



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Mariana Gatto

**Análise do perfil transcricional de células THP-1
infectadas com *Leishmania infantum/chagasi*:
ênfase no inflamassoma e receptores NODs**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais

Orientadora: Prof^a Dr^a Alexandrina Sartori
Coorientadora: Prof^a Dr^a Alessandra Pontillo

Mariana Gatto

Análise do perfil transcricional de células THP-1 infectadas com *Leishmania infantum/chagasi*: ênfase no inflamassoma e receptores NODs

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori
Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Pontillo

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gatto, Mariana.

Análise do perfil transcricional de células THP-1 infectadas com *Leishmania infantum/chagasi* : ênfase no inflamassoma e receptores NODs / Mariana Gatto. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Coorientador: Alessandra Pontillo

Capes: 40101096

1. Leishmaniose visceral. 2. Células THP-1. 3. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 4. Resposta imune.

Palavras-chave: Células THP-1; Inflamassomas; Leishmaniose visceral; RNA-seq.



Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

(Marthin Luther King)



Às pessoas mais importantes da minha vida:

Meus pais, Cyro e Regina

Meus irmãos, Bruno e Ana Clara

DEDICO

Agradecimientos



Agradecimentos especiais

Agradeço imensamente a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste sonho

Aos meus queridos pais, Cyro e Regina, pela educação, exemplo de vida, apoio e compreensão. Entre as inúmeras lições, não posso deixar de agradecer por me instruírem a seguir minha jornada de vida com fé, paciência, fazendo sempre o melhor possível, sem me esquecer de ser humilde e grata por tudo. Obrigada por me darem forças nos momentos mais penosos e ensinarem que muitas vezes é melhor ter paz do que razão. O mérito é de vocês por mais esse sonho realizado. Espero um dia ser merecedora de todo o esforço e amor dedicado por vocês. Tenho muito orgulho e gratidão pelos pais que tenho. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Bruno e Ana Clara, pelo apoio, carinho, por torcerem por mim e principalmente, pelo companheirismo. Foi ao lado de vocês que construí as mais lindas (e engraçadas) memórias da minha vida. Agradeço por encontrar em vocês meus melhores amigos e por estarem comigo em todos os momentos importantes da minha vida. Amo vocês e tenho orgulho de ser sua irmã.

Ao meu companheiro Gustavo, pelo apoio, paciência e principalmente pelo amor e carinho demonstrados nesse caminho que percorremos juntos. Aprendo todos os dias com você. Obrigada por me dar força nos momentos de desânimo e inquietações, por me fazer rir nos momentos mais tristonhos e por estar comigo nos melhores. Amo você.

A todos os meus amigos e familiares, primos, avós, tios, principalmente ao tio Atair e tia Nice, pelo incentivo e carinho que sempre me prestaram ao longo de toda a minha vida. Amo vocês.

À minha querida e amável orientadora, Profa. Dra. Alexandrina Sartori, pela a qual tenho (e sempre tive) grande admiração. Meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, disponibilidade, paciência e antes de tudo, por ter me acolhido e me orientado durante este suado doutorado. Obrigada por compartilhar comigo seu admirável conhecimento, por confiar em mim e por acreditar na minha capacidade. Espero um dia poder ser, pelo menos um pouquinho, a profissional e pessoa exemplar e correta que a senhora é. Que orgulho ter tido a senhora como minha orientadora!

À minha querida co-orientadora, Profa. Dra. Alessandra Pontillo, do Laboratório de Imunogenética do ICB-USP, pela grande contribuição e participação, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada por me receber com tanto carinho e atenção em seu laboratório. Ti ringrazzio tantissimo!

Aos colaboradores desta tese, Prof. Dr. James Venturini e à Babi, agradeço pela participação, parceria e grande colaboração neste trabalho e principalmente, pela atenção, apoio e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Citometria do HC-UNESP, em especial às colaboradoras Profa. Dra. Marjorie e Aline, pessoas incríveis que conheço faz um tempo. Obrigada pelas análises que enriqueceram esta tese e também pelo apoio, amizade e carinho durante todos esses anos.

Aos colaboradores desta tese, Prof. Dr. João Pessoa Araujo Junior e Taís Fukuta do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/UNESP, agradeço pelos ensinamentos, atenção, parceria e indispensável ajuda na realização da técnica de transcriptoma.

Ao Prof. Dr. Guilherme Targino Valente e ao Ivan, do Departamento de Energia e Bioprocessos, agradeço pelas análises de bioinformática e bioestatística, tão importantes e indispensáveis neste trabalho. Meus sinceros agradecimentos pela atenção, explicações e parceria.

