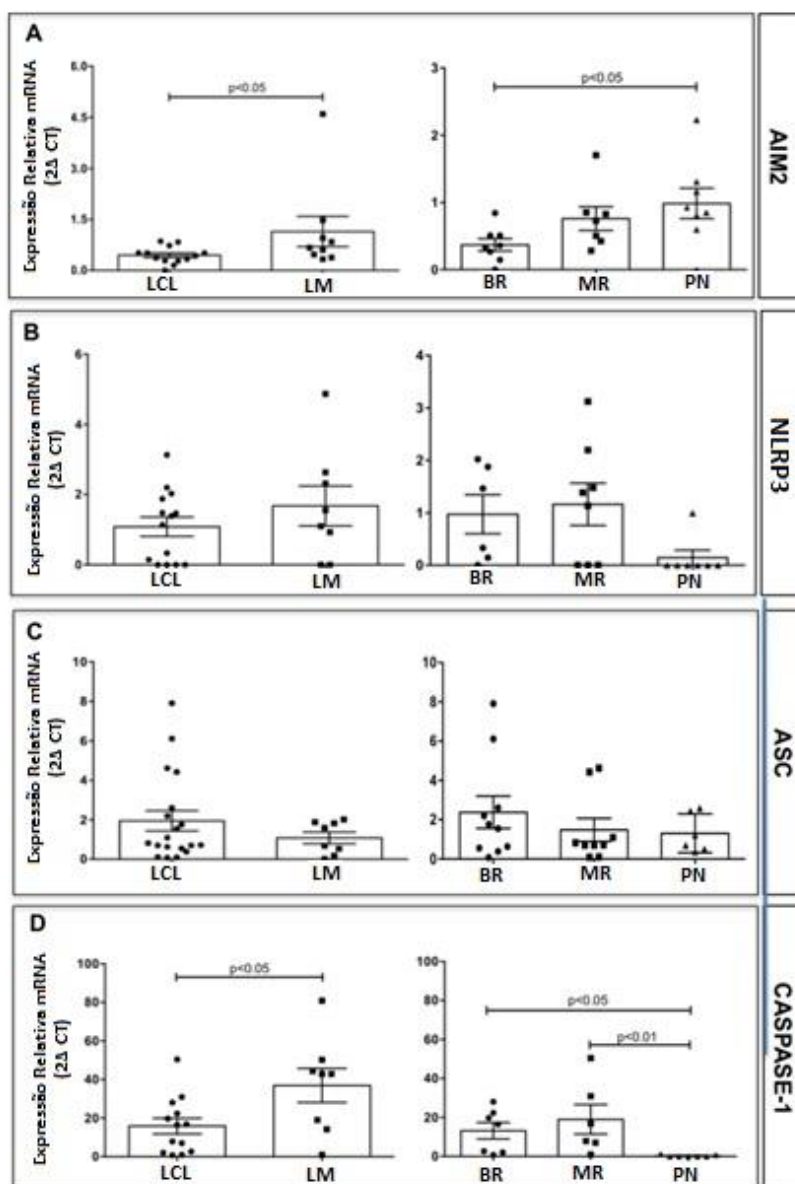


Figura 4.2: representação gráfica da expressão relativa dos genes AIM2 (**A**); NLRP3 (**B**); ASC (**C**); e Caspase-1 (**D**); pela técnica da RT-PCR, de fragmentos de pele coletados de lesões cutâneas e mucosas de LTA. LCL - Leishmaniose cutânea localizada. LM - Leishmaniose mucosa. LCL – BR - Leishmaniose cutânea localizada - boa resposta ao tratamento. LCL - MR-Leishmaniose cutânea localizada - má resposta ao tratamento. PN - Pele normal.

4.5 Imunohistoquímica do AIM2, NLRP3 e ASC

Com o objetivo de avaliar se a expressão gênica estaria de fato relacionada à síntese proteica nos tecidos, foram realizados estudos através da técnica da imunohistoquímica. A presença *in situ* de células AIM2⁺, NLRP3⁺ e ASC⁺ foi observada com maior frequência no citoplasma das células localizadas no infiltrado na derme (**Fig.4.3A**). A análise do percentual de células AIM2⁺ na LCL, demonstrou uma maior abundância de AIM2⁺ quando comparado à proporção de células NLRP3⁺ ($p < 0,01$). Ao se comparar estes dois inflamassomos nas lesões mucosas da LM, também se observa um aumento percentual significativo de células AIM2⁺, em relação às células NLRP3⁺ ($p < 0,05$) (**Fig.4.3B**). O percentual de células AIM2⁺ foi superior nas lesões mucosas da LM, quando comparadas às lesões cutâneas da LCL ($p < 0,01$). Além disto, a análise de acordo com a resposta ao tratamento antimonial demonstrou que, a proporção de células AIM2⁺ era significativamente mais baixa nos pacientes bons respondedores, comparados aos pacientes maus respondedores ($p < 0,05$) (**Fig.4.3C**). O adaptador ASC estava presente em todas as amostras testadas, no entanto não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes (**Fig.4.3D**). Embora algumas amostras tenham demonstrado a marcação para o NLRP3 e da caspase-1, a análise da produção *in situ* para estas proteínas não evidenciou alterações estatisticamente significativas (dados não demonstrados).

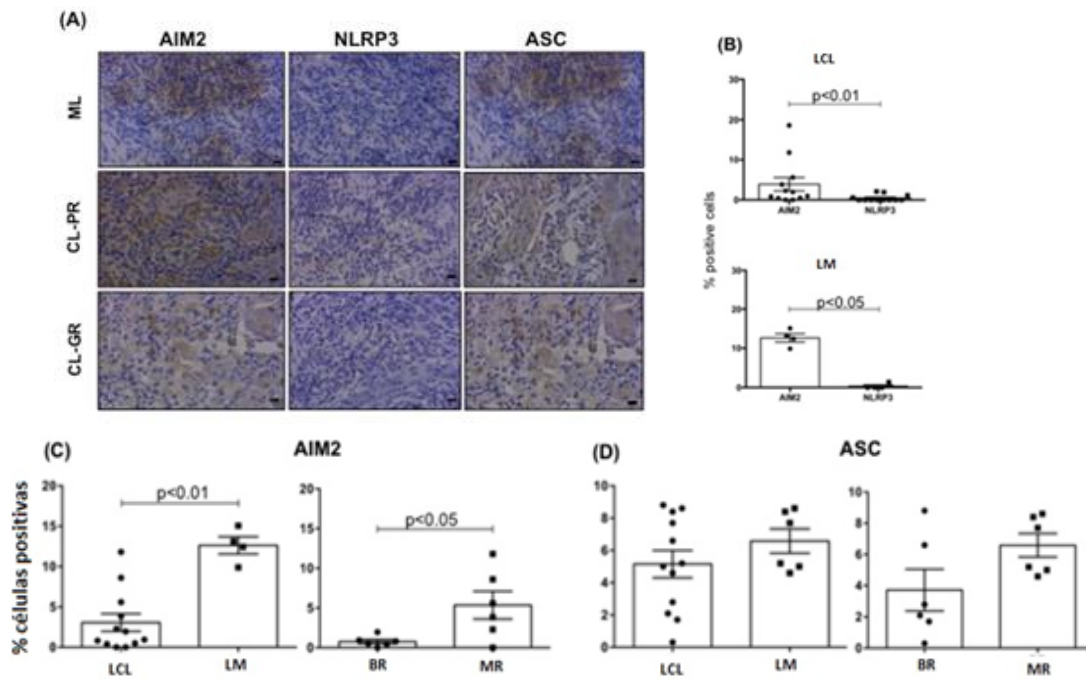


Figura 4.3: imagens representativas de lesões conservadas em formalina a 10%, embocadas em parafina, incubadas com anticorpos anti-AIM2; anti-NLRP3; e ASC respectivamente, observadas à microscopia ótica no aumento de 400X; barra de 10 μm (**Fig.4.3A**); representação gráfica dos dados obtidos pela técnica da imunohistoquímica, demonstrando a diferença do percentual de células AIM2⁺ comparadas ao percentual de células NLRP3⁺, encontradas na LCL e na LM (**Fig. 4.3B**); Representação gráfica demonstrando percentual de células AIM2⁺ na LM e na LCL e percentual de células AIM2⁺ na LCL-MR e na LCL-BR (**Fig.4.3C**); representação gráfica demonstrando percentual de células ASC⁺, comparando os grupos LCL com LM e LCL-BR e LCL-MR (**Fig. 4.3D**).

4.6 Imunohistoquímica da IL-1 β

Todos os casos de LTA exibiram a produção local da IL-1 β com o padrão de imunocoloração intracelular característico (**Fig.4.4A**). Ao se avaliar a proporção de células IL-1 β ⁺ de acordo com a forma clínica, observamos que o percentual de células IL-1 β ⁺ tende a ser maior na LM, quando comparado à LCL ($p=0,059$) (dado não demonstrado). Um resultado similar foi obtido, com uma maior proporção de células IL-1 β ⁺ no grupo dos pacientes maus respondedores, quando comparado ao grupo dos pacientes bons respondedores. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (**Fig.4.4B**).

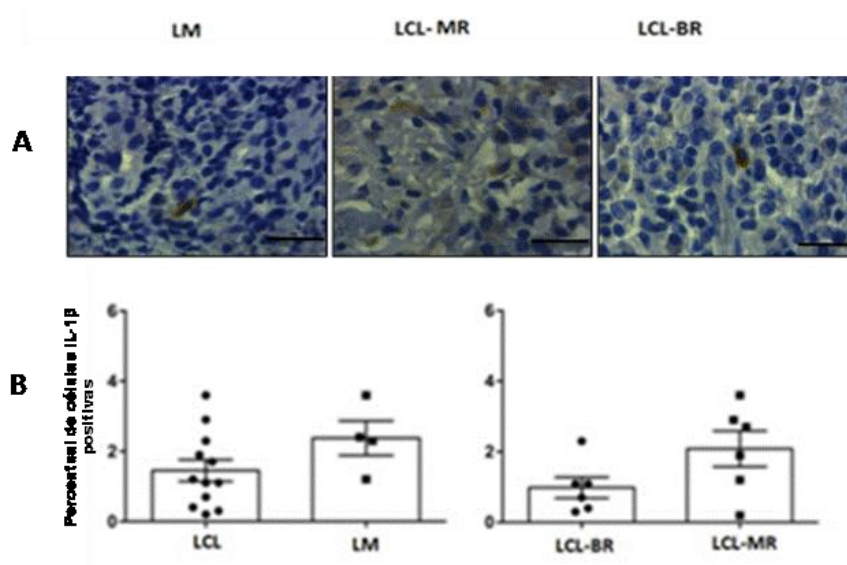


Figura 4.4: imagens representativas de fragmentos de pele coletadas por biópsia de lesões conservadas em formalina a 10%, emblocadas em parafina, incubadas com anticorpos anti-IL-1 β observadas à microscopia ótica no aumento de 400X; barra de 10 μ m (**Fig.4.4A**); representação gráfica do percentual de células IL-1 β comparando, no primeiro gráfico as formas clínicas LCL e LM; o segundo gráfico demonstra o percentual de células marcadas na LCL-MR comparadas com a LCL-BR (**Fig.4.4B**).

4.7 Aspectos clínicos e demográficos dos pacientes relacionados à carga parasitária

Ao avaliar a distribuição dos pacientes nas diversas formas clínicas quanto à faixa etária observamos idades mais avançadas com significância estatística na leishmaniose mucosa (LM) comparada à leishmaniose cutânea localizada ($p<0,05$). Este achado foi semelhante ao encontrado no estudo dos inflamassomos. A leishmaniose mucocutânea (LMC) apresentou faixa etária mais elevada quando comparada à leishmaniose cutânea localizada ($p<0,01$) (**Fig.**

4.5A). Quanto à resposta de hipersensibilidade retardada aferida pela reação intradérmica de Montenegro (MTN) houve uma maior reatividade na leishmaniose mucosa (LM) comparada tanto à leishmaniose cutânea localizada (LCL) ($p < 0,01$), quanto à leishmaniose mucocutânea ($p < 0,01$) (**Fig. 4.5B**). O número de lesões foi superior na leishmaniose mucocutânea quando comparada com a leishmaniose cutânea localizada ($p < 0,01$), assim como quando esta forma foi comparada com as recidivas (REC) ($p < 0,05$) (**Fig.4.5C**). Na leishmaniose mucosa observamos um tempo de evolução mais longo quando comparado à leishmaniose cutânea localizada ($p < 0,01$). Na forma mucocutânea o tempo de evolução também foi mais prolongado quando comparado com a leishmaniose cutânea localizada ($p < 0,05$) (**Fig.4.5D**). Observamos ainda um período de duração mais longo nas lesões recidivantes (REC) quando comparadas às lesões iniciais da leishmaniose cutânea localizada (primLCL) ($p < 0,05$) (**Fig.4.5E**).

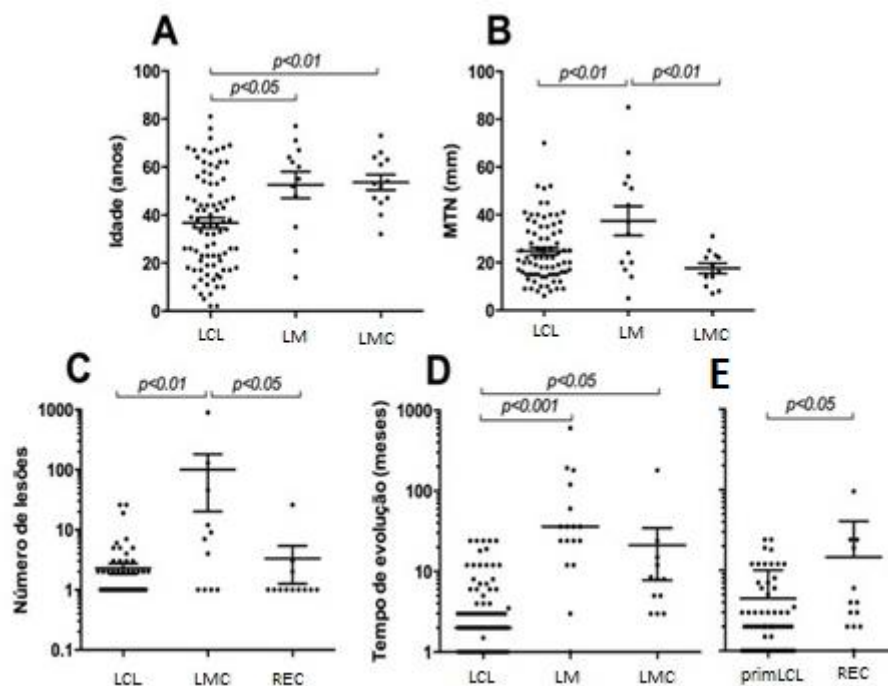


Figura 4.5: representação gráfica dos pacientes estudados na série para avaliação da carga parasitária quanto a idade **(A)**, reação de hipersensibilidade retardada através da reação de Montenegro (MTN) aferida em milímetros (mm) **(B)**, número de lesões **(C)**, tempo de evolução de doença (meses) **(D)** e **(E)**. LCL - Leishmaniose cutânea; LM - Leishmaniose mucosa; LMC - Leishmaniose mucocutânea; REC - Recidiva de leishmaniose cutânea localizada; PrimREC - lesões iniciais de Leishmaniose cutânea localizada; REC - Recidivas secundárias às lesões de leishmaniose cutânea localizada iniciais em pacientes que responderam mal ao tratamento.

4.8 Ensaio de quantificação do parasita

As curvas padrão de quantificação para ambos os alvos (Cq versus logarítimo do número de células do parasita ou massa de DNA humano) demonstrou eficiências semelhantes (96,66% para SSR e 92,25% para ACT), boa relação linear (r^2 de 0,99 para ambos) e uma ampla faixa de linearidade (“linear dynamic range”). A eficiência para as curvas do parasita não foi afetada pela presença do DNA humano. As temperaturas de desnaturação (“melting temperatures” – Tm) foram de 78,0°C ±0,5°C para os ensaios SSR e de 81,0 ± 0,5°C para ACT. Os controles negativos forneceram valores indetectáveis de amplificação de SSR. Cargas parasitárias não detectáveis não foram plotadas.

4.9 Carga parasitária tissular da *L. (V.) braziliensis* nas diferentes formas clínicas e respostas ao tratamento

Houve uma tendência, embora sem significância estatística, a um menor parasitismo tissular nos casos de leishmaniose mucosa comparados à leishmaniose cutânea localizada. Observou-se ainda nas cicatrizes uma carga parasitária muito baixa, na maioria das vezes indetectável, com valores significativamente mais baixos do que na LCL ($p < 0,05$) (**Fig.4.6A**). Seguindo a mesma tendência de maior carga parasitária nas lesões cutâneas do que nas mucosas, as amostras de pele coletadas dos pacientes com leishmaniose mucocutânea (LMC) demonstraram níveis de carga parasitária mais elevados do que as amostras coletadas das lesões mucosas dos mesmos pacientes ($p < 0,05$) (**Fig.4.6B**). É interessante reportar que ao se separar o grupo dos pacientes com LCL que apresentaram boa resposta ao tratamento (BR) dos pacientes com má resposta ao tratamento (MR), neste último grupo observa-se um nível mais baixo de parasitismo do que os pacientes com boa resposta ao tratamento ($p < 0,01$) (**Fig.4.6C**). Ao analisarmos o grupo dos pacientes que responderam mal ao tratamento, separando as amostras coletadas na primeira recidiva (1ºREC) de lesões associadas à recidivas secundárias (2ºREC), a recidiva inicial (1ºREC) apresentou uma menor carga parasitária quando comparada ao grupo de pacientes com boa resposta ao tratamento ($p < 0,05$) (**Fig.4.6D**).

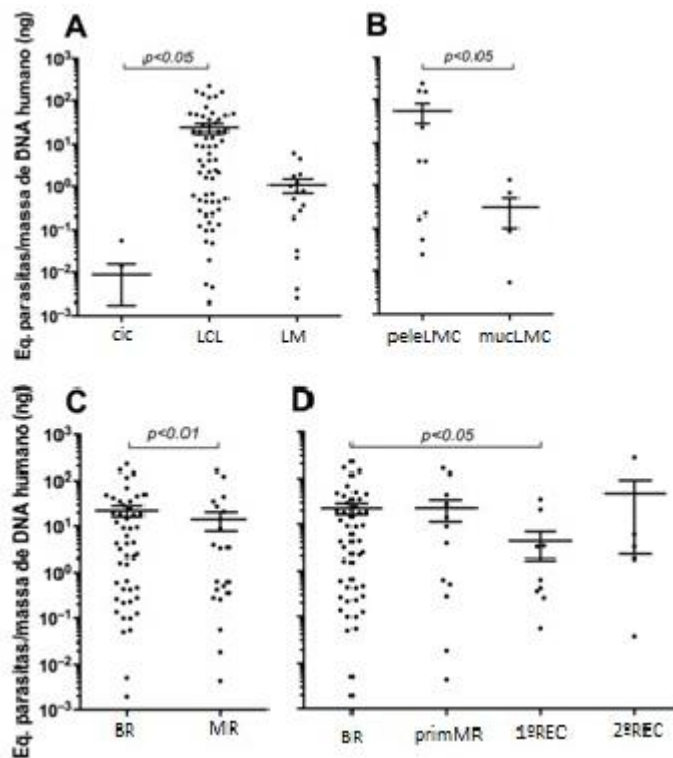


Figura 4.6: representação gráfica correlacionando o equivalente de parasitas por massa de DNA humano (Eq. parasitas/massa de DNA em ng) nas biópsias coletadas de cicatrizes de leishmaniose cutânea localizada (cic), das lesões ativas de leishmaniose cutânea localizada (LCL) e das lesões mucosas de pacientes com a forma mucosa (LM) **(A)**. Comparação entre Eq.parasitas/massa de DNA em ng parasitária das lesões cutâneas (peleLMC) com as lesões mucosa (mucLMC) da forma leishmaniose mucocutânea **(B)**, Razão entre Eq.parasitas/massa de DNA em ng no grupo de pacientes com LCL com boa resposta ao tratamento (BR) e pacientes da mesma forma mas que responderam mal ao tratamento (MR) **(C)**, relação entre o Eq.parasitas/massa de DNA em ng dos pacientes com boa resposta ao tratamento (BR), lesão primária da má resposta ao tratamento (primMR), primeira lesão de recidiva com má resposta ao tratamento (1ºREC) e recidivas secundárias (2ºREC) **(D)**.