À Profa. Dra. Angela M. Victoriano de Campos Soares, por todo o apoio, carinho e cooperação durante todo o período da minha pós-graduação, principalmente durante o doutorado. Meu mais profundo e sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Maurício Sforcin e principalmente ao Lucas, do Departamento de Imunologia e Microbiologia do IBB-UNESP, minha gratidão pela contribuição e explicações para manutenção das células THP-1.

À minha querida amiga Patrícia Borim, com a qual tive o prazer de conviver durante todo o doutorado. Você foi meu braço direito nos experimentos, sempre disposta e com uma palavra de incentivo e encorajamento para meus problemas que pareciam nunca acabar. Obrigada pela ajuda imensa, na prática e no dia-a-dia, e principalmente pela amizade, carinho e por torcer tanto por mim. Tenho admiração pela sua persistência, dedicação e por esse coração gigante que você tem. Você é especial.

Às minhas amigas de moradia e de pós-graduação, Thaty e Drica, por todo o companheirismo e apoio. Começamos e terminamos juntas esse árduo, porém gratificante, caminho da pós-graduação e agradeço por compartilharem comigo momentos de frustrações, desespero, mas na maioria das vezes, momentos de alegria e divertimento. Obrigada pela amizade de vocês.

Às minhas amigas “desorientadas” Fran, Laura, Jéssica e Mariana Miziara, meus sinceros agradecimentos pela amizade, motivação, incentivo, auxílio e por tantos momentos de alegria, mas também, pelo amparo, união e força que demos umas às outras quando os momentos não foram de tanta alegria assim. Passamos por momentos difíceis, mas tenho certeza que a Prof^a Sueli está feliz de ver onde o legado dela chegou. Obrigada por tudo, nunca vou me esquecer de vocês.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de MI; Karen, Vanessa, Thaysa, Luiz “Pinguim”, Thalita, Lariza, Camila, Bia, Karina, Guilherme, Nayore, Matheus, Carol e Rodrigo. Agradeço por cada abraço de incentivo, amizade e principalmente por torcerem por mim. Obrigada por escutarem todas as minhas bobagens e choradeiras. Grata pela convivência, pelas histórias de vida e por tantas conversas, cafés e risadas. São essas coisas que deixam a nossa jornada diária mais leve. Guardo cada um em lugar especial no coração.

Às meninas do Laboratório da Profa. Dra. Alexandrina; Larissa Ragozo, Thais, Larissa Ishikawa, Luiza, Sofia e Juliana. Agradeço todo o apoio, bate-papo e risadas durante esse período. Não convivi diariamente com vocês, mas muitas eu já conhecia de longa data. Obrigada por estarem sempre dispostas a me ajudar ou tirar minhas dúvidas.

A todos do Laboratório de Imunogenética – ICB/USP, por me receberem com tanto carinho e atenção, realmente vocês fizeram eu me sentir em casa. Obrigada pelos ensinamentos e convivência.

À banca do Exame Geral de Qualificação, Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla e Prof. Dr. James Venturini, obrigada pela disposição em analisar este trabalho e pela contribuição e valiosas sugestões. Meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários da Unipex, em especial ao Carlinhos, Zé Georgette, Paulinho, Vick, Regina Moreto, Igor e Guiomar, obrigada pela cooperação, gentileza e apoio para a realização desta tese.

Aos discentes do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, que me acompanharam em vários momentos. Obrigada pela troca de experiências, companhia, otimismo e pelas tantas conversas produtivas. Agradeço muito o carinho e confiança que depositaram em mim para representar vocês durante tantos anos no Conselho de Pós-Graduação em Doenças Tropicais.

Aos pós-graduandos da Unipex, pela solidariedade, por me auxiliarem em tantos momentos e por dividir comigo tantas experiências.

Agradeço em especial à Profa. Dra. Sueli Calvi, uma pessoa querida por todos e que tive o prazer de ter como orientadora durante o Aprimoramento e o Mestrado. Meus mais sinceros agradecimentos a você, à maravilhosa profissional, à sua infinita paciência, ao seu carisma e à sua sabedoria. Meus mais sinceros agradecimentos por repartir seu conhecimento, seu tempo, pela amizade e por tanta ajuda que me ofereceu. Obrigada por acreditar em mim. Cheguei até aqui através da sua ajuda, apoio e ensinamentos. Desejo poder contribuir à ciência e ao universo acadêmico com o mesmo entusiasmo que me transmitiu. Espero que onde estiver esteja orgulhosa de mim.

Obrigada Deus, por me guiar, por me dar forças, por estar comigo, por iluminar meu caminho e por me dar a oportunidade de crescimento. Obrigada por me abençoar com muito mais do que eu mereço.
Obrigada por tudo.



Meus sinceros agradecimentos...

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu –
FMB/UNESP;

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu –
FMB/UNESP;

Pós-graduandos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial ao Régis e Dani Rodrigues,
pelo apoio, amizade e carinho;

Conselho de Pós-Graduação em Doenças Tropicais; agradeço pela oportunidade de fazer parte deste
Conselho e pela troca de experiências;

Docentes da Pós-Graduação em Doenças Tropicais, em especial à Profa. Dra. Cilmery Kurokawa, obrigada
pela convivência, atenção e ensinamentos durante minha jornada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa concedido;

Seção de Pós-Graduação da FMB, em especial à Bruna Quirino Jorgetto;

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem e secretários Michele K. L. Nishi, Júlio C.
Botari e André Mioni;

Meu agradecimento especial aos Docentes do Departamento de Doenças Tropicais, Prof. Dr. Carlos Magno C. B. Fortaleza e Prof. Dr. Ricardo A. M. B. Almeida, meus supervisores do Estágio de Docência, agradeço pela oportunidade e conversas;

Agradeço o Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) em especial à Rita de Cássia Athanázio pelo auxílio na pesquisa, ajuda na captação de recursos e à secretária Juliana Interdonato;

Funcionários da Administração da FMB.



RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença negligenciada causada por *Leishmania donovani* na Índia e África ou *Leishmania infantum* na Europa e América Latina. O desenvolvimento de resposta imune eficaz e subsequente eliminação destes patógenos, requer o reconhecimento inicial da *Leishmania*, o qual é intermediado por receptores de reconhecimento padrão expressos por células da imunidade inata, entre eles os receptores de ligação a nucleotídeo (NLRs). Alguns NLRs ativam uma plataforma de proteínas, os inflamassomas, responsáveis pela ativação da caspase-1 e maturação de IL-1 β e IL-18 e outra classe de NLRs, chamada NODs, ativam vias que culminam na ativação de NF- κ B e produção de mediadores inflamatórios. O envolvimento desses receptores na LV ainda é pouco elucidado. Mesmo diante dos mecanismos de defesa do hospedeiro, esses parasitas conseguem sobreviver dentro dos macrófagos utilizando várias estratégias para escapar da resposta imune. Para um melhor entendimento dos mecanismos imunes envolvidos na LV, caracterizamos o perfil transcricional e a formação de inflamassomas e NODsomas de células THP-1 infectadas com *L. infantum*. Os resultados mostram que a *L. infantum* não induziu produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β e nem ativação de caspase-1 após 8, 24 e 48 horas de infecção. Além disso, a infecção resultou em padrão de expressão gênica similar às células sem estímulo e distinto de células estimuladas com LPS, indicando que os parasitas entram nas células de forma mais silenciosa. Após a infecção houve aumento da expressão de alguns genes como ACTG1, ACTB, CD36 e DUSPs relacionados com vias de motilidade celular e regulação de MAPKs. Os genes CSF1 e CDC20 foram dois dos 30 mais expressos após infecção e estão relacionados com ciclo celular e diferenciação de macrófagos para um perfil anti-inflamatório. O gene GBP1, associado com ativação de inflamassomas, foi sub expresso após a infecção. Além disso, infecção com *L. infantum* resultou na expressão de poucos genes relacionados com a via dos NLRs, destacando-se entre esses o TNFAIP3 e IL1RN, referentes à modulação negativa dessa via. Os resultados obtidos indicam que a *L. infantum* entra nas células THP-1 de forma mais silenciosa, desativa vias inflamatórias, entre essas a via de receptores NLRs e evita a montagem de uma resposta imunológica efetora. Provavelmente o parasita usa esses recursos como mecanismos adicionais de escape para garantir sua sobrevivência dentro das células.