4.10 Carga parasitária tissular da *L. (V.) braziliensis* de acordo com o tempo de evolução

Houve variação da carga parasitária de acordo com o tempo de evolução. O equivalente de parasitas por massa de DNA humano foi significativamente maior nas lesões no tempo de evolução menor do que três meses (<3meses), comparado às lesões com tempo de evolução mais longo (≥ 12 meses) ($p < 0,01$) (Fig.4.7).

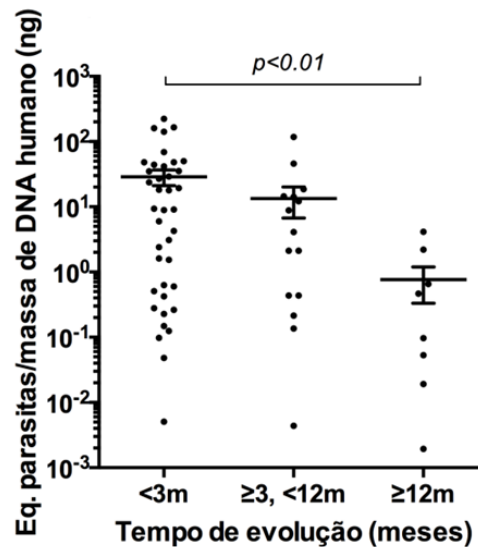


Figura 4.7: representação gráfica correlacionando o equivalente de parasitas por massa de DNA humano (Eq. parasitas/massa de DNA em ng) nas biópsias coletadas em tempo de evolução de doença <3 meses, ≥ 3 meses e <12 meses e ≥ 12 meses.

5. Discussão

Em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (V.) braziliensis* localizada no estado do Rio de Janeiro observa-se, na maioria dos pacientes, uma evolução clínica benigna e uma excelente resposta ao tratamento com o antimoniato de meglumina. No Brasil o uso do Glucantime®, medicamento de primeira linha para o tratamento da leishmaniose, oferece várias limitações tais como, administração apenas pela via parenteral, efeitos tóxicos cumulativos e potencial risco de indução de resistência (Marsden, 1985; Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Alvar *et al.*, 2006; revisto por Frézard *et al.*, 2009; BRASIL, 2013). A avaliação clínica na fase inicial das lesões cutâneas em pacientes com LCL não permite determinar o prognóstico. Em áreas geográficas de transmissão estável de apenas cepas com baixo potencial de virulência, como é o caso da região sudeste do Brasil, o estabelecimento de fatores preditores de gravidade de doença poderão ser úteis para a indicação de esquemas terapêuticos mais curtos, pelo tempo mínimo necessário para a obtenção de cura clínica. A nossa proposta foi avaliar tanto dois inflamassomos, quanto a carga parasitária de *Leishmania (V.) braziliensis* como potenciais instrumentos para estabelecer fatores prognósticos que possam ser úteis na prática clínica. Até o momento, há poucos estudos avaliando os inflamassomos e a IL-1 β na LTA (Fernández-Figueroa *et al.*, 2012; Lima-Junior *et al.*, 2013; Gurung *et al.*, 2015; Novais *et al.*, 2015). Mantendo a mesma perspectiva de estabelecer novos critérios prognósticos, realizamos outro estudo correlacionando a carga parasitária através da PCR em tempo real quantitativa (qPCR) com as diversas formas da doença e respostas ao tratamento. O alvo de *Leishmania* escolhido foi a subunidade menor do gene de RNA ribossomal (SSR). Há até o momento, apenas outro estudo realizado no Peru que também utilizou esta abordagem, no entanto, o kDNA de *Leishmania (Viannia)* foi o alvo escolhido (Jara *et al.*, 2013).

A resposta inflamatória tanto é capaz de exercer efeitos benéficos, como deletérios, dependendo das múltiplas variáveis envolvidas no processo de interação parasita-hospedeiro (revisto por Davis *et al.*, 2011; revisto por Kulkarni *et al.*, 2016).

A primeira etapa de nosso estudo abordou a resposta imune inata, através da avaliação dos inflamassomos AIM2 e NLRP3, seus componentes intermediários a caspase-1 e o adaptador ASC, e um produto da ativação destes inflamassomos a IL-1 β , pela técnica da RT-PCR em tempo real e pela técnica da imunohistoquímica.

A partir da análise da PCR em tempo real foi possível detectar uma significativa maior expressão do AIM2 na leishmaniose mucosa (LM) do que na leishmaniose cutânea localizada (LCL). Resultados comparáveis foram obtidos pela imunohistoquímica, onde a avaliação do percentual de células AIM2⁺ no infiltrado inflamatório nas formas LCL e LM, demonstrou uma proporção significativamente mais elevada nesta última. É importante ressaltar, no entanto, que estas duas formas clínicas apresentam mais diferenças do que semelhanças. Apesar de serem causadas pelo mesmo agente infeccioso, observa-se comparativamente na LM um menor parasitismo tecidual (Magalhães *et al.*, 1986), o tempo de evolução mais longo, a faixa etária mais elevada e o predomínio do gênero masculino. Nesta forma clínica, o prognóstico é determinado pelo quadro clínico e não necessita de fatores laboratoriais adicionais para o estabelecimento do esquema terapêutico adequado. No entanto, o registro da ocorrência tanto da expressão do AIM2 na LM, quanto a produção *in situ* de células AIM2⁺, é importante, para a melhor compreensão da resposta imune inata, já que a maioria dos estudos relacionados aos inflamassomos na LTA avaliaram apenas o NLRP3.

O achado de uma redução na expressão do AIM2 na LCL em pacientes que responderam bem ao tratamento com Glucantime®, em relação à pele normal, indica que existe um mecanismo de inibição da expressão deste inflamassomo naqueles pacientes que irão evoluir de maneira satisfatória ao tratamento. Não encontramos na revisão da literatura, informações sobre os mecanismos de inibição da expressão do AIM2, porém já foi demonstrada a superexpressão do AIM2 em um estudo *in vitro* com monócitos humanos estimulados pela combinação do LPS da *Neisseria meningitidis* com a IL-10 (Gopinathan *et al.*, 2012). O AIM2 é constitutivamente expresso nos melanócitos (DeYoung *et al.*, 1997), nos leucócitos do sangue periférico, nas células dendríticas e nos queratinócitos (Roberts *et al.*, 2009; Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009; Fernandes-Alnemri *et al.*, 2010). Pela PCR em tempo real observamos uma tendência a uma

maior expressão do AIM2 nos pacientes que responderam mal ao tratamento comparada com os pacientes que responderam bem ao tratamento. Confirmamos esta tendência com o resultado pela técnica da imunohistoquímica, onde encontramos um aumento estatisticamente significativo de células AIM⁺ no grupo dos pacientes que responderam mal ao tratamento, comparados aos pacientes que responderam bem ao tratamento. Não há estudos relacionando AIM2 e a cicatrização de lesões. No entanto, Bitto e colaboradores correlacionaram em modelos murinos a inibição do NLRP3 com a melhor cicatrização de lesões cutâneas relacionadas ao diabetes mellitus (Bitto *et al.*, 2014). Mecanismos relacionados à ativação da resposta imune podem ser capazes de estimular uma maior indução da expressão do AIM2. Sabemos que o AIM2 é induzido pelo INF- γ nos queratinócitos (Dombrowski *et al.*, 2011; de Koning *et al.*, 2012; Kopfnagel *et al.*, 2011) e nos macrófagos (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2010). Maretti-Mira e colaboradores descreveram um maior número de células produtoras de IFN- γ nas lesões cutâneas de indivíduos com LCL que responderam mal ao tratamento (Maretti-Mira *et al.*, 2011a). Sendo assim, nos pacientes que responderam mal ao tratamento, pode haver uma relação entre o aumento do IFN- γ e uma maior expressão do AIM2. Além disto, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são capazes de ativar os inflamassomos (revisto por Harijith *et al.*, 2014). Portanto, uma maior produção do AIM2 nas lesões na LCL, pode estar relacionada ao mau prognóstico e, provavelmente, está associada com a resposta inflamatória mais exuberante.

Ao se comparar o percentual de células positivas para os dois inflamassomos pela técnica da imunohistoquímica, observamos que houve diferenças estatisticamente significativas tanto na LCL como na LM, com maior percentual de células AIM2⁺, quando comparada às células NLRP3⁺. Em nossa casuística encontramos uma maior abundância do AIM2 do que NLRP3. Os primeiros resultados relacionando os inflamassomos com a leishmaniose tegumentar, abordaram a interação do NLRP3 e múltiplos modelos murinos, infectados basicamente com duas espécies de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*; e *L. (L.) major*. Foi descrito um efeito protetor do NLRP3 na infecção por *L. (L.) amazonensis*. Se identificou, ainda nesse estudo, que a Il-1 se liga ao receptor IL-1R e MyD88, estimulando a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS)

nos macrófagos, favorecendo a destruição dos parasitas (Lima-Junior *et al.*, 2013). No entanto, ao se estudar os efeitos dos inflamassomos na leishmaniose experimental por *L. (L.) major*, observa-se o resultado oposto. Camundongos deficientes em NLRP3, ASC ou com deficiência de receptores para a IL-1 β ou para a IL-1, apresentam evolução clínica mais favorável (Charmoy *et al.*, 2016). Um outro estudo experimental de infecção por *L. (L.) major* em modelo murino, demonstrou que a ativação do NLRP3 foi prejudicial durante a fase ativa da doença, sugerindo que a neutralização da IL-18 possa ser um alvo estratégico na abordagem terapêutica. Além disto a regulação negativa da expressão do NLRP3 foi associada a uma melhor resposta clínica, com redução das citocinas de resposta T_{H2} e aumento das citocinas T_{H1} (Gurung *et al.*, 2015). Até o momento, foi realizado apenas um estudo em seres humanos, abordando os inflamassomos AIM2 e NLRP3, em fragmentos de lesões cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis*. O estudo genômico transcricional de alta performance, evidenciou alta expressão dos genes do AIM2 e NLRP3 nas amostras avaliadas (Novais *et al.*, 2015).

Ao avaliarmos pela técnica da RT-PCR o NLRP3 e o ASC, não foram possível estabelecer correlações estatisticamente significativas nos dados relacionados às duas formas clínicas ou às respostas ao tratamento. É importante ressaltar que a expressão do NLRP3 tendia à zero na pele normal, embora ocorra nesta condição, a multiplicação exponencial dos queratinócitos (Feldmeyer *et al.*, 2007). Estes dados corroboram o nosso achado de baixa expressão do mRNA do NLRP3 em nossas amostras de pele normal. Em resposta ao estímulo dos inflamassomos NLRC4, NLRP3 ou AIM2, o adaptador ASC endógeno pode se agregar na região perinuclear no citoplasma para formar um único foco de ASC. Este agregado parece servir como plataforma para o recrutamento e ativação da caspase-1 (Broz *et al.*, 2010b). A oligomerização do ASC forma um agregado perinuclear, denominado piroptossomo, que é um dos responsáveis pela piroptose, a morte celular mediada pela caspase-1, capaz de promover a eliminação de patógenos intracelulares nos macrófagos infectados (Compan *et al.*, 2015). O adaptador ASC é importante tanto para o processamento, como para a secreção da IL-1 β (Broz *et al.*, 2010a).

Já a análise pela RT-PCR da enzima caspase-1, que é ativada pelos inflamassomos canônicos, demonstrou que tanto a leishmaniose mucosa como a leishmaniose cutânea localizada, e nesta última nas duas modalidades de resposta ao tratamento, houve uma mais elevada expressão da caspase-1 do que na pele normal. A caspase-1 é produzida como um precursor citosólico, que sofre a indução de autoativação pela proximidade, através da formação de dímeros (Martinon *et al.*, 2002). Esta enzima, dependendo da composição do inflamassomo, pode existir em dois estados de ativação: não processada e totalmente processada. No entanto, foi demonstrado em estudo com a caspase-1 de camundongos, que o autoprocessamento da caspase-1 não é um pré-requisito para a sua ativação (Broz *et al.*, 2010a; revisto por Jiménez-Fernández *et al.*, 2015). O recrutamento da caspase-1 através da via canônica pelos inflamassomos é suficiente para a sua ativação na ausência do autoprocessamento (Van Opdenbosch *et al.*, 2014). A autoativação apenas pela presença da pró-caspase-1, indica a importância do controle da síntese desta enzima. Corroborando esta hipótese, encontramos baixos níveis de expressão da pró-caspase-1 na pele normal. Houve uma maior expressão de caspase-1, tanto nas duas formas de apresentação clínica, como nos dois grupos de resposta ao tratamento da leishmaniose cutânea localizada. Em vigência da inflamação, o fator de transcrição NFκB ativa diretamente a expressão da pró-caspase-1. A inibição do eixo NFκB/caspase-1 interrompe tanto a primeira etapa de cura das feridas cutâneas, a fase inflamatória, como impede a etapa proliferativa, em que ocorre o estímulo à multiplicação dos queratinócitos iniciando a cicatrização (Lee *et al.*, 2015). Paradoxalmente o NFκB também induz a superexpressão do receptor de autofagia p62, responsável pelo reconhecimento e remoção de mitocôndrias danificadas, exercendo assim uma função anti-inflamatória (Zhong *et al.*, 2016).

Em nosso estudo a expressão do NLRP3 foi detectada em 71% dos pacientes do grupo leishmaniose cutânea localizada e 72,5% nos casos de leishmaniose mucosa. Observamos, no entanto, pela técnica da imunohistoquímica, uma proporção muito mais baixa de células NLRP3⁺ no infiltrado inflamatório (25% na LCL e 25% na LM), do que a esperada em relação ao que foi encontrado em nossos resultados pela RT-PCR. Estes dados

corroboram os achados de um estudo *in vitro* com cultura de células de linhagem monocítica humana (THP1), expostas ao GP63 purificado e exossomos contendo GP63 derivada de *L. (L.) mexicana*. Neste caso, em consequência da clivagem e da inativação do NLRP3, houve a inibição da maturação e da liberação pelos macrófagos da IL-1 β (Shio *et al.*, 2015). Por este motivo, formulamos a hipótese de que o GP63 impacta negativamente a presença do NLRP3 nos infiltrados inflamatórios. Em nosso estudo submetido (Moreira *et al.*), encontramos nos pacientes com LCL que responderam mal ao tratamento, um maior número de células GP63⁺ do que nos que responderam bem. É possível, portanto, que o fator de virulência GP63 esteja envolvido na redução do número de células NLRP3⁺.

Os inflamassomos são responsáveis pela ativação da IL-1 β e da IL-18. Por este motivo, avaliamos pela técnica da imunohistoquímica a IL-1 β , principal citocina inflamatória na LTA. O padrão da imunocoloração foi semelhante em todos os grupos de pacientes e o percentual de células IL-1 β ⁺ demonstrou uma tendência de presença em maior abundância na leishmaniose mucosa do que na leishmaniose cutânea localizada. Nesta última forma de apresentação clínica, houve uma tendência ao maior percentual de células IL-1 β ⁺ no grupo dos pacientes que evoluíram mal ao tratamento, quando comparado ao grupo com boa resposta. Estudos experimentais demonstram um efeito deletério da resposta inflamatória ao se infectar camundongos suscetíveis à infecção (BALBc) com *L. (L.) major*. As lesões cutâneas foram atenuadas na ausência de um dos genes IL-1 (IL-1 α ou IL-1 β) e o bloqueio dos antagonistas de receptores para IL-1 (IL-1Ra), foram relacionados à uma maior gravidade das lesões cutâneas (Voronov *et al.*, 2010). Uma superexpressão da IL-1 β foi associada à persistência do parasita no sítio de inoculação e lesões mais extensas (Charmoy *et al.*, 2016). A ativação da imunidade inata deflagrada pela infecção por *Leishmania* spp. tanto pode ser útil para o controle da infecção, como potencializar os efeitos maléficos, representados pela piora dos efeitos locais e à distância. Em uma região em que ocorre a concomitância de infecção por *L. (L.) mexicana* e uma mutação com ganho de função da IL-1 β , foi possível observar que o aumento constitucional de IL-1 β associava-se às formas clínicas de maior gravidade e com maiores cargas parasitárias. Ao se avaliar ainda pela técnica da imunohistoquímica a distribuição

da IL-1 β em lesões de pele, os autores observaram que a distribuição difusa da IL-1 β estava associada aos pacientes com alta carga parasitária, tanto na leishmaniose cutânea localizada (LCL) como na leishmaniose cutânea difusa (LCD), enquanto que nos pacientes com LCL, com uma menor proporção de parasitas, a IL-1 β foi visualizada apenas no meio intracelular (Fernández-Figueroa *et al*, 2012). Na nossa casuística, no entanto, não foi possível correlacionar a IL-1 β e a gravidade da doença. Para validar ou refutar esta hipótese, há a necessidade de aumentarmos o número de casos estudados.

Nesta parte do estudo concluímos que embora o NLRP3 seja o inflamassomo mais conhecido por ser ativado em resposta a uma grande variedade de estímulos (Schroder & Tschop, 2010), em nossa casuística que avaliou pacientes com LTA em uma área endêmica para *L. (V.) braziliensis*, o AIM2, um receptor seletivo que se liga apenas ao DNA dupla fita no citoplasma, predominou em relação ao NLRP3. Em relação aos dois inflamassomos testados, o AIM2 foi o principal ativador da IL-1 β e pode contribuir para a gravidade da LTA. Abordagens futuras correlacionando os inflamassomos e a LTA devem incluir o AIM2 dentre os alvos escolhidos para estudo. Um número maior de células AIM⁺ foi associado à leishmaniose mucosa em comparação à leishmaniose cutânea localizada, havendo ainda uma correlação entre a maior produção deste inflamassomo e um pior prognóstico na LCL.

Na série relacionada à análise da carga parasitária encontramos uma associação estatisticamente significativa entre as faixas etárias mais elevadas e a leishmaniose mucosa e a leishmaniose mucocutânea, quando comparadas com a leishmaniose cutânea localizada. Sabemos que o risco de infecções em geral aumenta em indivíduos idosos (Boe *et al.* 2017) e que tanto a LM como a LMC são frequentemente associadas à imunodeficiência, e geralmente são secundárias a um processo de reativação de infecção antiga (Lindoso *et al.*, 2009). Como no Brasil há uma superposição das epidemias de aids e de leishmaniose tegumentar (Guerra *et al.*, 2011), tem ocorrido aumento do número de casos de leishmaniose tegumentar associadas à imunossupressão. Esta projeção pode ser ilustrada por um estudo que avaliou um total de 15 pacientes coinfectados com HIV e *Leishmania* spp., nos quais 80% apresentaram lesão

mucosa e 53% desenvolveram a leishmaniose mucocutânea. Em 53% destes pacientes foram observadas recidivas (Lindoso *et al.*, 2009).

O número de lesões na leishmaniose mucocutânea foi superior quando comparado tanto à leishmaniose mucosa quanto às reativações. Validando este resultado sabemos que uma das principais características da leishmaniose mucocutânea é a multiplicidade de lesões (Marsden, 1990). Na leishmaniose mucosa foram observadas medidas superiores da reação intradérmica de Montenegro comparadas tanto à leishmaniose cutânea localizada quanto à leishmaniose mucocutânea. Estes achados são semelhantes aos que foram encontrados na nossa série para estudo da imunidade inata, assim como os resultados descritos na literatura (revisto por Reithinger *et al.*, 2007). Um tempo de progressão mais longo foi observado na leishmaniose mucosa e na leishmaniose mucocutânea ao se comparar cada uma destas duas formas clínicas com a lesão primária da leishmaniose cutânea localizada. As recidivas da leishmaniose cutânea localizada evoluem por um período de tempo mais longo do que a lesão primária de leishmaniose cutânea localizada. Concluimos portanto, que a evolução clínica mais arrastada está relacionada ao mau prognóstico da doença. Em um estudo conduzido em área endêmica do Rio de Janeiro, os pacientes que responderam mal ao tratamento exibiram um maior número de células produtoras de IFN- γ , IL-10 e TGF β com predominância da atividade do IFN- γ e elevada atividade das metaloproteinases. Nos pacientes que responderam bem ao tratamento houve uma prevalência da IL-10 associada a uma baixa atividade de gelatinase nas lesões (Maretti-Mira *et al.*, 2011a; Maretti-Mira *et al.*, 2011b). Dependendo da razão entre o IFN- γ , a IL-10 e o TGF- β , o tempo de evolução pode ser mais longo, apesar de uma carga parasitária mais baixa. A carga parasitária dos pacientes que responderam bem ao tratamento com Glucantime® (BR) apresentaram valores significativamente maiores do que os que responderam mal ao tratamento com Glucantime®. Houve ainda diferença estatisticamente significativa no grupo dos pacientes com má resposta ao tratamento que recidivaram, no qual a primeira recaída (1ºREC) demonstrou um nível mais baixo de parasitismo quando comparada ao grupo dos pacientes com boa resposta ao tratamento, indicando que mesmo nas lesões recidivantes há mecanismos parciais de controle do parasita. Esta incapacidade dos pacientes

em prevenir as recidivas é relacionada, em parte, à persistência do parasita. Houve uma tendência a uma carga parasitária menor na recidiva inicial (1ºREC) comparada às recidivas secundárias (2ºREC). As cargas parasitárias mais elevadas nas recidivas secundárias podem estar relacionadas à exaustão do sistema imune. Houve uma correlação inversa e discretamente negativa entre o parasitismo tissular e o tempo de evolução da doença, onde as cargas parasitárias mais baixas foram observadas em lesões com maior tempo de evolução. Sendo assim, durações mais longas da doença foram associadas à carga parasitária mais baixa. Quando a dose de infecção foi avaliada em um modelo murino por *L. (L.) major*, o grupo que recebeu uma dose inicial baixa do inóculo, apesar de ter desenvolvido quadro inicial mais brando na fase aguda, evoluiu para a infecção crônica e necessitou de um período de tempo mais longo para que ocorresse a cicatrização (Kimblin *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que títulos mais baixos do parasita possam estar relacionados com a evolução mais longa da doença, corroborando os dados da literatura que encontraram um parasitismo escasso em infecções crônicas por *L. (V.) braziliensis* (Weigle *et al.*, 2002).

Estudos anatomopatológicos revelam uma maior abundância de parasitas na leishmaniose cutânea localizada do que na leishmaniose mucosa (Magalhães *et al.*, 1986). Nossos achados apontam para uma tendência, ainda que sem significado estatístico, de uma menor carga parasitária na leishmaniose mucosa em relação à leishmaniose cutânea localizada. Este resultado apresenta semelhanças com os encontrados por Jara e colaboradores, com uma proporção significativamente maior de indivíduos com LCL apresentando uma carga parasitária mais elevada do que pacientes com a forma mucosa (Jara *et al.*, 2013). A escolha do kDNA por Jara e colaboradores pode ter contribuído para a maior robustez dos seus resultados já que o kDNA oferece valores positivos com maior frequência do que a SSR (Koltas *et al.*, 2016) e é um teste específico (Weigle *et al.*, 2002), no entanto, o uso deste alvo pode comprometer a acurácia do resultado pela heterogeneidade da sua composição e variação do número de cópias entre as espécies, cepas e isolados (Mary *et al.*, 2004; Weirather *et al.*, 2011). A resposta imune e principalmente a resposta do tipo T_{H1} é fundamental para a resolução do processo infeccioso nas lesões relacionadas à

leishmaniose tegumentar (revisito por Reithinger *et al.*, 2007). Este processo, no entanto, não parece ser suficiente para induzir uma cura parasitológica pois, na maioria dos pacientes, há a persistência, em títulos baixos de *Leishmania* spp. nas lesões (Schubach *et al.*, 1998b). Sendo assim em determinados indivíduos a resolução do processo infeccioso não implica a eliminação completa do parasita, estimulando a resposta imune antígeno específica para *Leishmania* spp. e impedindo a reinfeção (Coutinho *et al.*, 2002).

A abordagem diagnóstica e terapêutica em pacientes portadores de doenças infecciosas se mostra desafiadora já que a interação entre o parasita e o hospedeiro se apresenta de forma variável, indicando que a conduta adequada para um paciente pode ser ineficaz para outro. Na história recente da medicina a epidemia de aids surgiu para modificar paradigmas demonstrando que o acompanhamento laboratorial exerce função mais importante, pelo menos nas fases iniciais da infecção, do que os achados clínicos. Este novo procedimento resultou não só no aumento da sobrevida, mas principalmente contribuiu com uma melhor qualidade de vida para milhões de pessoas infectadas (Cao *et al.*, 2016). Este acompanhamento laboratorial inclui uma abordagem imunológica, com a avaliação da relação entre as células T CD4⁺ e TCD8⁺ e outra relacionada com o agente etiológico através da quantificação pela PCR em tempo real da carga viral do HIV (De Salvador-Guillouë *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2016). O sucesso indiscutível da inclusão destes dois métodos estimulou a busca de potenciais fatores prognósticos que possam ser úteis para a abordagem de outras doenças infecciosas. Este fato se reflete em nosso trabalho, onde avaliamos a relevância de alvos relacionados à imunidade inata, pela pesquisa do AIM2 e do NLRP3 e fator relacionado ao parasita através do estudo da carga parasitária, os correlacionando com o prognóstico. Infelizmente na leishmaniose tegumentar a análise do sangue periférico não demonstra resultados animadores, já que na maioria das vezes, o parasitismo ocorre predominantemente na pele e/ou na mucosa (Vergel *et al.*, 2005; de Oliveira Camera *et al.*, 2006). Em nosso estudo encontramos resultados promissores relacionando o AIM2 nas lesões e o prognóstico da doença. Indica-se a biópsia diagnóstica de rotina antes do início do tratamento logo, informações relacionadas ao AIM2, poderão permitir a adoção de condutas médicas individualizadas. Quanto à carga parasitária os resultados

não se revelaram atraentes, indicando que a abundância do parasita na infecção por *L. (V.) braziliensis* em nossa área endêmica não parece exercer efeito determinante para o curso da infecção. Avaliamos ainda que o nosso trabalho contribui para a elucidação de alguns tópicos relacionados à fisiopatogenia da leishmaniose tegumentar, mais especificamente na região endêmica do Rio de Janeiro, que poderão contribuir para melhor entendimento de intercorrências apresentadas pelos doentes afetados por esta condição.

6. Conclusões

O inflamassomo AIM2 participa na fisiopatogenia da LTA por *L. (V.) braziliensis*, e está mais expresso particularmente nas lesões mucosas;

Há um predomínio do inflamassomo AIM2 em relação ao NLRP3 nas lesões por *L. (V.) braziliensis*, tanto nos níveis de mRNA como de proteína;

A abundância de NLRP3 não muda nas formas clínicas ou nas respostas ao tratamento na leishmaniose por *L. (V.) braziliensis*;

O AIM2 foi produzido em maior proporção na LM do que na LCL;

O inflamassomo AIM2 apresentou níveis significativamente menores nos pacientes que responderam bem ao tratamento com Glucantime®, em comparação tanto a pele normal como às lesões dos maus respondedores, apontando o seu potencial como marcador prognóstico;

Houve coerência entre os dados de RT-PCR e os obtidos pela técnica da imunohistoquímica quanto ao AIM2 e o NLRP3, o que indica que os níveis de expressão refletem diretamente na abundância proteica;

Embora tenha ocorrido uma tendência a uma maior produção de IL-1 β na LM do que na LCL, e nesta última forma clínica, uma tendência a uma maior produção nos pacientes maus respondedores ao tratamento com Glucantime®, não observamos diferenças estatisticamente significativas;

Na leishmaniose tegumentar por *L. (V.) braziliensis* o microambiente de diferentes tecidos parece ser importante para determinação da carga parasitária;

A presença do parasito nas cicatrizes cutâneas pode indicar a sua atuação como ativador da resposta imune;

No que diz respeito à terapêutica, os pacientes com má resposta ao tratamento apresentaram cargas parasitárias menores, e significativamente mais baixas no primeiro episódio de recidiva, aumentando com o número dos eventos, relacionando com a refratariedade do paciente ao tratamento;

Houve uma relação inversa entre a carga parasitária e o tempo de evolução de doença. Títulos mais baixos do parasita foram observados em lesões mais antigas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T & Rouis M. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory nod of oxidative stress and inflammatory disease. *Redox Biol.* 2015;4:296-307. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.008 PMID: 25625584.

Aderem A & Ulevitch R. Toll-like receptors in the induction of innate immune response. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):782-7 PMID: 10963608.

Afonina IS, Müller C, Martin SJ & Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity.* 2015 Jun 16;42(6):991-1004. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.003 Review PMID: 26084020.

Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G & De Vargas Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989 Jan-Mar;84(1):19-28 PMID: 2319948.

Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K & Kharazmi. A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun.* 2000 Apr;68(4):1760-4 PMID: 10722561.

Akhter A, Caution K, Abu Khweek A, Tazi M, Abdulrahman BA, Abdelaziz DH, Voss OH, Doseff AI, Hassan H, Azad AK, Schlesinger LS, Wewers MD, Gavrilin MA & Amer AO. Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. *Immunity*. 2012 Jul 27;37(1):35-47. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.001 PMID: 22658523.

Alexander J & Bryson K. T helper (Th1/Th2) and *Leishmania* paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*. 2005 Jun 15;99(1):17-23 PMID: 15894106.

Alvar J, Yactayo S & Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*. 2006 Dec;22(12):552-76 PMID: 17023215.

Anderson CF, Mendez S & Sacks DL. Nonhealing infection despite TH1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57B/6 mice. *J Immunol*. 2005 Mar 1;174(5):2934-41 PMID: 15728505.

Atianand MK, Duffy EB, Shah A, Kar S, Malik M & Harton JA. *Francisella tularensis* reveals a disparity between human and mouse NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem*. 2011 Nov 11;286(45):39033-42. doi: 10.1074/jbc.M111.244079 PMID: 21930705.

Avettand-Fenoel V, Damond F, Gueudin M, Matheron S, Mélard A, Collin G, Descamps D, Chaix ML, Rouzioux C & Plantier JC. New sensitive one-step real-time duplex PCR method for group A and B HIV-2 RNA load. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):3017-22. doi: 10.1128/JCM.00724-14. PMID: 24920771.

Barral A, Almeida RP, de Jesus AR, Medeiros Neto E, Santos IA & Johnson W Jr. The relevance of characterizing *Leishmania* from cutaneous lesions. A simple approach for isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987 Oct-Dec;82(4):579. No abstract available PMID: 3507920.

Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nuñez G & Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol.* 2011 Jul 15;187(2):613-7. doi: 10.4049/jimmunol.1100613 PMID: 21677136.

Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA & Sacks DL. The role of interleukin (IL)-10 in persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med.* 2001 Nov 19;194(10):1497-506 PMID: 11714756.

Belkaid Y, Piccirilo CA, Mendez S, Shevach EM & Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002 Dec 5;420(6915):502-7 PMID: 12466842.

Berry I & Berrang-Ford L. Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis. *Soc Sci Med.* 2016 Oct;167:140-9. doi: 10.1016/j.socscimed.2016.04.038 PMID: 27194448.

Bezerra-Vasconcelos DR, Melo LM, Albuquerque ÉS, Luciano MC & Bevilaqua CM. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Exp Parasitol.* 2011 Nov;129(3):234-9. doi: 10.1016/j.exppara.2011.08.010 PMID: 21864530.

Bitto A, Altavilla D, Pizzino G, Irrera N, Pallio G, Colonna MR & Squadrito F. Inhibition of inflammasome activation improves the impaired pattern of healing in genetically diabetic mice. *Br J Pharmacol.* 2014 May;171(9):2300-7. doi: 10.1111/bph.1255 PMID: 24329484.

Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, Deeley M, March CJ, Prickett KS, Wignall J, Conlon PJ, Cosman D, Hopp TP, & Mochizuki DY. Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J Biol Chem.* 1988 Jul 5;263(19):9437-42 PMID: 3288634.

Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI & Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. 2010 Oct;40(10):2830-6. doi: 10.1002/eji.200940115 PMID: 20812234.

Boe DM, Boule LA & Kovacs EJ. Innate immune responses in the ageing lung. *Clin Exp Immunol*. 2017 Jan;187(1):16-25. doi: 10.1111/cei.12881 PMID: 27711979.

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Neto M & Barral A. A variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 1996 Nov;84(2):188-94 PMID: 8932768.

Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreutzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Löhning M & Pinschewer DD. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. *Science*. 2012 Feb 24;335(6071):984-9. doi: 10.1126/science.1215418 PMID: 22323740.

Bosque F, Saravia NG, Valderan L & Milon G. Distinct innate and acquired response to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scand J Immunol*. 2000 May;51(5):533-41 PMID: 10792848.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2ª edição atualizada; 3ª reimpressão. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013.

Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE & Monack DM. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*. 2010a Dec 16;8(6):471-83. doi: 10.1016/j.chom.2010.11.007 PMID: 21147462.

Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM & Monack DM. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *J Exp Med*. 2010b Aug 2;207(8):1745-55. doi: 10.1084/jem.20100257 PMID: 20603313.

Broz P & Monack DM. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev.* 2011 Sep;243(1):174-90. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01041.x PMID: 21884176.

Broz P, Ruby T, Belhocine K, Bouley DM, Kayagaki N, Dixit VM & Monack DM. Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. *Nature.* 2012 Oct 11;490(7419):288-91. doi: 10.1038/nature11419 PMID: 22895188.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J & Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797 PMID: 19246619

Byrne SN, Beaugie C, O'Sullivan C, Leighton S & Halliday GM. The immune-modulating cytokine and endogenous alarmin interleukin-33 is upregulated in skin exposed to inflammatory UVB radiation. *Am J Pathol.* 2011 Jul;179(1):211-22. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.010 PMID: 21703403.

Cao W, Mehraj V, Trottier B, Baril JG, Leblanc R, Lebouche B, Cox J, Tremblay C, Lu W, Singer J, Li T & Routy JP. Early Initiation Rather Than Prolonged Duration of Antiretroviral Therapy in HIV Infection Contributes to the Normalization of CD8 T-Cell Counts. *Clin Infect Dis.* 2016 Jan 15;62(2):250-7. doi: 10.1093/cid/civ809 PMID: 26349551.

Carlsen ED, Hay C, Henard CA, Popov V, Garg NJ & Soong L. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicide mechanism. *Infect Immun.* 2013 Nov;81(11):3966-74. doi: 10.1128/IAI.00770-13 PMID: 23918780.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A & Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994 Apr;56(4):315-25 PMID: 8023755.

Carvalho LP, Passos S, Schriefer A & Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012 Oct 4;3:301. doi: 10.3389/fimmu.2012.00301 PMID: 23060880.

Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira Lde O, Mestre GL, Ferreira AB, Morgado FN, Boité MC, Cupolillo E, Moraes MO & Porrozzi R. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. PLoS One. 2015 Apr 13;10(4) PMID: 25875101.

Charmoy M, Hurrell BP, Romano A, Lee SH, Ribeiro-Gomes F, Riteau N, Mayer-Barber K, Tacchini-Cottier F & Sacks DL. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. Eur J Immunol. 2016 Apr;46(4):897-911. doi: 10.1002/eji.201546015 PMID: 26689285.

Cassatella MA, Gasperini S & Russo MP. Cytokine expression and release by neutrophils. Ann N Y Acad Sci. 1997 Dec 15;832:233-42 PMID: 9704051.

Casson CN, Yu J, Reyes VM, Taschuk FO, Yadav A, Copenhaver AM, Nguyen HT, Collman RG & Shin S. Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 May 26;112(21):6688-93. doi: 10.1073/pnas.1421699112 PMID: 25964352

Cavani A, De Pitá O & Girolomoni G. New aspects of the molecular basis of contact allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2007 Oct;7(5):404-8 PMID: 17873579.

Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q & Dong C. Critical regulations of early TH17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. Immunity. 2009 Apr 17;30(4):576-87. doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.007 PMID: 19362022.

Clay GM, Sutterwala FS & Wilson ME. NLR proteins and parasitic disease. Immunol. Immunol Res. 2014 Aug;59(1-3):142-52. doi: 10.1007/s12026-014-8544-x PMID: 2498982.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16 PMID: 9337844.

Compajen AR, Velden VHJ van der, Vooy A, Debets R, Benner R & Prens EP. Human Keratinocytes are major producers of IL-18: predominant expression of the unprocessed form. *Eur Cytokine Netw.* 2000 Sep;11(3):383-90 PMID: 11022122.

Compan V, Martín-Sánchez F, Baroja-Mazo A, López-Castejón G, Gomez AI, Verkhatsky A, Brough D & Pelegrín P. Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD forms specks but does not activate caspase-1 in the absence of NLRP3 during macrophage swelling. *J Immunol.* 2015 Feb 1;194(3):1261-73. doi: 10.4049/jimmunol.1301676 PMID: 25552542.

Conceição J, Davis R, Carneiro PP, Giudice A, Muniz AC, Wilson ME, Carvalho EM & Bacellar O. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 May 11;10(5):e0004715. doi: 10.1371/journal.pntd.0004715 PMID: 27167379.