Palavras-chave: *Leishmaniose visceral, células THP-1, inflamassomas, RNA-seq.*

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected infectious disease caused by *Leishmania donovani* in India and Africa or *Leishmania infantum* in Europe and Latin America. The development of an effective immune response and subsequent elimination of these pathogens requires the initial recognition of the *Leishmania* that is mediated by pattern recognition receptors expressed in innate immunity cells, such as nucleotide-binding receptors (NLRs). Some NLRs activate a multiprotein platform named inflammasomes, responsible for the activation of caspase-1 and consequent maturation of IL-1 β and IL-18; and another class of NLRs, the NODs, activate pathways that trigger NF- κ B activation and production of inflammatory mediators. The involvement of NLRs in LV is poorly elucidated. Even in the presence of host defense mechanisms, these parasites can survive within the macrophages by employing successful strategies to escape from immune response. For a better understanding of the immune mechanisms involved in LV, we characterized the transcriptomic profiling and assembly of inflammasomes and NODs during infection with *L. infantum* in THP-1 cells. The results show that *L. infantum* did not induce the production of TNF- α , IL-6 and IL-1 β nor activation of caspase-1 after 8, 24 and 48 hours of infection. In addition, the infection resulted in a pattern of gene expression similar to the non-stimulated cells and distinct from LPS-stimulated cells, indicating that the parasites enter inside cells in a more silent way. After infection, there was increased expression of some genes, such as ACTG1, ACTB, CD36 and DUSPs related to cellular motility and regulation of MAPKs pathways. The CSF1 and CDC20 genes were two of the 30 most expressed after infection and were related to cell cycle pathway and macrophage differentiation to an anti-inflammatory profile. The GBP1 gene, associated with inflammasome activation, was downregulated after infection. In addition, infection with *L. infantum* resulted in the expression of few genes related to the NLRs pathway, such as TNFAIP3 and IL1RN that are related to down modulation of this pathway. The results indicate that *L. infantum* enters inside the THP-1 cells more quietly, deactivates inflammatory pathways, including the NLR receptor pathway, and avoids the assembly of an effector immune response. Probably the parasite uses these strategies as additional escape mechanism to ensure its survival within host cells.

Keywords: Visceral leishmaniasis, THP-1 cells, inflammasomes, RNA-seq.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACKR3 – Atypical chemokine receptor 3 (gene)
ACTB – Actin beta (gene)
ACTG1 – Actin gamma-1 (gene)
AIM2 – Interferon-inducible protein AIM2
APC/C - Anaphase promoting complexo/cyclosome
ASC – Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain
ATP – Adenosine triphosphate
BRCC3 - BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3
Cb3 – Complement C3 fragment
CD – Célula dendrítica
CD (n°) – Cluster of differentiation
CDC20 – Cell division cycle 20 (gene)
CLR – C-type lectin receptors
CR3 – Complement receptor 3
CSF1 – Colony stimulating factor 1 (gene)
CXCL11 – C-X-C motif chemokine 11
CXCL12 - C-X-C motif chemokine 12
DAMP – Damage-associated molecular pattern
DAP - D-glutamyl-meso-diaminopimélico
DUSP (n°) – Dual specificity phosphatase (gene)
EAE – Experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid
FAK – Focal adhesion kinase
FC – Fold change
FDR – False discovery rate
Foxp3 – Forkhead box P3
GBP (n°) – Guanylate binding protein
GDE – Genes diferencialmente expressos
GM – CSF – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GP63 – Glicoprotein 63
GPIL – Glicoinositol phospholipids
GTP – Guanine triphosphato
HC – Hierarquical clustering
IFN- γ – Interferon- γ
IL-10 – Interleukin-10
IL-12 - Interleukin-12
IL-18 – Interleukin-18
IL-1RN – Interleukin-1 receptor antagonista
IL-1 β – Interleukin-1 β
IL-23 – Interleukin-23

IL-4 – Interleukin-4
IL-6 – Interleukin-6
iNOS – Inducible nitric oxide synthase
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LAMP-1 – Lysosomal-associated membrane protein 1
LeTx – Anthrax lethal toxin
LPG – Lipophosphoglycan
LPS – Lipopolysaccharide
LV – Leishmaniose visceral
MAPK – Mitogen-activated protein kinases
M-CSF – Macrophage colony-stimulating factor
MDP – Muramyl dipeptide
MFI – Mean fluorescence intensity
MHC – Major histocompatibility complex
mTOR – Mammalian target of rapamycin
NAIP – Neuronal apoptosis inhibitory protein
NF- κ B – Factor nuclear-kappa B
NIG – Nigericina
NK – Natural Killer
NLR – Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
NLRA – NLRs with an N-terminal acidic transactivation domain
NLRC – NLRs expressing an N-terminal caspase recruitment domain (CARD)
NLRP (1-14) – NLRs expressing an N-terminal Pyrin domain (PYD)
NO – Nitric oxide
PAMP – Pathogen-associated molecular patterns
PBS – Phosphate buffered saline
PCA – Principal component analysis
PGE2 – Prostaglandin-2
PKC – Protein kinase C
PMA – Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PRR – Pattern recognition receptor
PYD – Pyrin domain
Rab7 – Member RAS oncogene family (gene)
RIG-1 – Retinoic Acid Inducible Gene 1 Protein
RIP3 – Receptor-interacting serine-threonine kinase 3
RIPK2 – Receptor interacting protein kinase 2
RNS – Reactive nitrogen species
ROS – Reactive oxygen species
RPS6K1 – Ribosomal protein S6 kinase (gene)
TAK1 – Transforming growth factor- β -activated kinase 1
TGF- β – Transforming growth factor- β
Th1 – T-helper 1
Th17 – T-helper 17