Coutermarsh-Ott SL, Doran JT, Campbell C, Williams TM, Lindsay DS & Allen IC. Caspase-11 Modulates Inflammation and Attenuates *Toxoplasma gondii* Pathogenesis. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:9848263. doi: 10.1155/2016/9848263 PMID: 27378827.

Coutinho SG, Pirmez C & Da-Cruz AM. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 Apr;96 Suppl 1:S173-8 PMID: 12055834.

Cupolillo E, Grimaldi JR & Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Mar;50(3):296-311 PMID: 8147488.

Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H & Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today.* 2000 Apr;16(4):142-4 PMID: 10725899.

Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S & Hashimoto K. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):806-14.e1-4. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.006 PMID: 21272927.

da Silva LA, Sousa SS, Graça GC, Porozzi Re & Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 genes as a valuable tool for identifying species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010 Jan;10(1):77-83. doi: 10.1016/j.meegid.2009.11.001 PMID: 19913112.

Davis BK, Wen H & Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:707-35. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101405. Review PMID: 21219188.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M & Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994 Jul-Sep;89(3):463-9 PMID: 7476234.

de Koning HD, Bergboer JG, van den Bogaard EH, van Vlijmen-Willems IM, Rodijk-Olthuis D, Simon A, Zeeuwen PL & Schalkwijk J. Strong induction of AIM2 expression in human epidermis in acute and chronic inflammatory skin conditions. *Exp Dermatol.* 2012 Dec;21(12):961-4. doi: 10.1111/exd.12037 PMID: 23171461.

de Oliveira Camera P, Junger J, do Espírito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O & Pirmez C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Dec;100(12):1112-7 PMID: 16765391.

Descoteaux A, Matlashewski G & Turco SJ. Inhibition of macrophage protein kinase C mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. J Immunol. 1992 Nov 1;149(9):3008-15 PMID: 1383336.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 May-Jun;95(3):239-43 PMID: 11490989.

De Salvador-Guillouët F, Sakarovitch C, Durant J, Risso K, Demonchy E, Roger PM & Fontas E. Antiretroviral Regimens and CD4/CD8 Ratio Normalization in HIV-Infected Patients during the Initial Year of Treatment: A Cohort Study. PLoS One. 2015 Oct 20;10(10):e0140519. doi: 10.1371/journal.pone.0140519 PMID: 26485149.

De Trez C, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y & Muaille E. iNOS producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. PLoS Pathog. 2009 Jun;5(6):e1000494. doi: 10.1371/journal.ppat.1000494 PMID: 19557162.

DeYoung KL, Ray ME, Su YA, Anzick SL, Johnstone RW, Trapani JA, Meltzer PS & Trent JM. Cloning a novel member of human interferon-inducible gene Family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. Oncogene. 1997 Jul 24;15(4):453-7 PMID: 9242382.

Diamond CE, Khameneh HJ, Brough D & Mortellaro A. Novel perspectives on non-canonical inflammasome activation. Immunotargets Ther. 2015 Jul 24;4:131-41. doi: 10.2147/ITT.S57976 PMID: 27471719.

Dinarello, CA. Interleukin-1 β , interleukin-18 and interleukin-1 β converting enzyme. Ann N Y Acad Sci. 1998 Sep 29;856:1-11 PMID: 9917859.

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol. 2009;27:519-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612 PMID: 19302047.

Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Kammerbauer C, Göss C, Anz D, Simanski M, Gläser R, Harder J, Hornung V, Gallo RL, Ruzicka T, Besch R & Schaubert J Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med.* 2011 May 11;3(82):82ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3002001 PMID: 21562230.

Dostert C, Ludigs K & Guarda G. Innate and adaptive effects of inflammasomes on T cell responses. *Curr Opin Immunol.* 2013 Jun;25(3):359-65. doi: 10.1016/j.coi.2013.02.008 PMID: 23478069.

Dunn JD, Alvarez LAJ, Zhang X & Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:472-85. doi: 10.1016/j.redox.2015.09.005 Review PMID: 26432659.

Elliott JM, Rouge L, Wiesmann C & Scheer JM. Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. *J Biol Chem.* 2009 Mar 6;284(10):6546-53. doi: 10.1074/jbc.M806121200 PMID: 19117953.

Elliott EI & Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 activation and assembly. *Immunol Rev.* 2015 May;265(1):35-52. doi: 10.1111/imr.1228 PMID: 25879282.

Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I & Reed JC. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell.* 2007 Mar 9;25(5):713-24 PMID: 17349957.

Fearon DT & Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 1996 Apr 5;272(5258):50-3. Review PMID: 8600536.

Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S & Beer HD. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1 β by keratinocytes. *Curr Biol.* 2007 Jul 3;17(13):1140-5 PMID: 17600714.

Feldmeyer L, Werner S, French LE & Beer HD. Interleukin-1, inflammasomes and the skin *Eur. J. Cell Biol.* 2010 Sep; 89(9):638-644. doi: 10.1016/j.efcb.2010.04.008 PMID: 20605059.

Fernandes-Alnemri T, Datta P, W J & Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009 Mar 26;458(7237):509-13. doi: 10.1038/nature07710 PMID: 19158676.

Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, Datta P, McCormick M, Huang L, McDermott E, Eisenlohr L, Landel CP & Alnemri ES. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):385-93. doi: 10.1038/ni.1859 PMID: 20351693.

Fernández-Figueroa EA, Rangel-Escareño C, Espinosa-Mateos V, Carrillo-Sánchez K, Salaiza-Suazo N, Carrada-Figueroa G, March-Mifsut S & Becker I. Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1 β . *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1533. doi: 10.1371/journal.pntd.0001533 PMID: 22629474.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S & Di Virgilio F. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med*. 1997 Feb 3;185(3):579-82 PMID: 9053458.

Filippini A, Taffs RE & Sitkovsky MV. Extracellular ATP in T-lymphocytes activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Nov;87(21):8267-7 PMID: 2146684.

Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP & Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002 Jun 1;34(11):E54-8 PMID: 12015707.

Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Panillo R & Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 2009 Mar;10(3):241-7. doi: 10.1038/ni.1703. Review PMID: 19221555.

Frézard F, Demicheli C & Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009 Jun 30;14(7):2317-36. doi: 10.3390/molecules1407231 PMID: 19633606.

Garlanda C, Dinarello CA & Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013 Dec 12;39(6):1003-18. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010 PMID: 24332029.

Geiger A, Bossard G, Sereno D, Pissarra J, Lemesre JL, Vincendeau P & Holzmuller P. Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. *Front Immunol*. 2016 May 31;7:212. doi: 10.3389/fimmu.2016.00212. Review PMID: 27303406.

Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ & Springer W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol*. 2010 Feb;12(2):119-31. doi: 10.1038/ncb2012 PMID: 2009841.

Ghosh S & Dass JF. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene*. 2016 Jun 10;584(1):97-109. doi: 10.1016/j.gene.2016.03.008 PMID: 26968890.

Goldschmidt RH, Chu C & Dong BJ. Initial Management of Patients with HIV Infection. *Am Fam Physician*. 2016 Nov 1;94(9):708-716 PMID: 27929247.

Gollob KJ, Viana AG & Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol*. 2014 Aug;36(8):367-76. doi: 10.1111/pim.12100 PMID: 24471648.

Gopinathan U, Ovstebø R, Olstad OK, Brusletto B, Dalsbotten Aass HC, Kierulf P, Brandtzaeg P & Berg JP. Global effect of interleukin-10 on the transcriptional profile induced by *Neisseria meningitidis* in human monocytes. *Infect Immun*. 2012 Nov;80(11):4046-54. doi: 10.1128/IAI.00386-12 PMID: 22966040.

Grevelink AS & Lerner AL. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Feb;34(2 Pt 1):257-72 PMID: 8642091.

Grimaldi G Jr, Tesh RB & McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg*. 1989 Dec;41(6):687-725 PMID: 2701633.

Grimaldi G Jr & Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implication for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Jul;6(3):230-50 PMID: 8358705.

Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, Tardivel A, Mattmann C & Tschopp J. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol.* 2011 Feb 15;186(4):2529-34. doi: 10.4049/jimmunol.1002720 PMID: 21257968.

Guerra JA, Coelho LI, Pereira FR, Siqueira AM, Ribeiro RL, Almeida TM, Lacerda MV, Barbosa Md & Talhari S. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Sep;85(3):524-7. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0075 PMID: 21896816.

Guey B & Pétrilli V. Assessing Caspase-1 Activation. *Methods Mol Biol.* 2016;1417:197-206. doi: 10.1007/978-1-4939-3566-6_13 PMID: 27221491.

Gurung P, Karki R, Vogel P, Watanabe M, Bix M, Lamkanfi M & Kanneganti TD. An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis. *J Clin Invest.* 2015 Mar 2;125(3):1329-38. doi: 10.1172/JCI79526 PMID: 25689249.

Hagar JA & Miao EA. Detection of cytosolic bacteria by inflammatory caspases. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Feb;17:61-6. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.008 PMID: 25689249.

Harijith A, Ebenezer DL & Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol.* 2014 Sep 29;5:352. doi: 10.3389/fphys.2014.00352. eCollection 2014. Review PMID: 25324778.

Hazuda DJ, Strickler J, Simon P & Young PR. Structure-function mapping of interleukin 1 precursors. Cleavage leads to a conformational change in the mature protein. *J Biol Chem.* 1991 Apr 15;266(11):7081-6 PMID: 2016316.

Hernández C, Cucunubá Z, Flórez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, León C & Ramírez JD. Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Sep 20;10(9):e0004997. doi:

10.1371/journal.pntd.0004997. Erratum in: PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 28;10(10):e0005112 PMID: 27648938.

Herwald H & Egesten A. On PAMPs and DAMPs. J Innate Immun. 2016;8(5):427-8. doi: 10.1159/000448437 PMID: 27522675.

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E & Fitzgerald KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. Nature. 2009 Mar 26;458(7237):514-8. doi: 10.1038/nature07725 PMID: 19158675.

Imler JL & Hoffmann JA. Toll-like proteins: an ancient family of receptor signaling infection. Rev Immunogenet. 2000;2(3):294-304 PMID: 11256741.

Jara M, Aduai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M, Cruz I, Van der Auwera G, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC & Arevalo J. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. J Clin Microbiol. 2013 Jun;51(6):1826-33. doi: 10.1128/JCM.00208-13 PMID: 2355420.

Jiménez-Fernández D & Lamkanfi M. Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. Biol Chem. 2015 Mar;396(3):193-203. doi: 10.1515/hsz-2014-0253. Review PMID: 25389992.

Jin T & Xiao TS. Activation and assembly of the inflammasomes through conserved protein domain families. Apoptosis. 2015 Feb;20(2):151-6. doi: 10.1007/s10495-014-1053-5. Review PMID: 25398536.

Johnson CL & Gale M. CARD games between virus and host get a new player. Trends Immunol. 2006 Jan;27(1):1-4 PMID: 16309964.

Jones JW, Kayagaki N, Broz P, Henry T, Newton K, O'Rourke K, Chan S, Dong J, Qu Y, Roose-Girma M, Dixit VM & Monack DM. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 May 25;107(21):9771-6. doi: 10.1073/pnas.1003738107 PMID: 20457908.

Juruj C, Lelogeais V, Pierini R, Perret M, Py BF, Jamilloux Y, Broz P, Ader F, Faure M & Henry T. Caspase-1 activity affects AIM2 speck formation/stability through a negative feedback loop. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Apr 24;3:14. doi: 10.3389/fcimb.2013.00014. eCollection 2013 PMID: 2363066.

Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M & Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011 Oct 16;479(7371):117-21. doi: 10.1038/nature10558 PMID: 22002608.

Kaye PM & Beattie L. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis. *Semin Immunopathol*. 2016 Mar;38(2):249-60. doi: 10.1007/s00281-015-0548-7 PMID: 26678994.

Kaye P & Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jul 11;9(8):604-15. doi: 10.1038/nrmicro2608 PMID: 21747391.

Kawai K & Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007 Feb;19(1):24-32 PMID: 17275323.

Keller M, Rüegg A, Werner S & Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):818-31. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.040 PMID: 18329368.

Kerse K, Vandem Berghe T, Lamkanfi M & Vandenabele P. A phylogenetic and functional overview of inflammatory caspases and caspase-1-related CARD-only proteins. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec;35(Pt 6):1508-11. Review PMID: 18031255.

Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S & Sacks D. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10125-30. doi: 10.1073/pnas.0802331105 PMID: 18626016.

Kojima H, Aizawa Y, Yanai Y, Nagaoka K, Takeuchi M, Ohta T, Ikegami H, Ikeda M & Kurimoto M. An essential role for NF-kappa B in IL-18-induced IFN-gamma expression in KG-1 cells. *J Immunol.* 1999 May 1;162(9):5063-9 PMID: 10227974.

Koltas IS, Eroglu F, Uzun S & Alabaz D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2016 May;164:43-8. doi: 10.1016/j.exppara.2016.02.007 PMID: 26896641.

Kopfnagel V, Wittman M & Werfel T. Human keratinocytes express AIM2 and respond to dsDNA with IL-1 β secretion. *Exp Dermatol.* 2011 Dec;20(12):1027-9. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01382.x PMID: 22092578.

Korn T, Oukka M, Kuchroo V & Bettelli E. Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol.* 2007 Dec;19(6):362-71 PMID: 18035554

Kryczek I, Wei S, Vatan L, Escara-Wilke J, Szeliga W, Keller ET & Zou W. Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2 mediated suppression. *J Immunol.* 2007 Aug 1;179(3):1423-6 PMID: 17641006.

Kufer TA, Fritz JH & Philpott DJ. 2005. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.* 2005 Aug;13(8):381-8 PMID: 15994078.

Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS & Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* 1995 Mar 31;267(5206):2000-3 PMID: 7535475.

Kulkarni OP, Lichtnekert J, Anders HJ & Mulay SR. The Immune System in Tissue Environments Regaining Homeostasis after Injury: Is "Inflammation" Always Inflammation? *Mediators Inflamm.* 2016;2016:2856213. doi: 10.1155/2016/2856213. Review PMID: 2759780.

Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R & Tschopp J. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem.* 2007 May;55(5):443-52 PMID: 17164409.

Kupper TS. Immune and Inflammatory processes in cutaneous tissues. *J Clin Invest.* 1990 Dec;86(6):1783-9 PMID: 2254445.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution classification and geographical distribution *In The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology.* Vol I Peters W and Killick-Kendrick R (eds). 1987 Vol 1: 1-120. Academic Press.

Lamkanfi M & Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014 May 22;157(5):1013-22. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007. Review PMID: 24855941.

Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, & Solbach W. Natural killer cells participate in early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur J Immunol.* 1993 Sep;23(9):2237-41 PMID: 8370404.

Laskay T, Zandbergen G & Solbach W. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 2003 May;11(5):210-4 PMID: 12781523.

Latz E, Xiao TS & Stutz A. Activation and regulation of the inflammasome. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jun;13(6):397-411. doi: 10.1038/nri3452. Review PMID: 23702978.

Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W & Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun.* 2002 Feb;70(2):826-35 PMID: 11796617.

Lazarevic V & Glimcher LH. T-bet in disease. *Nat Immunol.* 2011 Jun 20;12(7):597-606. doi: 10.1038/ni.2059 PMID: 21685955.

Lee DJ, Du F, Chen SW, Nakasaki M, Rana I, Shih VF, Hoffmann A & Jamora C. Regulation and Function of the Caspase-1 in an Inflammatory Microenvironment. *J Invest Dermatol.* 2015 Aug;135(8):2012-20. doi: 10.1038/jid.2015.119 PMID: 25815426.

Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, Mineo TWP, Gutierrez FRS, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS & Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med.* 2013 Jul;19(7):909-15. doi: 10.1038/nm.3221 PMID: 23749230.

Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS & Goto H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol.* 2009 Feb;160(2):311-8. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08908.x PMID: 19187345.

Li Q & Verma IM. NF κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):725-34. Review. Erratum in: *Nat Rev Immunol* 2002 Dec;2(12):975 PMID: 12360211.

Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, Towne E, Tracey D, Wardwell S, Wei F-Y, Wong W, Kamen R & Seshadri T. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell.* 1995 Feb 10;80(3):401-11 PMID: 7859282.

Liu J & Cao X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cell Mol Immunol.* 2016 Nov;13(6):711-721. doi: 10.1038/cmi.2016.58. Review PMID: 27818489.

Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):129-35 PMID: 11790543.

Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A & Akuffo H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in area of endemicity. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2698-704 PMID: 9596736.

McCall SH, Sahraei M, Young AB, Worley CS, Duncan JA, Ting JP & Marriott I. Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *J Bone Miner Res.* 2008 Jan;23(1):30-40 PMID: 17907925.

Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC & Marsden PD. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986 Jul-Aug;28(4):253-62 PMID: 3563308.

Mantovani A, Cassatella MA, Constantini C & Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jul 25;11(8):519-31. doi: 10.1038/nri3024 PMID: 21785456.

Maretti-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N & Pirmez C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 2011a Feb;163(2):207-14. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04285.x PMID: 21091666.

Maretti-Mira AC, de Pinho Rodrigues KM, de Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Craft N. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Trop.* 2011b Aug;119(2-3):160-4. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.05.009 PMID: 21663729.

Maretti-Mira AC, Bittner J, Oliveira-Neto MP, Liu M, Kang D, Li H, Pirmez C & Craft N. Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(9):e1816. doi: 10.1371/journal.pntd.0001816 PMID: 23029578.

Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S & Dixit VM. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* 2004 Jul 8;430(6996):213-8 PMID: 15190255.

Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svenson M, Stager S & Kaye PM. Posttranscriptional regulation of IL10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity*. 2008 Aug 15;29(2):295-305. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.012 PMID: 18701085.

Marsden PD, Sampaio RN, Carvalho EM, Veiga JP, Costa JL & Llanos-Cuentas EA. High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1985 Jul;34(4):710-3 PMID: 2992304.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80(6):859-76 PMID: 3037735.

Marsden PD. Mucocutaneous leishmaniasis. *BMJ*. 1990 Sep 29;301(6753):656-7 PMID: 2224223.

Martinon F, Burns K & Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-1 β . *Mol Cell*. 2002 Aug;10(2):417-26 PMID: 12191486.

Martinon F & Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 2005 Aug;26(8):447-54 PMID: 15967716.

Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A & Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):237-41 PMID: 16407889.

Martinon F, Mayor A & Tschopp J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229-65. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132715. Review PMID: 19302040.

Mary C, Faraut F, Lascombe L & Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5249-55 PMID: 15528722.

Matsushima H, Yamada N, Matsue H & Shimada S. TLR3-, TLR7- and TLR9- mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from Bone Marrow-derived mast cells. *J Immunol*. 2004 Jul 1;173(1):531-41 PMID: 15210814.

Medzhitov R & Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997 Feb;9(1):4-9 PMID: 9039775.

Medzhitov R & Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002 Apr 12;296(5566):298-300 PMID: 11951031.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201. Review PMID: 18650913.

Memoli B, Grandaliano G, Soccio M, Postiglione L, Guida B, Bisesti V, Esposito P, Procino A, Marrone D, Michael A, Andreucci M, Schena FP & Pertosa G. *In vivo* modulation of soluble "antagonistic" IL-6 receptor synthesis and release in ESRD. *J J Am Soc Nephrol*. 2005 Apr;16(4):1099-107 PMID: 15716332.

Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R & Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-1 antiviral pathway and is target by hepatitis c virus. *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1167-72 PMID: 16177806.

Mills KH, Dungan LS, Jones SA & Harris J. The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. *J Leukoc Biol*. 2013 Apr;93(4):489-97. doi: 10.1189/jlb.1012543. Review PMID: 2327170.

Mitsui H, Watanabe T, Saeki H, Mori K, Fujita H, Tada Y, Asahina A, Nakamura K & Tamaki K. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: Comparison with splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2004 Jan;122(1):95-102 PMID: 14962096.

Monteforte GM, Takeda K, Rodriguez-Sosa M, Akira S, David JR & Satoskar AR. Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop TH1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5890-3 PMID: 10820270.

Morgado FN, Nascimento MT, Saraiva EM, de Oliveira-Ribeiro C, Madeira Mde F, da Costa-Santos M, Vasconcellos EC, Pimentel MI, Rosandiski Lyra M, Schubach Ade O & Conceição-Silva F. Are Neutrophil Extracellular Traps Playing a Role in the Parasite Control in Active American Tegumentary Leishmaniasis Lesions? PLoS One. 2015 Jul 20;10(7):e0133063. doi: 10.1371/journal.pone.0133063. eCollection 2015 PMID: 26192752.

Morgan MJ & Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NFκB signaling. Cell Res. 2011 Jan;21(1):103-15. doi: 10.1038/cr.2010.178 PMID: 21187859.

Mourão MV, Toledo Jr A, Gomes LI, Freire VV & Rabello A. Parasite load and risk factors for poor outcome among children with visceral leishmaniasis. A cohort study in Belo Horizonte, Brazil, 2010-2011. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Apr;109(2):147-53 PMID: 24676657.

Muller I, Kropf P, Etges RJ & Louis JA. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8⁺ T cells. Infect Immun. 1993 Sep;61(9):3730-8 PMID: 8359894.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ & Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. Nat Rev Immunol. 2009 Oct;9(10):679-91. doi: 10.1038/nri2622 PMID: 19763149.

Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW & Dinarello CA. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1β in monocytes and macrophages. Blood. 2009 Mar 5;113(10):2324-35. doi: 10.1182/blood-2008-03-146720 PMID: 19104081.

Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Neto M, Barral A & de Oliveira CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. J Immunol. 2009 Dec 15;183(12):8088-98. doi: 10.4049/jimmunol.0803720 PMID: 19923470.

Novais FO, Carvalho LP, Passos S, Roos DS, Carvalho EM, Scott P & Beiting DP. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol*. 2015 Jan;135(1):94-101. doi: 10.1038/jid.2014.305 PMID: 25036052.

Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN, Schriefer A & Carvalho EM. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 e IL-27) in *L. braziliensis* infection. *Parasite Immunol*. 2011 Feb;33(2):132-6. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01256.x PMID: 21226726.

Nylen S & Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010 May;2(2):135-46. doi: 10.4103/0974-777X.62876 PMID: 20606969.

O'Connor WR, Harton JA, Zhu X, Linhoff MW & Ting JP. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. *J Immunol*. 2003 Dec 15;171(12):6329-33 PMID: 14662828.

Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T & Fukuda S. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun*. 1995 Oct;63(10):3966-72 PMID: 7558306.

Oliveira F, Jochin RC, Valenzuela JG & Kamhawi S. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. *Parasitol Int*. 2009 Mar;58(1):1-5. doi: 10.1016/j.parint.2008.07.004 PMID: 18768167.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC & Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Dec;57(6):651-5 PMID: 9430521.

Oliveira-Neto MP, Matos MS, Perez, MA, da-Cruz AM, Fernandes O & Moreira J. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol*. 2000 Jul;39(7):506-14 PMID: 10940114.

Oliveira-Neto MP & Matos MS. An alternative antimonial Schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006 Jul-Aug;39(4):323-6 PMID: 17119744.

Otvos L Jr. Immunomodulatory effects of anti-microbial peptides. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2016 Sep;63(3):257-277 PMID: 27539330.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN & Sacks D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008 Aug 15;321(5891):970-4. doi: 10.1126/science.1159194 PMID: 18703742.

Peter T, Ellenberger D, Kim AA, Boeras D, Messele T, Roberts T, Stevens W, Jani I, Abimiku A, Ford N, Katz Z & Nkengasong JN. Early antiretroviral therapy initiation: access and equity of viral load testing for HIV treatment monitoring. *Lancet Infect Dis.* 2017 Jan;17(1):e26-e29. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30212-2. Review PMID: 27773596.

Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F & Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentrations. *Cell Death Differ.* 2007 Sep;14(9):1583-9 PMID: 17599094.

Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45 PMID: 11328886.

Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G & Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jun 10;105(23):8067-72. doi: 10.1073/pnas.0709684105 PMID: 18523012.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F & Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1390-5 PMID: 8473490.

Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degraive W & Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 1999 Jun;37(6):1819-23 PMID: 10325330.

Pourabbas B, Ghadimi Moghadam A, Pouladfar G, Rezaee Z & Alborzi A. Quantification of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA for monitoring the response to meglumine antimoniate therapy in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 May;88(5):868-71. doi: 10.4269/ajtmh.12-0440 PMID: 23400573.

Prina E, Roux E, Mattei D & Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007 Sep;9(11):1307-15 PMID: 17890124.

Rangel EF & Lainson R. 2003. Ecologia das Leishmanioses. Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. *In* EF Rangel, R Lainson (Eds) *Flebotomíneos do Brasil.* Fiocruz, Rio de Janeiro, p291-310.

Rathinam VA, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM, Leong JM & Fitzgerald KA. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell.* 2012 Aug 3;150(3):606-19. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.007 PMID: 22819539.

Reiner NE. Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*. *J Immunol.* 1987 Mar 15;138(6):1919-25 PMID: 3493291.

Reithinger R, Dujardin JC, Hechimi L, Pirmez C, Alexander B & Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Sep;7(9):581-96 PMID: 17714672.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O & Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Jan;31(1):143-8 PMID: 9686192.

Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, Hardy LL, Garceau V, Sweet MJ, Ross IL, Hume DA & Stacey KJ. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science*. 2009 Feb 20;323(5917):1057-60. doi: 10.1126/science.1169841 PMID: 19131592.

Rodrigues KM, Oliveira MP, Maretti-Mira AC, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Silva L, Soares DA, Dolci EL, Perico RA & Pirmez C. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. *Br J Dermatol*. 2011 Jun;164(6):1228-34. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10240.x PMID: 21299543.

Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Mastelic B, Taccini-Cotier F, Louis J & Launois P. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):886-94. doi: 10.4049/jimmunol.0901114 PMID: 19966209.

Salskov-Iversen ML, Claus J, Kragballe K & Iversen L. Caspase-5 expression is upregulated in lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol*. 2011 Mar;131(3):670-6. doi: 10.1038/jid.2010.370 PMID: 21191419.

Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A & Dellagi K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol*. 1999 Apr;116(1):127-32 PMID: 10209516.

Schulte W, Bernhagen J & Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:165974. doi: 10.1155/2013/165974 PMID: 23853427.

Schroder K & Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):821-32. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040 PMID: 20303873.

Scott P & Trinchieri G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol*. 1995 Feb;7(1):34-40 PMID: 7772279.

Scott P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol*. 2005 Dec;7(12):1707-13 PMID: 16309457.

Seth RB, Sun L, EA CK & Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NFκB and IRF 3. *Cell*. 2005 Sep 9;122(5):669-82 PMID: 16125763.

Shaw N & Liu ZJ. Role of HIN domain in regulation of innate immune responses. *Mol Cell Biol*. 2014 Jan;34(1):2-15. doi: 10.1128/MCB.00857-13 PMID: 24164899.

Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A & Kehrl JH. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012 Jan 29;13(3):255-63. doi: 10.1038/ni.2215 PMID: 22286270.

Shio MT, Christian JG, Jung JY, Chang K-P & Olivier M. PKC/ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation is attenuated by *Leishmania* zinc metalloprotease during infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jun 26;9(6):e0003868. doi: 10.1371/journal.pntd.0003868. eCollection 2015 PMID: 26114647.

Shi Y, Evans JE & Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003 Oct 2;425(6957):516-21 PMID: 14520412.

Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraeve W, Pirmez C, Grimaldi G Jr & Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis*. 1998 Sep;178(3):911-4 PMID: 9728572.

Shornick LP, De Togni P, Mariathasan S, Goellner J, Strauss-Schoenberger J, Karr RW, Ferguson TA & Chaplin DD. Mice deficient in IL-1β manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene. *J Exp Med*. 1996 Apr 1;183(4):1427-36 PMID: 8666901.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD & Corbett CE. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 Nov;102(11):1075-80. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.05.020 PMID: 18602127.

Sonnenberg GF, Fouser LA & Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):383-90. doi: 10.1038/ni.2025. Review PMID: 21502992.

Souza MA, Almeida TM, Castro MC, Oliveira-Mendes AP, Almeida AF, Oliveira BC, Rocha LF, Medeiros AC, Brito ME, Dessen AJ & Pereira VR. American tegumentary leishmaniasis: mRNA expression for Th1 and Treg mediators are predominant in patients with recent active disease. *Immunobiology*. 2016 Feb;221(2):253-9. doi: 10.1016/j.imbio.2015.08.009 PMID: 26572279.

Sudarshan M, Singh T, Chakravarty J & Sundar S. A Correlative Study of Splenic Parasite Score and Peripheral Blood Parasite Load Estimation by Quantitative PCR in Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2015 Dec;53(12):3905-7 PMID: 26400788.

Stutz A, Golenbock DT & Latz E. Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest*. 2009 Dec;119(12):3502-11. doi: 10.1172/JCI40599 PMID: 19955661.

Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M & Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol*. 2007 Jan;147(1):176-83 PMID: 17177977.

Sunderkotter C, Kunz M, Steinbrink K, Meinardus-Hager G, Goebeler M, Bildau H & Sorg C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol*. 1993 Nov 1;151(9):4891-901 PMID: 8409447.

Taberkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P & Giannopoulos K. The role of IL-17 and Th17 lymphocytes in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015 Dec;63(6):435-49. doi: 10.1007/s00005-015-0344-z PMID: 26062902.

Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K & Akira S. Defective NK cell activity and TH1 response in IL-18 deficient mice. *Immunity*. 1998 Mar;8(3):383-90 PMID: 9529155.

Tak PP & Firestein GS. NF κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 Jan;107(1):7-11 PMID: 11134171.

Uthaisangsook S, Day NK, Bahma SL, Good RA & Haraguchi S. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002 Mar;88(3):253-64; quiz 265-6, 318. Review PMID: 11926618.

Van Opendenbosch N, Gurung P, Vande Walle L, Fossoul A, Kanneganti TD & Lamkanfi M. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat Commun.* 2014;5:3209. doi: 10.1038/ncomms4209 PMID: 24492532.

Van Zandbergen G, Solbach W & Laskay T. Apoptosis driven infection. *Autoimmunity.* 2007 Jun;40(4):349-52 PMID: 17516227.

Vergel C, Walker J & Saravia NG. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Apr;72(4):423-9 PMID: 15827280.

Viganò E & Mortellaro A. Caspase-11: the driving factor for noncanonical inflammasomes. *Eur J Immunol.* 2013 Sep;43(9):2240-5. doi: 10.1002/eji.201343800 PMID: 24037676.

Vinzing M, Eitel J, Lippmann J, Hocke AC, Zahlten J, Slevogt H, N'guessan PD, Günther S, Schmeck B, Hippenstiel S, Flieger A, Suttorp N & Opitz B. NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6808-15 PMID: 18453601.

Voronov E, Dotan S, Gayvoronsky L, White RM, Cohen I, Krelin Y, Benchetrit F, Elkabets M, Huszar M, El-On J & Apte RN. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int Immunol.* 2010 Apr;22(4):245-57. doi: 10.1093/intimm/dxq006 PMID: 20181656.

Yang F, Feng C, Zhang X, Lu J & Zhao Y. The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections. *Inflammation.* 2016 Nov 5. Review PMID: 27817110.

Yardley V & Croft SL. Animal models of cutaneous leishmaniasis. In Zak O, ed. *Handbook of animal models of infection.* New York: Academic Press, 1999 775-81.

Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP & Vengerov YY. Structure of Leishmania minicircle kinetoplast DNA classes. J Clin Microbiol. 1999 May;37(5):1656-7 PMID: 10328690.

Wang B, Feliciani C, Howell BG, Freed I, Cai Q, Watanabe H & Sauder DN. Contribution of Langerhans cell derived IL-18 to contact hypersensitivity. J Immunol. 2002 Apr 1;168(7):3303-8 PMID: 11907086.

Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, Kummer JA, Tschopp J & French LE. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. J Invest Dermatol. 2007 Aug;127(8):1956-63 PMID: 17429439.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C & Barker DC. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*. Clin Microbiol. 2002 Feb; 40(2): 601–606 doi: 10.1128/JCM.40.2.601-606.2002 PMID: 11825977.

Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE & Wilson ME. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. J Clin Microbiol. 2011 Nov;49(11):3892-904. doi: 10.1128/JCM.r00764-11 PMID: 22042830.

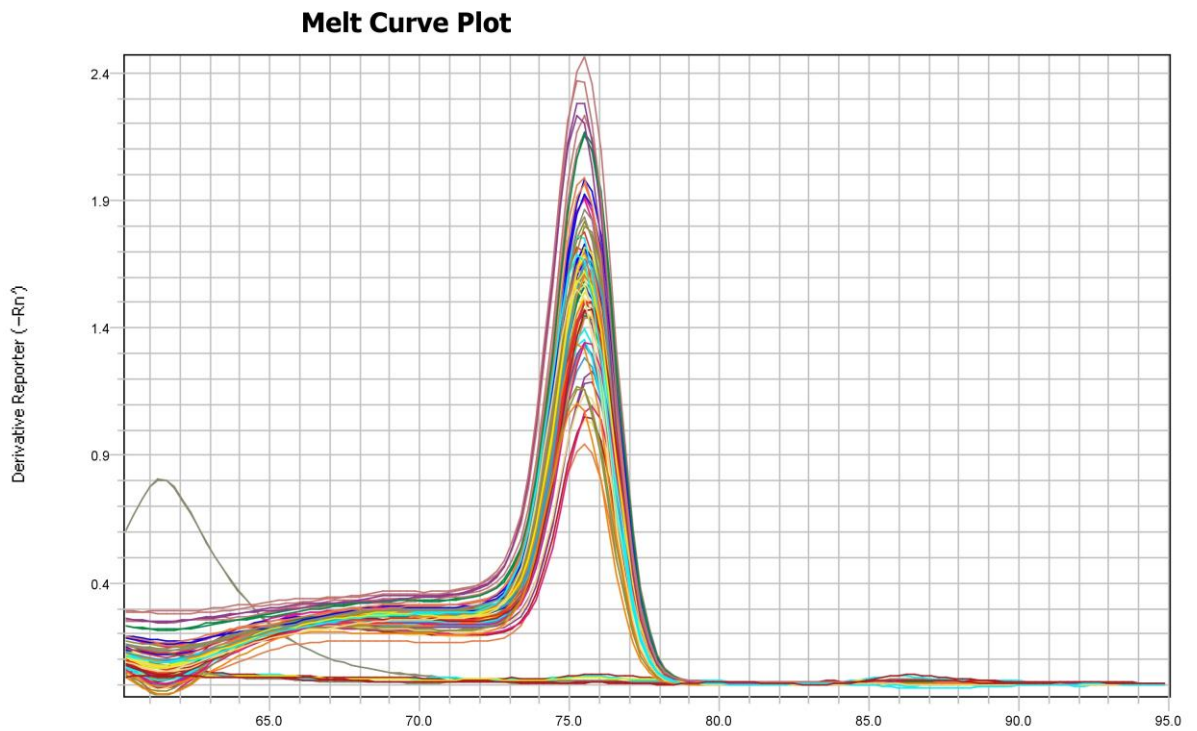
WHO: World Health Organization. Programs and Projects: Leishmaniasis (online). 3 JUNE 2016, 91th year. No 22, 2016, 91, 285–296. <http://www.who.int/wer>

Zepter K, Häffner A, Soohoo LF, De Luca D, Tang HP, Fisher P, Chavinson J & Elmets CA. Induction of biologically active IL-1 α -converting enzyme and mature IL-1 α in human keratinocytes by inflammatory and immunologic stimuli. J Immunol. 1997 Dec 15;159(12):6203-8 PMID: 9550423.

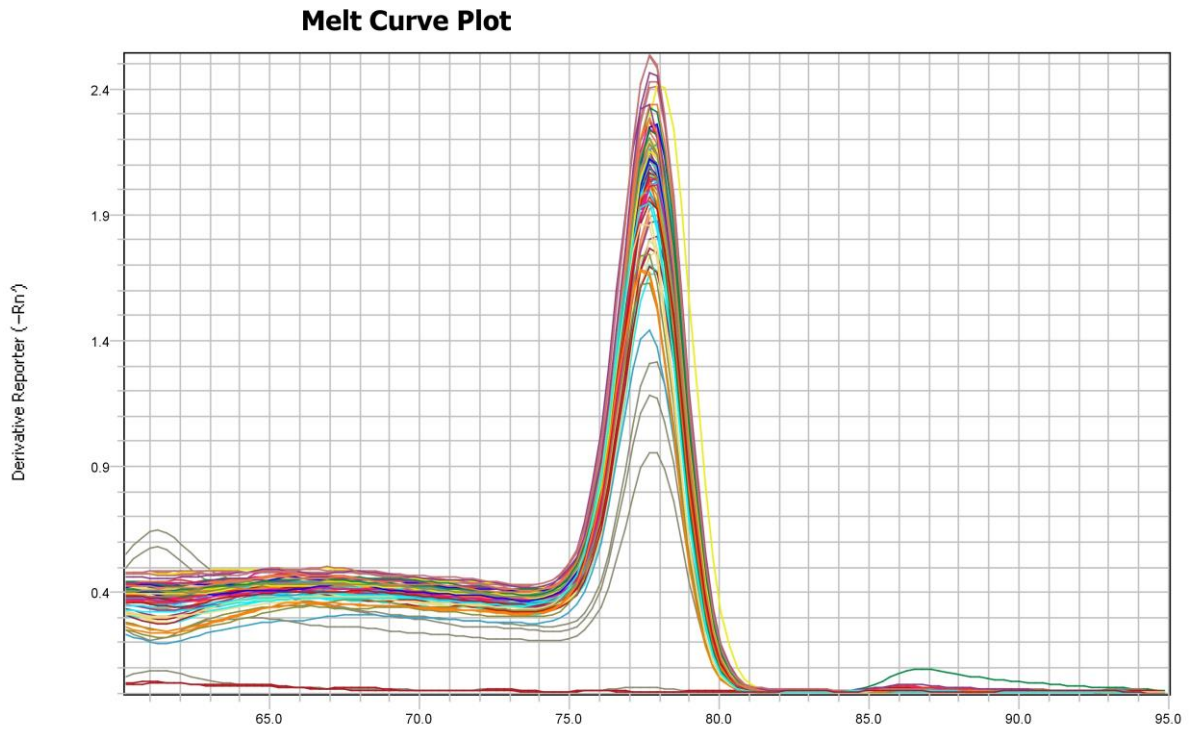
Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalpour S, Wong J, He F, Boassa D, Perkins G, Ali SR, McGeough MD, Ellisman MH, Seki E, Gustafsson AB, Hoffman HM, Diaz-Meco MT, Moscat J & Karin M. NF κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. Cell. 2016 Feb 25;164(5):896-910. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.057 PMID: 26919428.