Th2 – T-helper 2

TLR – Toll-like receptors

TNFAIP3 – TNF alpha induced protein 3

TNFR – Tumor necrosis factor receptor

TNF- α – Tumor necrosis factor alpha

TRAF6 – TNF Receptor Associated Factor 6

Treg – Regulatory T-cell

TRIF – TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

TXNP – Thioredoxin- interacting protein

VP – Vacúolo parasitóforo

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis protein

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA..... 20

Leishmaniose visceral.....20

Resposta imunológica na leishmaniose visceral21

Receptores NLRs.....25

Inflamassomas.....27

Inflamassomas e leishmanioses35

NODsomas37

CAPÍTULO II - PROJETO EXECUTADO

OBJETIVOS 43

MÉTODOS 45

Manutenção e diferenciação de células THP-1 45

Cultivo de *Leishmania infantum*..... 45

Infecção das células THP-1 com *Leishmania infantum* 46

Estímulo das células THP-1 com LPS e nigericina..... 47

Quantificação de TNF- α , IL-6 e IL-1 β 47

Quantificação de caspase-1 ativa..... 47

Construção da biblioteca de transcriptoma e RNA-seq 48

Bioinformática e análise bioestatística 49

Análise estatística..... 50

RESULTADOS 52

Infecção de células THP-1 com *L. infantum* 52

Perfil de citocinas 52

Avaliação de caspase-1 ativa..... 56

Expressão global de transcritos em células THP-1 infectadas com *L. infantum* através da técnica de RNA-seq 57

Expressão diferencial de genes em células THP-1 infectadas com *L. infantum* 58

Análise de enriquecimento das categorias ontológicas dos genes diferencialmente expressos	61
Top 30 genes mais e menos expressos em células THP-1 infectadas com <i>L. infantum</i>	64
<i>L. infantum</i> compromete a expressão de genes associados com a resposta imune e com os receptores TLRs	67
DISCUSSÃO.....	75
CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS.....	92

Capítulo 1

Revisão de literatura

(Figuras 1R - 6R)

Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV), é uma doença sistêmica causada por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*. Esses parasitas possuem ciclo de vida digenético, sofrendo transformações entre o inseto vetor (mosquito) e o hospedeiro vertebrado. No intestino do inseto estes protozoários encontram-se sob a forma flagelada e extracelular denominada promastigota e no hospedeiro vertebrado os parasitas são intracelulares e chamados amastigotas, forma pelas quais sobrevivem e se replicam em células fagocitárias, principalmente em macrófagos (1,2).

Dentre as doenças negligenciadas, a LV é a segunda maior causa de morte e a quarta em morbidade no mundo (1). São estimados 500 mil novos casos anualmente e 616 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco. Em 2014, 90% dos casos novos ocorreram no Brasil, Etiópia, Somália, Índia e Sudão, no entanto os programas de eliminação da LV têm dado resultados satisfatórios e países como Bangladesh mostraram queda de 9000 para 600 novos casos em 2014-2015 (3,4) (**Figura 1 revisão**).

Parasitas da espécie *L. donovani* causam LV na Índia e países da África, enquanto que na América Latina, norte da África e Europa o agente causador é a *L. infantum* (5). A nomenclatura das espécies de *Leishmania* vem sendo alterada em função do uso de novas ferramentas moleculares (6). Neste trabalho optamos pela nomenclatura atualizada (*L. infantum*) mas respeitamos os nomes adotados nos trabalhos citados. A LV é transmitida através da picada do inseto vetor que é o mosquito *Phlebotomus* na Ásia, África e Europa e o mosquito *Lutzomya* nas Américas (5). O *Lutzomya longipalpis* é amplamente distribuído em toda a América Latina e as fêmeas deste inseto realizam o repasto sanguíneo para completar seu ciclo gonotrófico, determinando assim a transmissão da *L. infantum*. Nos últimos 30 anos as áreas de transmissão da LV no Brasil têm se expandido devido à migração do vetor do seu habitat natural para áreas

Gatto, M., 2018

urbanas, resultando em aumento da incidência da doença (7). A epidemiologia da LV está relacionada com as condições de transmissão, intimamente ligadas às mudanças no meio ambiente, comportamento humano, situação socioeconômica e perfil imunológico e genético dos hospedeiros humanos (5).