8. Anexos

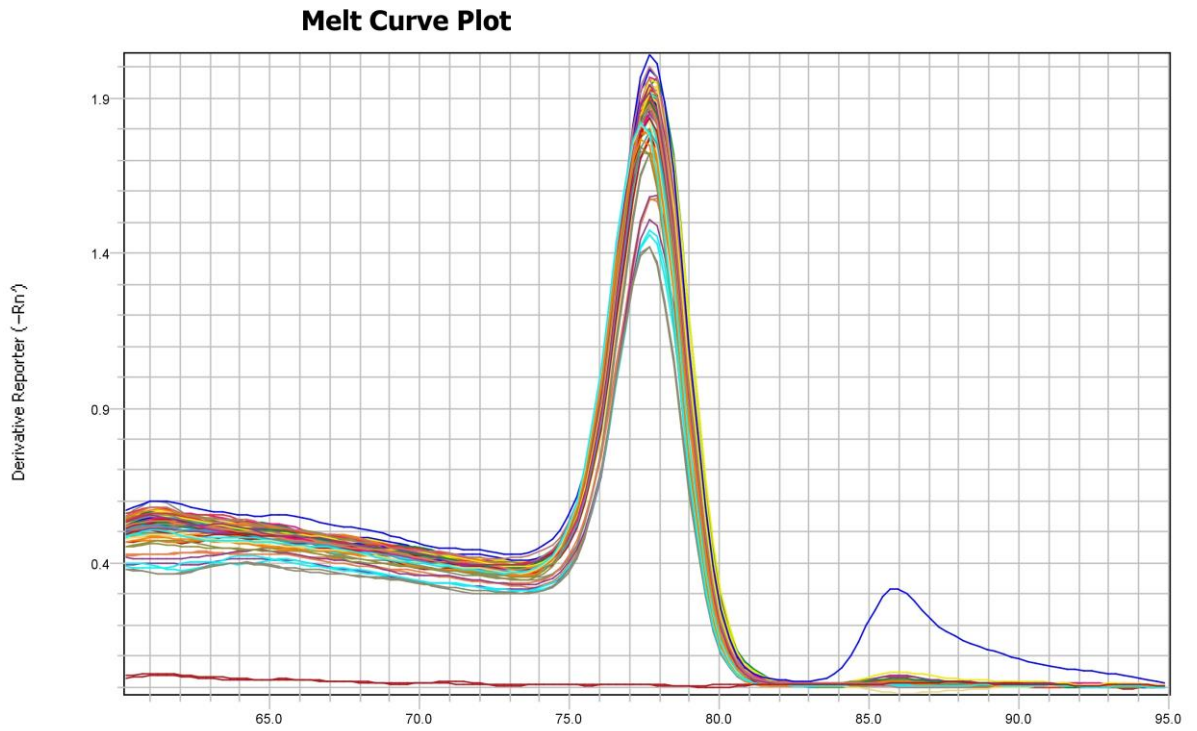
Anexo 1 Curva de desnaturação dos experimentos da PCR em tempo real para os fragmentos de tecidos, evidenciando a presença dos produtos do AIM2. As linhas em vermelho, tendendo a ser paralelas ao eixo das abscissas, correspondem às amostras sem o cDNA, denominados de controles negativos ou branco (NTC).



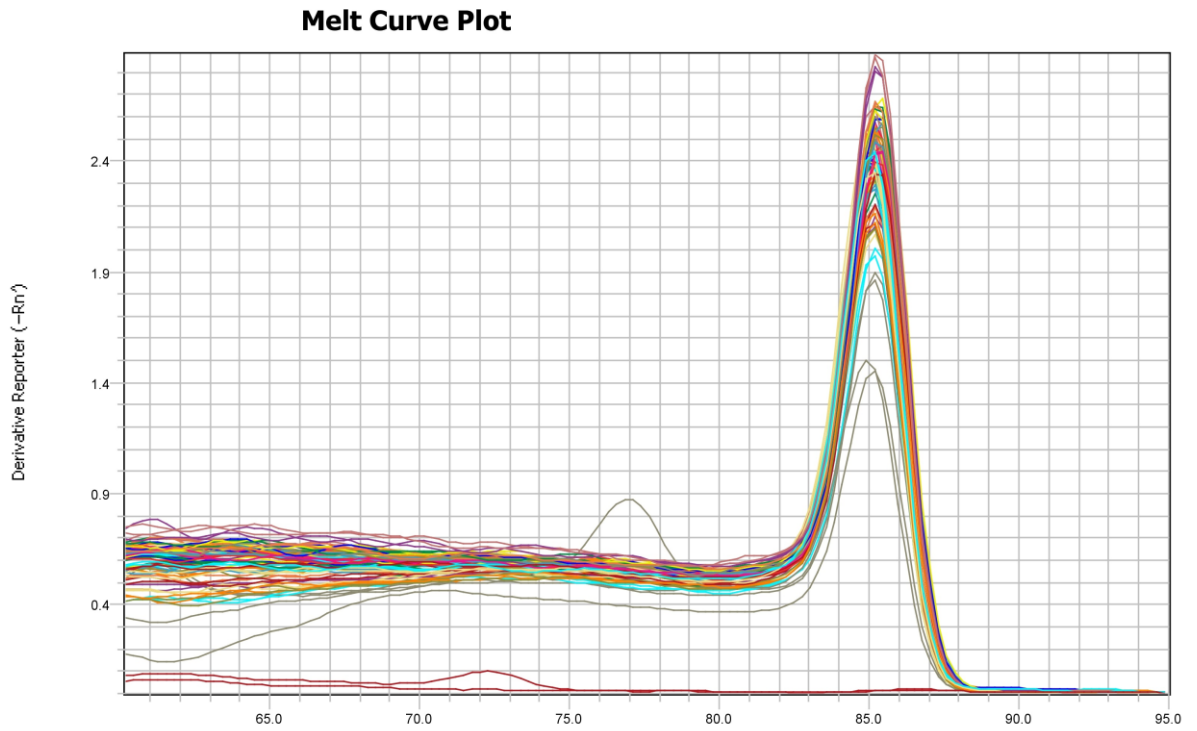
Anexo 2 Curva de desnaturação dos experimentos da PCR em tempo real para os fragmentos de tecidos, evidenciando a presença dos produtos do NLRP3. As linhas em vermelho, tendendo a ser paralelas ao eixo das abscissas, correspondem às amostras sem o cDNA, denominados de controles negativos ou branco (NTC).



Anexo 3 Curva de desnaturação dos experimentos da PCR em tempo real para os fragmentos de tecidos, evidenciando a presença dos produtos da IL-1 β . As linhas em vermelho, tendendo a ser paralelas ao eixo das abscissas, correspondem às amostras sem o cDNA, denominados de controles negativos ou branco (NTC).



Anexo 4 Curva de desnaturação dos experimentos da PCR em tempo real para os fragmentos de tecidos, evidenciando a presença dos produtos da GAPDH. As linhas em vermelho, tendendo a ser paralelas ao eixo das abscissas, correspondem às amostras sem o cDNA, denominados de controles negativos ou branco (NTC).





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid

Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis?



Luiza de Oliveira Ramos Pereira^{a,1,*}, Regina Barbosa Moreira^{b,1},
Márcia Pereira de Oliveira^b, Soraya de Oliveira Reis^b, Manoel Paes de Oliveira Neto^c,
Claude Pirmez^b

^a Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2016

Received in revised form 16 January 2017

Accepted 27 January 2017

Corresponding Editor: Eskild Petersen, Aarhus, Denmark.

Keywords:

Parasitic load

Small subunit ribosomal RNA gene

Leishmania (Viannia) braziliensis

Therapeutic failure

SUMMARY

Background: *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main etiological agent of tegumentary leishmaniasis in the Americas. Parasite molecular diversity and host immune status contribute to extensive variations in its clinical presentation within endemic areas of Brazil. Pentavalent antimonials have been used for more than 60 years as the first-line drug for all cases, despite the potential for severe side effects and refractoriness. In Rio de Janeiro, Brazil, most *L. (V.) braziliensis* infections are benign with a scarcity of parasites, although metastasis and refractory infections can arise. In this scenario, the use of novel molecular tools can be useful for diagnosis and to assess tissue parasitism, and is of benefit to clinical and therapeutic management.

Methods: In this study, parasite load was assessed by real-time PCR based on the leishmanial small subunit ribosomal RNA gene.

Results and conclusion: The data revealed a tendency to higher tissue parasitism in the skin compared to mucous lesion sites and a reduction with disease progression. Parasite load was lower in poor compared to good responders to antimonials, and was also reduced in recurrent lesions compared to primary ones. However, parasite load became higher with sequential relapses, pointing to an immune system inability to control the infection. Therefore the parasite burden does not seem to be a good predictor of disease progression.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Tegumentary leishmaniasis (TL) comprises a group of infectious diseases with a broad diversity in clinical presentation. Caused by parasites of the genus *Leishmania*, which are transmitted by sand flies, *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main etiological agent of leishmaniasis in the Americas.¹ Brazil has the highest incidence of TL worldwide,² with autochthony confirmed in all regions of the country.³ Most TL cases correspond to cutaneous leishmaniasis (CL), which is characterized by a single ulcer on the skin that may regress spontaneously. However, some patients go on to develop mucosal leishmaniasis (ML), a destructive and diffuse metastatic

infiltration of the nasal/oral/nasopharyngeal mucosa that occurs months or several years after resolution of the primary lesion. Pentavalent antimonials have been used for more than 60 years as the first-line treatment for all clinical presentations of leishmaniasis. However, these drugs have several limitations, such as severe side effects and drug resistance. Most cases occurring in the state of Rio de Janeiro represent benign infections, but a poor response to treatment can occur, with a failure rate of 16% and the development of mucosal forms.^{4,5}

There are several arguments to explain the differences in clinical and therapeutic outcomes of TL. It is now clear that both parasite molecular diversity and the host immune response contribute to the extensive clinical polymorphism in endemic areas. Although treatment with Glucantime mostly accelerates lesion healing, it does not induce total clearance of the parasites and a small number are likely to persist in the cutaneous scars over the patient's lifetime.⁶ The scarcity of tissue parasitism has been

* Corresponding author.

E-mail address: luizaper@ioc.fiocruz.br (L.d.O.R. Pereira).

¹ Luiza de Oliveira Ramos Pereira and Regina Barbosa Moreira contributed equally.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.036>

1201-9712/© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

described as a common observation in patients infected by *L. (V.) braziliensis*,⁷ which underlines the need for highly sensitive molecular approaches to confirm a diagnosis.⁸ Additionally, for different species, parasite load could be related to the severity of the lesions. Mouse models that mimic the natural transmission of *Leishmania (Leishmania) major* have revealed that a high-dose inoculum leads to the development of larger lesions, while low doses of parasites lead to less severe pathologies, regardless of higher parasite titers in the chronic phase.⁹

The aim of this study was to investigate the association between the parasite load measured in the lesions of patients with diverse clinical presentations and their response to therapeutic interventions in cases of *L. (V.) braziliensis* TL in Brazil.

Materials and methods

Patients

A total of 126 patients with leishmaniasis were studied. All patients were from the state of Rio de Janeiro in Brazil, an area endemic for *L. (V.) braziliensis*. Cases with any comorbidity were excluded from the study. The diagnosis was confirmed by at least one of the following methods: histopathology, Leishman-stained imprint of the lesions, culture, and PCR. In addition, all patients underwent the Montenegro skin test. TL-positive patients were treated with 10–20 mg/kg/day of *N*-methyl-glucamine (Glucantime; Rhodia Laboratories, Antony, France) for 20 to 30 days. Patients were re-evaluated 3 months after the end of treatment, and were considered as clinically cured if the lesions had reached complete epithelialization and there was an absence of erythema, induration, or papules. Patients were classified as poor responders if healing was incomplete. The response was also considered poor if reactivation or secondary metastatic lesions, either cutaneous or mucosal, appeared.

For the analysis of parasite load, patients were divided into five different groups according to their clinical presentation: cutaneous (CL, *n* = 71), recurrent CL (REC, *n* = 15), mucosal lesion (ML, *n* = 18), mucocutaneous lesion (MCL, defined as cases presenting concomitant active mucous and cutaneous lesions, *n* = 14), and cutaneous scars (*n* = 8). When appropriate, the total CL group was divided according to the treatment response and duration of disease: (1) good response to treatment (GR, *n* = 54) or poor response to treatment (PR, *n* = 17), and (2) duration of disease up to 3 months (early, *n* = 43), between 3 and 12 months (intermediate, *n* = 18), and more than 12 months (late, *n* = 10).

Biopsies were taken with a punch at the border of the lesions and submitted to diagnostic procedures, including nucleic acid isolation for real-time PCR quantification assays. All specimens were taken before treatment, except in recurrent cases. Dermatitis cases were included as negative controls.

Parasites and human cell cultures

The *L. (V.) braziliensis* reference strain (MHOM/BR/1975/M2903) was obtained from the *Leishmania* Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC). Promastigotes were grown at 25 °C in Schneider's *Drosophila* medium containing 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 IU/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA).

The human acute monocyte leukemia cell line (THP-1), obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (ATCC TIB-202; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) was maintained at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab), 2 mM L-glutamine (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 100 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 10 mM

HEPES, and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA).

Nucleic acid purification

DNA was purified from parasites, human cultured cells, and biopsy specimens using an Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was quantified by NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), diluted in Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (TE) buffer to 25 ng/µl if necessary, and stored at –20 °C.

Parasite quantification assay

An absolute quantification real-time PCR (qPCR) was performed using the StepOne Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The thermal profile was 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, and 75 °C for 30 s as the reading step.¹⁰ An additional melt curve was performed to check amplification product specificity from 65 °C to 95 °C. The *Leishmania* small subunit RNA gene (SSR) (accession number M80292) was used to assess the parasite load,^{11–13} and human β-actin (ACT) (accession number NM001101) was included to correct DNA content variations and inhibitor interference among samples. Oligonucleotides at 500 nM were used (5' to 3'): ACT, TAATGTCACGCACGATTCC and TCACCGAGCGCGCT,¹⁴ and SSR, TACTGGGGCGTCAGAG and GGGTGTCACTGTTGC.¹¹ Standard curves were prepared with log dilutions of the number of cultured *Leishmania* and of the DNA mass (ng) of human cells (immortalized THP-1 human monocyte lineage), for SSR and ACT analyses, respectively. Parasite load was defined as the number of parasite equivalents per mass of DNA host cells (ng). No more than 50 ng of total DNA was analyzed per reaction. Negative samples were classified as having an undetermined SSR quantification cycle (Cq) if values that corresponded to ACT Cq were above the limit of detection (LOD). Data analyses were performed using Excel.

Ethical issues

This research study was approved by the Research Ethics Committee of FIOCRUZ (protocol 0033.0.011.346-11). Written informed consent was obtained from all patients. Diagnostic tissue fragments were obtained from the border of the ulcers by biopsy, under sterile conditions after local anesthesia. Normal skin samples were obtained from esthetic surgery patients. The *Leishmania* Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC, <http://clioc.fiocruz.br/>) is registered with the World Federation for Culture Collections (WFCC-WDCM 731) and is recognized as a Depository Authority by the Brazilian Ministry of the Environment (D.O.U. 05.04.2005).

Results

Clinical profile of the patients

The distributions of age, Montenegro skin test results, number of lesions, and duration of disease are compared in Figure 1. ML and MCL represent a reactivation process of CL that often occurs in patients with a compromised immune system. These scenarios are frequently related to older patients, and thus ML and MCL showed a higher mean patient age than CL, which exhibited a wider age range (Figure 1A). The intradermal Montenegro skin test revealed higher responsiveness for ML patients than CL and MCL patients (Figure 1B). MCL patients presented higher numbers of cutaneous

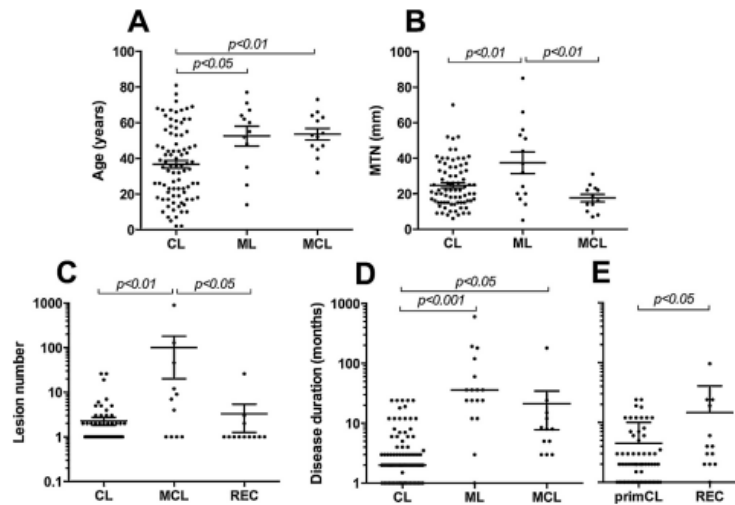


Figure 1. Patient clinical data: (A) age (years); (B) Montenegro skin test (millimeters); (C) number of lesions; (D) and (E) disease duration (months). Each black dot corresponds to one patient. Lines express the mean values for each group and the range represents the standard error of the mean. Additional abbreviations are 'CL' for cutaneous leishmaniasis, 'MCL' for mucocutaneous manifestation, for primary cutaneous lesions.

lesions compared to CL and REC patients (Figure 1C). The longest duration of disease was observed for ML and MCL (Figure 1D). Additionally, the same criterion was longer for reactivation cases than for primary CL cases (Figure 1E). These results showed a relationship between a poor prognosis and a longer healing time after treatment.

Parasite quantification assay

Standard curves for both targets (quantification cycle versus logarithm of the *Leishmania* cell number or mass of human DNA) showed similar efficiencies (96.66% for SSR and 99.25% for ACT), good linear correlation (r^2 of 0.99 for both), and a linear dynamic range. The efficiency for parasite curves was not affected by the presence of human DNA. Melting temperatures (T_m) were $78.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for the SSR assay and $81.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for the ACT assay. Negative controls provided undetectable SSR amplification values. Undetected parasite loads were not plotted.

Tissue parasitism in the different clinical forms and treatment outcomes

There was a tendency towards lower tissue parasitism for mucous cases (ML) compared to cutaneous lesions (CL), although the difference was not statistically significant (Figure 2A). This observation is in agreement with a previous study from Peru reporting *Leishmania* (*Viannia*) cases.¹⁵ Nevertheless, the data diverged from the histopathological consensus that mucous lesions present significantly lower parasite levels than cutaneous ones.⁷ Scars showed very low and mostly undetectable values (Figure 2A), indicating that treatment and the patient's immune system had been able to reduce the parasite number. Skin samples from mucocutaneous lesions (MCL) ($n = 11$) presented significantly higher parasite loads than mucous samples from MCL ($n = 7$), following the same pattern observed for CL and ML, according to the tissue localization (Figure 2B). When the total CL group was classified into good and poor responders, the latter group showed

statistically lower parasite levels (Figure 2C). However, on analyzing the relapse group separately from the poor responders, a different scenario was found. Only the first reactivation group (1stREC) presented statistically lower tissue parasite levels than all of the others (Figure 2D), compared to primary lesions from good responders (GR) and poor responders (primPR) and first (1stREC) and second recurrences (2ndREC). Lesions from multiple relapses showed a high parasite load, indicating immune system exhaustion, possibly as a result of chronic disease. Additionally, further analysis of a small number of samples, including paired primary and first recurrent lesions from the same patient, was conducted ($n = 8$) (data not shown). However, no statistical difference and no correlation (Spearman $r = 0.16$, $p = 0.7$) was found, corroborating parasite persistence.