As *Leishmanias* são capazes de sobreviver e se multiplicar dentro dos fagolisossomos dos macrófagos, de se disseminar pelo sistema linfático, alcançado assim o sistema retículo endotelial e causando hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia. Os principais sintomas associados com a LV incluem febre, fraqueza, perda de peso e apetite, anemia, palidez e aumento do fígado e do baço. Exames laboratoriais mostram ocorrência de pancitopenia e hipergamaglobulinemia (8).

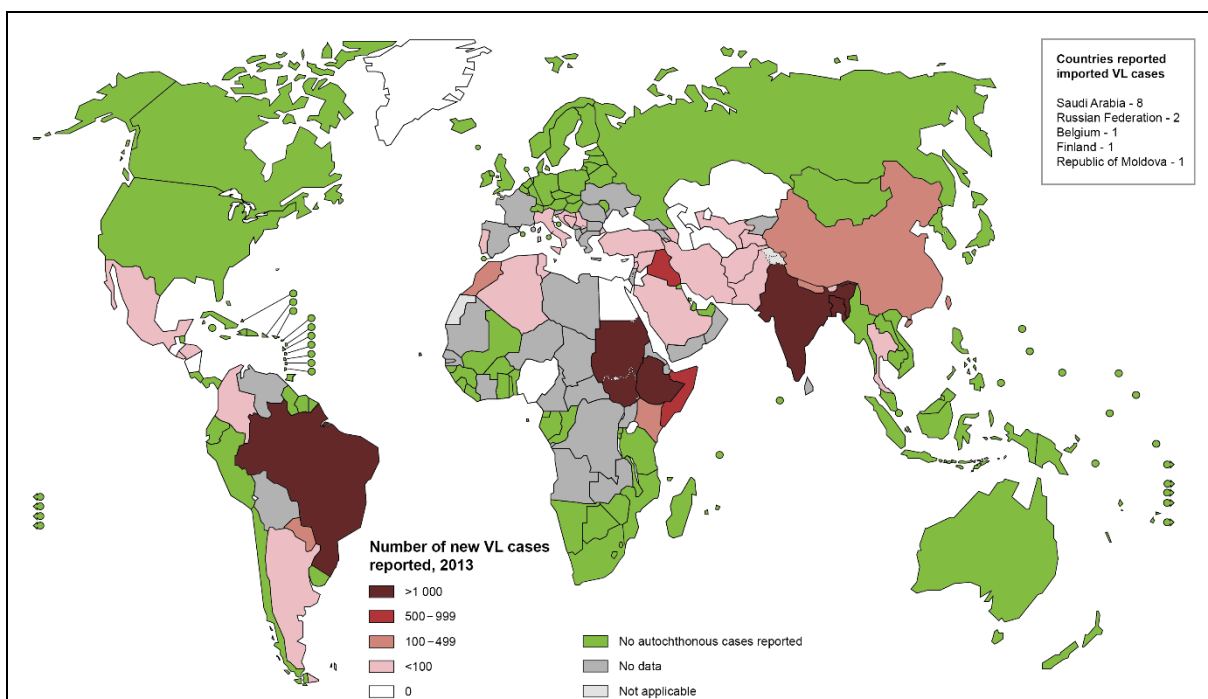


Figura 1 (revisão). Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo, 2013 (WHO).

Resposta imunológica na leishmaniose visceral

Após a picada do inseto e subsequente inoculação dos parasitas na derme do hospedeiro, células da imunidade inata presentes na pele recrutam células inflamatórias para o local e iniciam

o processo de indução da resposta imunológica (9). Embora muitos aspectos desta resposta ainda não sejam completamente entendidos, sabe-se que o reconhecimento inicial dos parasitas ou de células infectadas por eles, envolve receptores presentes em células *Natural Killer* (NK), células dendríticas (CDs), monócitos, macrófagos e células polimorfonucleares. Após o reconhecimento da *Leishmania* ocorre ativação de vias sinalizadoras que determinam resposta inflamatória com a finalidade de conter a replicação parasitária (10). A imunidade protetora contra a LV é caracterizada pelo perfil Th1, com produção inicial de IL-12 por macrófagos e CDs. Esta citocina estimula as células NK a secretarem IFN- γ , induzindo desse modo proliferação e diferenciação de linfócitos Th1 efetores, também produtores de IFN- γ . O IFN- γ estimula os macrófagos infectados a secretarem TNF- α , que age em sinergismo com o IFN- γ , determinando a atividade antiparasitária destas células, com produção de moléculas efetoras tóxicas como óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas do oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) capazes de destruir as amastigotas (11–14). Por outro lado, a suscetibilidade e a progressão da LV estão relacionadas com a diferenciação de uma resposta do tipo Th2, caracterizada por produção de IL-4 e de outros mediadores que desativam macrófagos, como por exemplo, IL-10, TGF- β e prostaglandina E2 (PGE2) (15). Além disso, a IL-10 produzida por células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) está relacionada com a progressão da leishmaniose visceral (16,17). Células do perfil Th17, que são linfócitos TCD4⁺ produtores da citocina pró-inflamatória IL-17, também participam da resposta imune desta doença. Essas células se diferenciam na presença de TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23; sendo a IL-23 responsável pela expansão, manutenção e expressão de receptores de quimiocinas nas células Th17 (18). O papel desta subpopulação celular parece ser distinto entre a LV e a leishmaniose cutânea. Estudos mostram que na LV as Th17 estão relacionadas com resolução da infecção (18–20) enquanto outros relatos evidenciam seu papel na gravidade da leishmaniose cutânea (21,22).

As citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18 desempenham um importante papel na resposta imune por agentes infecciosos ou doenças autoimunes. Essas duas citocinas são sintetizadas como precursores inativos e requerem maturação por enzimas proteolíticas, chamadas caspases, para poderem exercer suas funções biológicas. A IL-1 β participa da fase aguda de infecções, mobilizando e ativando leucócitos, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, além de aumentar a produção de proteínas do sistema complemento e proteína C-reativa por hepatócitos. Essa citocina acentua as funções antimicrobianas dos leucócitos aumentando a capacidade fagocítica de neutrófilos, monócitos e macrófagos, a expressão do receptor C3b, a opsonização e também a produção de ROS (23–25). De forma semelhante, a IL-18 promove uma robusta fagocitose dos patógenos, aumenta a produção de ROS e liberação de IL-6. A IL-18 também é capaz de desencadear a produção de IFN- γ por células T e NK em colaboração com a IL-12. Portanto, essa citocina está envolvida com ativação das funções macrofágicas que incluem o burst oxidativo, aumento da apresentação de antígeno, aumento da migração de leucócitos, contribuindo assim para a resposta imune adaptativa e indução de resposta Th1 (23,26).

Além desta participação na resposta imune inata, IL-1 β e IL-18 contribuem de forma importante para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, principalmente durante o processo de diferenciação de células T-helper específicas em resposta a doenças infecciosas e autoimunes. IL-1 β em sinergia com IL-23, IL-6 e TGF- β induz diferenciação de células Th17, enquanto a IL-18 juntamente com IL-12, IL-1 β e IFN- γ polariza para uma resposta tipo Th1 (27–29). A IL-1 β é capaz de regular a resposta mediada por IFN- γ pois induz produção de PGE₂, a qual suprime a produção de IFN- γ . Neste caso, o bloqueio da produção de IFN- γ por IL-1 β resulta na polarização de resposta Th17 (30). A IL-18 em sinergia com a IL-1 β promove a produção de IL-17 por células T CD4⁺ e diferenciação de células Th17 na encefalomielite autoimune experimental (EAE), contribuindo para a gravidade da doença (31,32). Estudo com *Candida albicans* mostrou

que produção de IL-1 β e IL-18 por CDs derivadas da medula óssea induzem respostas Th1 e Th17, as quais foram fundamentais para controlar a candidíase disseminada (33). A IL-18 parece estar relacionada com direcionamento de Th2. Estudo com leishmaniose cutânea mostrou que essa citocina determina maior suscetibilidade em camundongos infectados. Aumento dos níveis de IL-18 contribuiu para aumento de IL-4 e subsequente direcionamento da resposta imune para um perfil Th2 acompanhado de alta carga parasitária. Neutralização de IL-18 nesses animais reduziu os níveis de IL-4 e a quantidade de parasitas no local da infecção (34).