Parasite load is inversely correlated to the duration of disease progression

Recurrent infections showed significantly longer durations of disease progression than primary lesions (Figure 1E). An inverse and slight but significant correlation was observed between the duration of disease progression and parasite load when all cutaneous lesions were assessed, with recurrences (Spearman's $r = -0.35$, $p = 0.002$) (Figure 3A). Also when the CL group was classified according to the duration of disease progression into early ($n = 43$, up to 3 months), intermediate ($n = 18$, between 3 and 12 months), and late CL ($n = 10$, older than 12 months), a longer disease duration led to a significant reduction in parasite load (Figure 3B).

Discussion

Leishmania (*V.*) *braziliensis* infections correspond to lesions with a scarcity of parasites. In this scenario, molecular tools could be useful to confirm the diagnosis, identify the species, and also to assess the parasite load, which would be of benefit in the clinical and therapeutic management. In the present study, qPCR was used

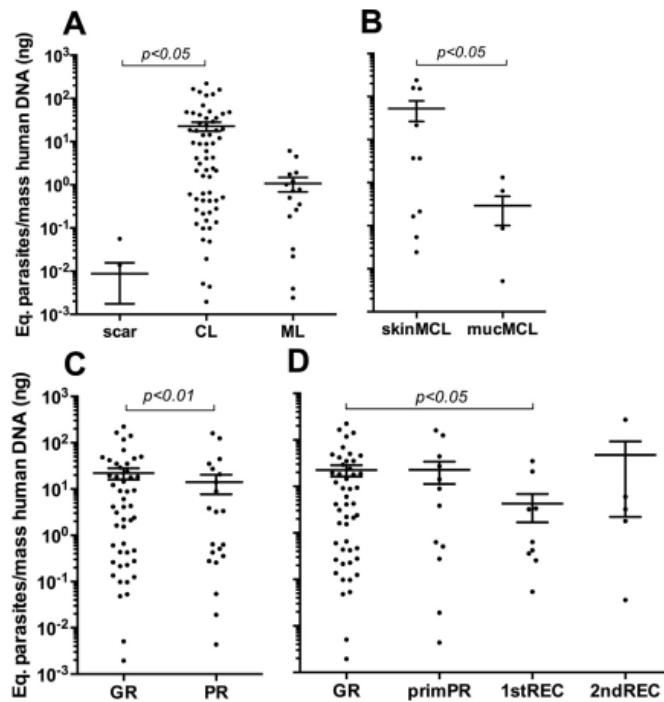


Figure 2. Tissue parasitism at the different anatomical sites: (A) number of parasites found in scars, cutaneous lesions (CL), and mucosal lesions (ML); (B) number of parasites found in skin and mucous samples from patients with mucocutaneous lesions (MCL); (C) number of parasites compared between the good responders (GR) and poor responders (PR); (D) primary and recurrent lesions analyzed within the good responders (GR) and only primary lesions from the poor responders (primPR), first relapse cases (1stREC), and secondary recurrent samples (2ndREC). Each black dot corresponds to one patient. Lines express the mean parasite load for each group and the range represents the standard error of the mean.

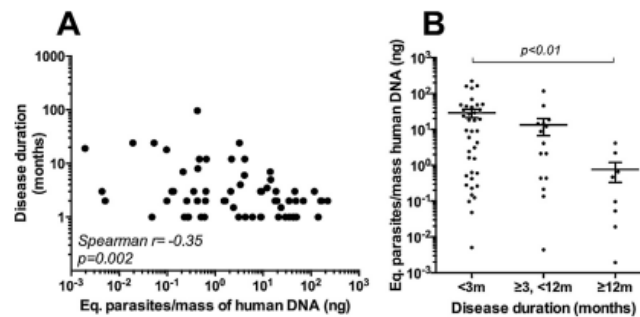


Figure 3. Parasite load is inversely correlated to the duration of disease progression: (A) correlation analysis between parasite load and the duration of disease progression for all cutaneous samples, including recurrent cases ($n = 86$) (Spearman's $r = -0.35$; $p = 0.002$); (B) number of parasites found in the early ($n = 43$, up to 3 months), intermediate ($n = 18$, between 3 and 12 months), and late CL groups ($n = 10$, older than 12 months). Each black dot corresponds to one patient. Lines express the mean parasite load for each group and the range represents the standard error of the mean.

to investigate parasite loads in TL lesions from the different clinical forms, the response to treatment, and the duration of disease progression.

The results of this study showed that skin from the cutaneous and mucocutaneous clinical forms exhibited the highest parasite

loads compared to mucosal sites. This suggests that the microenvironment of the different anatomical sites might be the key to the specific host response.¹⁶ The present study data corroborate the findings of Jara et al. (2013) in Peru, in spite of the use of a different target. In the present work, the small subunit

ribosomal RNA gene (SSU or SSR) was used^{11,12,17} and not kDNA, since its accuracy might be compromised by mini-circle heterogeneity and copy number variation among species, strains, and isolates.^{18,19} Moreover, the SSR region used herein is very conserved among members of the *Trypanosomatidae* family, enabling its use with other trypanosomatid clinical samples to assess variations in parasitism.

Sparse or undetectable parasite levels were observed in scars, indicating a role for the immune response in the healing process. Parasitological cure, however, does not seem to occur for *L. (V.) braziliensis* cases, since kDNA is present in almost 80% of scar tissue from treated patients.⁶ In the present work, although a different and less sensitive target than kDNA was used, it was possible to confirm parasite persistence in the scars.

In endemic areas of Rio de Janeiro, a good response to treatment and spontaneous cure is often observed, but a few cases may have a poor response, corresponding to a delay in healing or recurrence. Poor responders showed lower tissue parasitism than those with a good response. When infection doses were evaluated in a murine model for *L. (L.) major*, the low dose group were found to have chronic infections that required longer periods to heal, in spite of the minor pathology observed in the acute phase.⁹ These results suggest that reduced parasite titers could be related to chronic disease outcomes. However, when primary poor response lesions were analyzed separately from recurrences, a new scenario was revealed. Parasite loads from primary good and poor responders were indistinguishable, but loads were significantly lower in the first episode of recurrence, indicating that the host has some control over parasite growth. A Th1 response is important for the clinical resolution process, and is indeed expressed in both cutaneous and mucosal lesions.^{20–23} However, this response does not seem to be sufficient to induce parasitological cure, since parasites remain at a very low quantity within the scars.^{6,24} Additionally secondary recurrences showed parasite loads indistinguishable from those of primary lesions, reflecting parasite persistence and indicating an inability of the host immune system to resolve the infection and/or possible drug refractoriness. On the other hand, recurrent and mucosal diseases both have a long duration as compared to single cutaneous disease. An inverse and slight negative correlation was observed between tissue parasitism and the duration of the disease. Also, when all cutaneous cases were categorized according to the duration of disease, lower parasite titers were observed for the oldest lesions.

The present authors, in studies performed in the Rio de Janeiro endemic area, have previously demonstrated that poor responders exhibit high proinflammatory cytokine ratios (high ratio of interferon gamma (IFN- γ) to transforming growth factor beta (TGF- β)) and metalloproteinase activity characteristic of poor wound healing, in contrast to the anti-inflammatory good responders profile (low ratio of IFN- γ to interleukin (IL)-10), associated with lower gelatinase activity in the lesions.^{22,25} This proinflammatory cytokine balance could also explain the tendency of recurrent lesions to have long durations regardless of lower parasite titers. Furthermore, disease refractoriness resulting in recurrent infection could be related to immune system exhaustion and parasite persistence.

Finally, the data from this study make an important contribution to the previous statement that chronic *L. (V.) braziliensis* infections are associated with scarce parasitism.²⁰ Furthermore, parasitism in the mucosal forms was statistically indistinguishable from that in cutaneous lesions, despite the tendency to lower values. These observations are in contrast to the histopathological consensus that mucosal disease has scarce parasitism.⁷ Ultimately, the synergistic effect of treatment and the host immune system often result in a good response and parasite reduction. In this endemic area, the majority of cases end in cure. However, a few

cases may exhibit cutaneous recurrence or mucous lesions, corresponding to metastatic events. In this study, it was demonstrated that patients with multiple relapses had high tissue parasitism, suggesting treatment refractoriness and/or immune system exhaustion leading to parasite persistence.

Funding

This work was supported by FIOCRUZ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, <http://www.cnpq.br/>) PROEP/CNPq (grant 400124/211-4), PAPES VI/CNPq (407449/2012-4). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest

We have no competing interests to declare.

Acknowledgements

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS-FIOCRUZ) for the use of its facilities.

References

- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003;41:3126–32. doi:<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.7.3126>.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006;22:552–7. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>.
- World Health Organization. *Control of the leishmaniasis*. Geneva: WHO; 2015.
- Romero GA, Guerra MV, Gomes Paes M, de Oliveira Macêdo V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis* 2001;32:1304–12. doi:<http://dx.doi.org/10.1086/319990>.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:651–5.
- Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo MI, Oliveira AL, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:824–7.
- Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. I. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1986;28:253–62.
- Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1999;37:1819–23.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10125–30. doi:<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802331105>.
- Gentile C, Meireles-Filho AC, Britto C, Lima JB, Valle D, Peixoto AA. Cloning and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol* 2006;36:878–84. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.08.008>.
- Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect* 2007;9:1307–15. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2007.06.005>.
- Bezerra-Vasconcelos DR, Melo LM, Albuquerque ES, Luciano MC, Bevilacqua CM. Real-time PCR, to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Exp Parasitol* 2011;129:234–9. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.08.010>.
- Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira LO, Mestre GL, Ferreira AB, Morgado FN, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *PLoS One* 2015;10. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123009> e Collection.
- Rodrigues KM, Oliveira MP, Maretti-Mira AC, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Silva L, et al. Influence of the Notch system in the therapeutic response of

- American tegumentary leishmaniasis. *Br J Dermatol* 2011;**164**:1228–34. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10240.x>.
15. Jara M, Adauí V, Valencia BM, Martínez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol* 2013;**51**:1826–33. doi:<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00208-13>.
 16. Gutiérrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV, Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1991;**45**:281–9.
 17. Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dis* 2008;**198**:1565–72. doi:<http://dx.doi.org/10.1086/592509>.
 18. Mary C, Faraut F, Lascombe I, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:5249–55. doi:<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004>.
 19. Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* 2011;**49**:3892–904. doi:<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.100764-11>.
 20. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993;**91**:1390–5. doi:<http://dx.doi.org/10.1172/JCI116341>.
 21. Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sánchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993;**91**:500–5.
 22. Maretti-Mira AC, De Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, De Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol* 2011;**163**:207–14. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04285.x>.
 23. Gomes-Silva A, De Cássia BK, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, Da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 2007;**149**:440–4. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03436.x>.
 24. Cámera PO, Jungera J, Pires FE, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, Pirmez C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;**100**:1112–7. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.014>.
 25. Maretti-Mira AC, de Pinho Rodrigues KM, de Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Craft N. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 2011;**119**:160–4. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.009>.
 26. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:601–6. doi:<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.2.601-606.2002>.

Artigo submetido para a publicação na Parasite Immunology

Adjuvant roles of the AIM2 inflammasome in local immune responses to *Leishmania (V.) braziliensis* in patients with tegumentary leishmaniasis

REGINA BARBOSA MOREIRA¹, CLAUDE PIRMEZ¹, MANOEL PAES DE OLIVEIRA-NETO^{2,2}, LUANA DE SOUZA AGUIAR¹, ANTONIO JOSÉ DA SILVA GONÇALVES¹, LUIZA OLIVEIRA RAMOS PEREIRA¹, LAIS ABREU¹, MÁRCIA PEREIRA DE OLIVEIRA^{1*}

¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas—Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro RJ, Brazil

²Instituto Nacional de Infectologia, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro RJ, Brazil

*Corresponding author. Fax: +55 2125621039. E-mail addresses: marciapo@ioc.fiocruz.br, marciapo@gmail.com (M.P. Oliveira).

Competing Interests: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: This work was supported by Grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ – APQ1 E-26/111.727/2012) and Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP-CNPq/IOC). RBM performed the research, analysed the data and wrote the paper; CP and MPON analysed the data; LORP contributed the real-time PCR study; LSA, AJSG and LA performed the research; MPO designed the research study and wrote the paper.

Abstract

The inflammasome is a multiprotein signaling platform that activates proinflammatory cytokines and is involved in the pathogenesis of various inflammatory skin diseases. Herein, we investigated gene and protein expression of the inflammasome molecules AIM2 and NLRP3 in active lesions from patients with *L. (V.) braziliensis*-associated tegumentary leishmaniasis (TL) and correlated these findings with the clinical presentations and responses to therapy. Real-time PCR assays showed higher AIM2 gene expression in mucosal leishmaniasis (ML) compared with that in cutaneous leishmaniasis (CL). Additionally, AIM2 mRNA expression was higher in poor responders than good responder's lesions. *In situ*

protein quantification analyses revealed greater AIM2 expression in ML lesions than in CL lesions. Furthermore, the percentage of AIM2 producing cells was higher in poor responders than in good responders. IL-1 β was present in all samples, and ML patients and poor responders tended to have higher numbers of IL-1 β producing cells. The metalloprotease GP63 was also detected in all CL and ML cases and was associated with reduced NLRP3 protein expression in dermal infiltrates. Taken together, these data demonstrate that AIM2 is an important component of the inflammasome in TL patients and is directly associated with the severity of lesions.

Keywords: leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, inflammasome, AIM2, NLRP3, therapy response

Abbreviations:

TL, tegumentary leishmaniasis; CL, cutaneous leishmaniasis; ML, mucosal leishmaniasis; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns;

DAMPs, danger-associated molecular patterns; NF- κ B, nuclear factor κ B; AIM2, absent in melanoma 2; NLRP3, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing receptor 3.

Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne disease that is caused by obligate intracellular protozoans of the genus *Leishmania*, which are transmitted by multiple sandfly species. Leishmaniasis remains a major tropical disease and affects approximately 1.6 million people each year. Most of these individuals live in lower–middle income countries where communities have less access to healthcare services (1). In Brazil, *L. (Viannia) braziliensis* is the most widely distributed dermatropic species and is associated with the majority of tegumentary leishmaniasis (TL) cases. Patients exhibit lesions on the skin or in nasal and oral mucosa (2), and the majority of symptomatic TL patients develop cutaneous leishmaniasis (CL), which is characterized by localized self-healing dermal ulcers or papules. A small percentage of CL patients with *L. (V.) braziliensis* infections are refractory to specific therapies and develop mucosal leishmaniasis (ML), which is characterized by metastatic and progressive lesions in the nasopharyngeal mucosa (3).

Leishmania strains and types of immune responses influence clinical disease manifestations. Although intracellular amastigotes subvert oxygen-dependent immunity, they do not inactivate the innate immune signaling pathways that orchestrate antigen presentation and expansion of specific Th1/Th2 cell subsets (4,5). In regions where *L. (V.) braziliensis* is endemic, CL patients tend to present Th1 immune response profiles, whereas severe cases, such as those with mucosal leishmaniasis, exhibit a predominance of Th2 type cytokines that play important roles in tissue damage (6,7,8). During initial phases of *Leishmania* infection, innate immune cells such as macrophages, neutrophils, and dendritic cells secrete inflammatory mediators that subsequently drive adaptive immunity (9,10). Activation of innate immunity by pathogens or cellular stresses (PAMPs or DAMPs) is mediated by pattern recognition proteins such as Toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing (NLR) proteins (11). Numerous studies suggest that innate immunity is a pivotal mechanism in parasite control. However, most *Leishmania Viannia* complex organisms do not cause disease, and the mechanisms that are responsible for resistance are not associated with Th1 cytokine profiles (12).

Recent studies show innate immune responses mediate the assembly of inflammasomes, which are multiprotein intracellular receptor platforms that activate proinflammatory caspases to produce IL-1 β and IL-18 and/or induce pyroptotic cell death (13). Canonical inflammasomes activate caspase-1, and most of these complexes are assembled by pattern-recognition receptors (PRRs) of the NLR family, or of Interferon-inducible pyrin and HIN-200 protein families, which include the absent in melanoma (AIM2) protein. AIM2 and NLRP3 are dependent on the adaptor molecule apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (ASC) to activate both NF- κ B and caspase-1. In humans, the NLRP3 inflammasome can also be activated by non-canonical caspase-4 and/or caspase-5-dependent pathways (14).

NLRP3 responds to various stimuli, including extracellular ATP, pore-forming toxins, RNA–DNA hybrids, and several viral, bacterial, fungal, and protozoan pathogens (15). In a murine model of *L. (L.) amazonensis* infection, the NLRP3 inflammasome was activated, which inhibited parasite replication (16). As a major sensor of double-stranded DNA (dsDNA) in the cytoplasm, AIM2 forms a protein

platform with the adapter ASC and procaspase-1, and is classified as a DNA receptor molecule (17).

Few studies have demonstrated the role of inflammasomes in the pathogenesis of tegumentary leishmaniasis. Hence, we investigated *in situ* gene and protein expression of NLRP3 and AIM2 inflammasome platforms in active TL lesions caused by *L. (V.) braziliensis*, and correlated these findings with clinical forms and responses to N-methyl glucamine therapy.

Materials and methods

Patient selection

A total of 39 patients with *Leishmania (V.) braziliensis* infections and American tegumentary leishmaniasis (ATL) were selected from endemic areas in the southeast region of Brazil. Among these, 92% of subjects were from the State of Rio de Janeiro. The diagnoses were performed using Montenegro skin testing and direct observations for the presence of the parasite using imprint or histopathology and/or kDNA polymerase chain reaction (PCR) analyses. Patients were assigned to CL (n = 28) and ML (n = 11) groups according to clinical forms. CL patients were subclassified into groups of good and poor responders to therapy. Good responders (n = 15) were those who achieved complete epithelization and had no metastatic cutaneous lesions or mucosal lesions at three months after the end of therapy. Poor responders (n = 13) were those without complete healing of lesions at three months after the end of therapy and/or with secondary lesions. After diagnosis, all patients were treated with N-methyl glucamine (Glucantime®, Rhodia Laboratories, Antony, France). CL cases received doses of 5–20 mg/kg daily for 20–30 days. A previous study demonstrated that low doses of antimony have identical efficacy as larger doses (Oliveira-Neto *et al.*, 1997). Hence, the present ML patients received 20 mg/kg antimony for an average of 60 days according to the Brazilian Ministry of Health protocol (18). All protocols were performed in accordance with the principles specified in the Declaration of Helsinki and under local ethical guidelines. All patients provided written informed consent for the collection of samples and the subsequent analyses. This study was conducted with the approval of the Ethical Committee of Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (protocol CAE02765312.7.0000.5248).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using 4- μ m formalin-fixed, paraffin-embedded sections from the lesions of 16 selected patients, including 12 CL cases (six good responders and six poor responders) and 4 patients with mucosal lesions. Antigen retrieval was performed using 10 mM citrate buffer (pH 6.0) at 95°C. The sections were incubated with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidases and were then incubated with bovine serum albumin (Sigma, USA) to inhibit non-specific binding. This was followed by incubation with primary antibodies against AIM2, ASC, NLRP3, IL-1 β , and the major surface protein GP63 (Abcam, Cambridge, UK) at 4°C overnight. Following incubation with secondary antibodies and a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Amersham, Little Chalfont, UK), diaminobenzidine substrate (Biogen, Cambridge, MA, USA) was applied as a chromogen. Nuclei were counterstained with Harris haematoxylin (Merck, Darmstadt, DE), and the slides were dehydrated and coverslipped. All control slides were treated similarly without primary antibody or using an irrelevant antibody of the same isotype as the primary monoclonal antibody. Images of stained slides were captured using an optical microscope (E600, Nikon) coupled to a digital camera (CoolSNAP-Pro Color). Cells showing visible nuclei and brown/red immunoprecipitation were considered positive. Number of positive cells within inflammatory infiltrates were determined by counting a total of 500 cells in 10 x 1000 magnification fields, and were expressed as percentages of positive cells. All counts were acquired blindly.

Relative gene expression

Total RNA was isolated from 5- μ m thick frozen sections of tissue fragments from lesions (35 to 40 sections) and was processed using an RNA extraction kit (RBC, BioAmerica Inc, Miami, FL, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was analysed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Reverse transcription was performed using oligo(dT) primers (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD), and the first-strand cDNA was stored at -20°C until use. Real-time PCR was performed using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) and the following primer pairs (Atianand et al., 2011): GAPDH, 5' TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC and 3'

ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAC; NLRP3, 5' GGCATATCACAGTGGGATTC and 3' GATCTTCGCTGCGATCAAC; AIM2, 5' GTTTGAGACCCAAGAAGGCA and 3' CACACGTGAGGCGCTATTTA; ASC, 5' CCCTCCTCAGTCGGCAG and 3' AGGCTGGTGTGAAACTGAA. Reactions were performed in duplicates with annealing and reading temperatures of 60°C, a primer concentration of 400 nM and a single initial step of 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 secs and 60°C for 1 min. Subsequently, a dissociation curve was used to verify the specificity of amplification products. Duplicate wells with no cDNA were included as non-template controls. Assays were performed in a ViiA7™ Real-Time PCR system (Life Technologies). Sizes of amplicons were confirmed by resolving PCR reaction products on 1.5% agarose gels. Finally, mRNA expression was normalized and expressed relative to that of the GAPDH housekeeping gene. Relative gene expression was calculated using the Pfaffl mathematical method.

Statistical Analysis

Data was presented as the means \pm standard errors of the mean (SEM) and analyzed using GraphPad Prism 6.0 software. Differences were identified using Mann-Whitney U test for comparisons of two groups. Analysis of contingency tables was performed using Fisher's exact test and differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Demographic and clinical features differed between study groups. Specifically, the ML group included significantly more men ($p < 0.05$) of greater age ($p < 0.05$) than CL patients. In addition, the illness durations of ML patients were longer than those of CL patients ($p < 0.001$; Table 1).

Expression levels of inflammasome genes in TL patients were determined using real-time PCR assays with mRNA that was isolated from active lesions of CL ($n = 15$) and ML ($n = 9$) patients. Although AIM2, ASC, and caspase-1 mRNAs were detected in all cases, NLRP3 mRNA was detected in only 71% of CL cases and in 72.5% of ML cases (data not shown).

In this study, we correlated inflammasome transcript levels with clinical forms and responses to antimony therapy, and observed that, AIM2 expression was higher in ML lesions than in CL lesions, and among CL patients, poor responders also had

higher AIM2 mRNA expression levels than good responders ($p < 0.05$; Fig. 1A). In contrast, NLRP3 and ASC transcript levels did not vary significantly between clinical forms or with responses to therapy (Fig. 1B and Fig. 1C). However, caspase-1 mRNA levels were significantly higher in ML lesions than in CL lesions ($p < 0.05$), although no differences were identified between good and poor responders (Fig. 1D).

Figure 1. Expression of inflammasome AIM2 and NLRP3 mRNA in cutaneous and mucosal samples. Data were analyzed according to the clinical presentation of cutaneous leishmaniasis (CL) or mucosal leishmaniasis (ML) and responses to therapy; good response, GR; poor response, PR. Transcripts of AIM2 (A), NLRP3 (B), ASC (C), and Caspase-1 (D) were detected in frozen sections of CL and ML lesions using real-time PCR. Data are presented as means \pm standard errors of the mean (SEM). The expression levels of indicated transcripts were normalized to that of the housekeeping gene GAPDH. Differences were identified using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests and are indicated with p-values.

In further studies, we determined whether observed inflammasome gene expression profiles are associated with protein synthesis in tissues using immunohistochemical analyses. In these experiments, a total of 16 ATL patients, including 12 CL cases and 4 ML cases, were analyzed. ML fragments that were too small were excluded from immunohistochemical analyses. *In situ* AIM2, NLRP3, and ASC signals were mostly observed in cytoplasm of cells from dermal inflammatory infiltrates (Fig. 2A).

Quantification analyses demonstrated that AIM2 protein was more abundant in CL and ML lesions than NLRP3 ($p < 0.001$; Fig. 2B). Moreover, the percentage of AIM2 producing cells was significantly higher in ML lesions than in CL lesions ($p < 0.01$). Subsequent analyses of responses to antimony therapy showed higher AIM2 protein in poor responders than in good responders ($p < 0.05$; Fig. 2C). However, the adaptor protein ASC was present in all samples, and its expression did not differ between patient groups (Fig. 2D).

Figure 2. Immunostaining of AIM2, NLRP3, and ASC in lesions from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. Samples were analyzed according to clinical presentations (CL and ML) and responses to therapy (GR and PR). Paraffin-

embedded tissues were incubated with monoclonal antibodies and color reactions were achieved using avidin–biotin immunoperoxidase techniques. All sections were counterstained with Harris haematoxylin (magnification, 400 x; bar, 10 μ m). The graphs show frequencies of positive cells in inflammatory infiltrates. Differences were identified using non-parametric Mann-Whitney tests and are indicated with p-values.

Leishmania zinc-metalloprotease reportedly inhibited IL-1 β production by cleaving NLRP3 inflammasome components *in vitro*. Because NLRP3+ cells were barely detected in inflammatory infiltrates from CL (3/12; 25%) and ML lesions (1/4; 25%), we determined whether the presence of the major virulence factor GP63 negatively impacts the expression of the inflammasome NLRP3 protein in local inflammatory infiltrates. In these experiments, GP63 densities were determined in active lesions from CL (n = 11) and ML (n = 4) patients using immunohistochemical analyses. Although GP63 staining was observed in all samples, ML tissues tended to have greater numbers of GP63+ cells than CL tissues (p = 0.052). Moreover, numbers of GP63+ cells were significantly higher in CL lesions from poor responders than in lesions from good responders (p < 0.01; Fig. 3).

Figure 3. GP63+ cells in active lesions from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients were evaluated according to clinical presentations and responses to treatment. Paraffin-embedded sections were incubated with a monoclonal anti-GP63 antibody and color reactions were achieved using an avidin–biotin immunoperoxidase technique. Data are presented as means \pm SEM and indicate numbers of positive cells/m² tissue. Differences were identified using non-parametric Mann-Whitney U test and are indicated with p-values.

Because inflammasome activation leads to the conversion of proinflammatory cytokines from inactive to active forms, we determined IL-1 β expression in tissues from active CL and ML lesions using immunohistochemistry. Local IL-1 β producing cells were present in all tissue samples with typical intracellular immunostaining patterns (Fig. 4A). However, percentages of IL-1 β producing cells in ML lesions tended to be higher than in CL lesions (p = 0.056). Similarly, IL-1 β producing cells were slightly less prominent in patients who responded well to antimony therapy than in poor responders (p = 0.059; Fig. 4B).

Figure 4. IL-1 β + cells in inflammatory infiltrates from active lesions of cutaneous and mucosal leishmaniasis. Samples were analyzed according to the clinical presentation (CL and ML) and therapeutic responses (GR and PR). Paraffin-embedded tissues were incubated with monoclonal antibodies and color reactions were achieved using an avidin–biotin immunoperoxidase technique. All sections were counterstained with Harris hematoxylin (magnification: 1000x, bar: 20 μ m). The graphs show frequencies of positive cells within inflammatory infiltrates.

DISCUSSION

In previous studies, we characterized prognostic factors that are associated with the development of more severe clinical forms in patients with *L. (V.) braziliensis* infections and consequent ATL (22,23,24). However, the roles of innate immune components against *Leishmania* spp. in endemic areas of ATL remain poorly characterized. Cytoplasmic sensors comprise a complex group of immunoregulatory systems and provide a wide range of potential therapeutic targets (25). Thus, we investigated the roles of the canonical inflammasomes NLRP3 and AIM2 in the immunopathogenesis of human *L. (V.) braziliensis* mediated ATL lesions.

During *L. (L.) amazonensis* infections of resistant C57BL/6 mice, the NLRP3 inflammasome protein was associated with protective responses. Moreover, *in vitro* assays of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) mexicana* infections indicated that IL-1 β is released in an NLRP3 inflammasome-dependent manner (16). In agreement, pathogenic roles of NLRP3 were demonstrated in mice that were infected with *L. (L.) major*. Specifically, *Nlrp3*^{-/-}, *Asc*^{-/-}, and *Casp1*^{-/-} mice exhibited significant reductions in footpad swelling and parasite burden relative to the wild-type BALB/c mice (27). In a recent study in humans, genes that are associated with the inflammasome were highly expressed in *L. (V.) braziliensis* lesions (28). However, parasite polymorphisms have been identified between species and as well as clones from the same species (29). Thus, different experimental models and *Leishmania* species likely produce varying clinical manifestations in humans.

NLRP3 transcripts were present in the majority of CL and ML cases, and gene expression levels were similar in the present patient groups. Thus, these data warrant further investigations of the mechanisms that are associated with

decreased NLRP3 protein synthesis in dermal inflammatory infiltrates from active lesions. In particular, these data suggest that NLRP3 inflammasome activation is limited in lesions of ATL patients. Shio et al. (30) investigated the influence of the virulence factor GP63 in NLRP3 activation and IL-1 β secretion in PMA-differentiated THP-1 macrophages. In these experiments, *Leishmania* spp. infection effectively induced cleavage of NLRP3 and inhibited experimental induction of IL-1 β . In agreement, GP63 protein expression was detectable in all of the present CL and ML samples, even though infection with the subgenus *Viannia* was notably characterized by a scarcity of amastigotes in lesional tissues.

The AIM2 protein was previously localized in the cytoplasm and functioned as a mediator of IFN activity (31). In addition, AIM2 inflammasomes, but not the NLRP3, has been involved in tissue injury processes in inflammatory diseases (32). The present data indicate an unknown role of AIM2 in the progression of lesions that are caused by protozoan infections. Specifically, ML lesions presented higher levels of AIM2 transcripts than CL lesions. Additionally, AIM2 mRNA expression was downregulated in lesions from good responders when compared with poor responders. Moreover, proportions of AIM2 protein producing cells were high in dermal infiltrates from CL patients, particularly in those patients with poor responses to antimony therapy. Consistent with these findings, Koning et al. (33) described a strong increase in epidermal expression of AIM2 in psoriatic and atopic dermatitis lesions, suggesting a role of this inflammasome protein following inflammatory acute and chronic skin barrier disruption. In addition, IFN- γ and AIM2 expression were correlated with lesional skin in psoriasis (34). Thus, AIM2 protein synthesis in ATL lesions may be induced by IFN- γ and likely delays clinical resolution. Accordingly, in a study from our group, Maretti-Mira et al. (35) associated therapeutic failure with IFN- γ overexpression in lesions, particularly in those that were caused by the *L. (V.) braziliensis* strain that circulates in endemic areas of Rio de Janeiro.

In a murine model of *L. (L.) major* infection, IL-1 β production was associated with parasite persistence and unfavourable prognosis (36,37). Similarly, the present quantitative data demonstrate that elevated proportions of IL-1 β + cells are associated with ML and poorly responding CL patients. Several inflammatory diseases have been associated with increased IL-1 β activity (38,39). In particular,

roles of IL-1 β were evaluated in a region with endemic *L. (L.) mexicana* human TL, and the presence of a single nucleotide polymorphism (SNP) in this population was associated with increased IL-1 β activity. Moreover, immunohistochemical analyses showed that IL-1 β was diffusely distributed in lesions from patients with high parasite loads in localized and diffuse CL lesions. Moreover, in a study of patients with the localized form and lower parasite burdens, IL-1 β was only present in cells (40).

In conclusion, the present data provide further evidence of the involvement of the AIM2 inflammasome as a major cytosolic receptor platform that mediates cleavage and activation of IL-1 β which may contribute to disease severity as an adjuvant component.

References

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 2012, 7(5):e35671.
2. Grimaldi G Jr & Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implication for future research. Clin. Microbiol. Rev. 1993, 6(3):230-250.
3. Oliveira-Neto MP, Matos MS, Perez, MA, da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. Intern. J. Dermatol. 2000, 39(7): 506-514.
4. Geiger A, Bossard G, Sereno D, Pissar AJ, Lemestre JL, Vincendeau P, Holzmüller P. Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. Front Immunol. 2016, 7:212. doi: 10.3389/fimmu.2016.00212.
5. Reithinger R, Dujardin JC, Hechimi L, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect. Dis. 2007, 7(9):581-96.
6. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V. Hum Immunol. 2009, 70(6):383-90. doi:10.1016/j.humimm.2009.01.007

7. Cruz AM, de Oliveira MP, de Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor- α in human american tegumentary leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996, 91(4):1390-5.
8. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokines patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. J. Clin. Invest. 1993, 91(4):1390-5.
9. Charmoy M, Hurrell BP, Romano A, Lee SH, Ribeiro-Gomes F, Riteau N, et al. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. Eur J Immunol. 2016, 46(4):897-911. doi: 10.1002/eji.201546015.
10. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. Immunobiology. 2008, 213(3-4):377-87. doi: 10.1016/j.imbio.2007.12.005.
11. Gurung P & Kanneganti TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. Cell Microbiol. 2015, 17(9):1286-94. doi: 10.1111/cmi.12484.
12. Trujillo CM, Robledo SM, Franco JL, Velez ID, Erb KJ, Patino PJ. Endemically exposed asymptomatic individuals show no increase in the specific *Leishmania (Viannia) panamensis*-Th1 immune response in comparison to patients with localized cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol. 2002, 24: 9-10.
13. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-1 β . Mol. Cell 2002, 10(2):417-26.
14. Broz P & Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signaling. Nat Rev Immunol. 2016, 16(7):407-20. doi: 10.1038/nri.2016.58
15. Latz E, Xiao TS & Stutz A. Activation and regulation of the inflammasome. Nat. Rev. Immunol. 2013, 13(6):397-411. doi:10.1038/nri3452.
16. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, Gutierrez FR, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. Nat Med. 2013, 19(7):909-15. doi: 10.1038/nm.3221.

17. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvarth G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1 activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009, 458(7237):514-8. doi: 10.1038/nature07725.
18. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg*. 1997, 57(6):651-5.
19. Brazilian Ministry of Health. Manual de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana. Editora do Ministério da Saúde; 2007, 184p.
20. Atianand MK, Duffy EB, Shah A, Kar S, Malik M, Harton JA. Francisella tularensis reveals a disparity between human and mouse NLRP3 inflammasome activation. *Biol Chem*. 2011, 286(45):39033-42. doi: 10.1074/jbc.M111.244079.
21. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001, 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9. e45,"-1,"xxx/9.e45.
22. Maretti-Mira AC, Bittner J, Oliveira-Neto MP, Liu M, Kang D, Li H, Pirmez C, Craft N. Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012, 6(9):e1816. doi: 10.1371/journal.pntd.0001816
23. Pereira L de O, Maretti-Mira AC, Rodriguez KM, Lima RB, Oliveira-Neto MP, Cupolillo E, Pirmez C & de Oliveira MP. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013, 108(5):665-7.
24. Rodriguez KM, Oliveira MP, Maretti-Mira AC, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Soares DA, Dolci EL, Perico RA, Pirmez C. Influence of Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. *Br J. Dermatol*. 2011, 164(6):1228-34. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10240.x.

25. Davis BK, Wen H & Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Ann. Rev. Immunol.* 2011, 29:707-35. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405
26. Gurung P, Karki R, Vogel P, Watanabe M et al. An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 2015, 125(3):1329-38. doi: 10.1172/JCI79526
27. Novais FO, Carvalho LP, Passos S, Roos DS, Carvalho EM., Scott P, Beiting DP. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J. Inv. Dermatol.* 2015, 135(1):94-101. doi: 10.1038/jid.2014
28. Guimarães LH, Machado PRL, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacelar O et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the State of Bahia, Brazil. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.* 2009, 103(7):712-15. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.04.019.
29. Shio MT, Christian JG, Jung JY, Chang KP & Olivier M. PKc/ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation is attenuated by *Leishmania* zinc-metalloprotease during infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015, 9(6):e0003668. doi: 10.1371/journal.pntd.0003868
30. Choubey D, Walter S, Geng Y, Xin H. Cytoplasmic localization of the Interferon-inducible protein that is encoded by the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family. *FEBS Lett.* 2000, 474(1):38-42.
31. Denes A, Coutts G, Lénárt N, Cruickshank SM, Pelegrin P, Skinner J, Rothwell N, Allan SM, Brough D. AIM2 and NLRC4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015, 112(13):4050-5. doi: 10.1073/pnas.1419090112.
32. Koning HD, Bergboer JG, van den Bogaard EH, van Vlijmen-Willems IM, Rodijk-Olthuis D, Simon A, Zeeuwen PL, Schalkwijk J. Strong induction of AIM2 expression in human epidermis in acute and chronic inflammatory skin conditions. *Exp Dermatol.* 2012, 21(12):961-4. doi: 10.1111/exd.12037.
33. Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Kammerbauer C, Göss C, Anz D, Simanski M, Gläser R, Harder J, Hornung V, Gallo RL, Ruzicka T, Besch R,

Schauber J. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med.* 2011, 3(82):82ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3002001.

34. Maretti-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 2011, 163(2):207-14. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04285.x.

35. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, and Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 719361

36. Voronov E, Dotan S, Gayvoronsky L, White RM, Cohen I, Krelin Y, Benchetrit F, Elkabets M, Huszar M, El-On J, Apte RN. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int. Immunol.* 2010, 22(4):245-257.

37. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-1 β . *Mol. Cell* 2002, 10(2):417-26.

38. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu. Ver. Immunol.* 2009, 27:229-65. doi:101146/annurev.immunol.021908132715

39. Fernandez-Figueiroa EA, Rangel-Escaraveño C, Espinosa-Mateos V et al. Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1 β . *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012, 6(5):e1533. doi:101371/journal.pntd.0001533.