Mesmo diante de todos esses mecanismos de defesa do sistema imunológico, parasitas do gênero *Leishmania* desenvolveram várias estratégias para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, modulando funções celulares e regulando a resposta imune para poder sobreviver dentro dos macrófagos (11,14). Dentre os inúmeros mecanismos de escape, se destacam a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β por células Treg ativadas pelo parasita, as quais regulam a resposta imune inflamatória e contribuem para a persistência do patógeno (16,17). O lipofosfoglicano (LPG) expresso na superfície das *Leishmanias* e algumas enzimas de promastigotas comprometem a ativação do sistema complemento do hospedeiro, por fosforilar proteínas e desativar as vias clássica e alternativa do complemento (35). A glicoproteína 63 (GP63), uma protease de superfície da *Leishmania*, causa proteólise do C3b e gera C3bi. Essa proteína se liga nas promastigotas, facilitando a opsonização dos parasitas e sua entrada nos macrófagos através do receptor CR3 (36). *Leishmanias* também interferem no recrutamento de LAMP-1 e Rab7 e como consequência há atraso na maturação do fagossomo, afetando a sinalização, desenvolvimento dos fagossomos e sua fusão com os lisossomos (37,38). Estudos com células humanas mostram que o LPG interfere na transcrição de mRNA de IL-1 β enquanto a GP63 prejudica a produção de ROS, resultando em baixa produção de IL-1 β (39–41).

Receptores NLRs

O sistema imune tem a capacidade de reconhecer uma grande variedade de microrganismos e substâncias nocivas ambientais ou endógenas e gerar uma resposta imune protetora. No entanto, para o desenvolvimento de resposta imune adaptativa eficiente, é preciso o reconhecimento inicial dos patógenos e de outros estressantes celulares. Esse reconhecimento é realizado por células da imunidade inata através de receptores celulares denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*). Esses receptores reconhecem estruturas de patógenos, denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou ao dano (DAMPs) (42,43). Os PRRs são expressos em determinadas células do hospedeiro incluindo macrófagos, monócitos, CDs, neutrófilos e células epiteliais e apresentam diferentes padrões de expressão capazes de reconhecer PAMPs específicos; também ativam distintas vias de sinalização e determinam diferentes respostas imunológicas contra os patógenos. Os PAMPs incluem proteínas, ácidos nucleicos e complexos de lipídeos e carboidratos sintetizados por microrganismos (43–45). Exemplos de alguns PAMPs reconhecidos pelo sistema imune na superfície das *Leishmanias* incluem LPG, glicoinositolfosfolipídios (GPIL) e a protease GP63 (46–48).

Os PRRs incluem principalmente os receptores Toll-like (TLRs) e lectinas do tipo C (CLRs) os quais monitoram o espaço extracelular e os compartimentos endossômicos. Os PRRs intracelulares são as helicases (RIG-1)-like que reconhecem RNA, os sensores de DNA (AIM2) e os receptores NOD-like (NLRs). Os receptores NOD-like ou NLRs (receptores de ligação a nucleotídeo contendo domínios NBD e LRR) são sensores citosólicos que reconhecem PAMPs e DAMPs, monitorando desse modo os compartimentos intra e extracelulares para sinais de infecção ou injúria tecidual (44,45,49). Nos humanos a família NLRs compreende 22 sensores caracterizados pela presença de dois domínios funcionais; o domínio central NACHT de oligomerização ATP ou GTP-dependente

Gatto, M., 2018

(chamado NBD ou NOD); e o domínio C-terminal com repetições ricas em leucina (LRRs, do inglês *Leucine-Rich Repeats*). O domínio N-terminal é variável, sendo utilizado para classificar os NLRs em diferentes subfamílias: NLRPs (com domínio pirínico, PYD), NLRCs ou NODs (domínio de recrutamento da caspase, CARD), NLRB ou NAIPs (domínio BIR), NLRA (domínio ácido de transativação, CIITA) e NLRX (domínio com função ainda desconhecida) (50,51).

Os NLRPs contêm 14 membros (NLRP1-NLRP14) e alguns deles estão envolvidos na ativação do complexo de proteínas chamado inflamassoma (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12). A subfamília NLRC contém 5 membros (NOD1, NOD2, NOD3/NLRC3, NLRC4, NOD4/NLRC5); NOD1 e NOD2 estão envolvidos na regulação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), fator de transcrição para genes que codificam mediadores pró-inflamatórios e outros componentes antimicrobianos (iNOS, proteases, defensinas); NLRC4/IPAF que ativa inflamassoma e NLRC3 e NLRC5 que estão relacionados com expressão do MHC (50–52) (**Figura 2, revisão**). Após a ativação, os NLRs participam da resposta imune induzindo inflamação, autofagia ou morte celular (50).

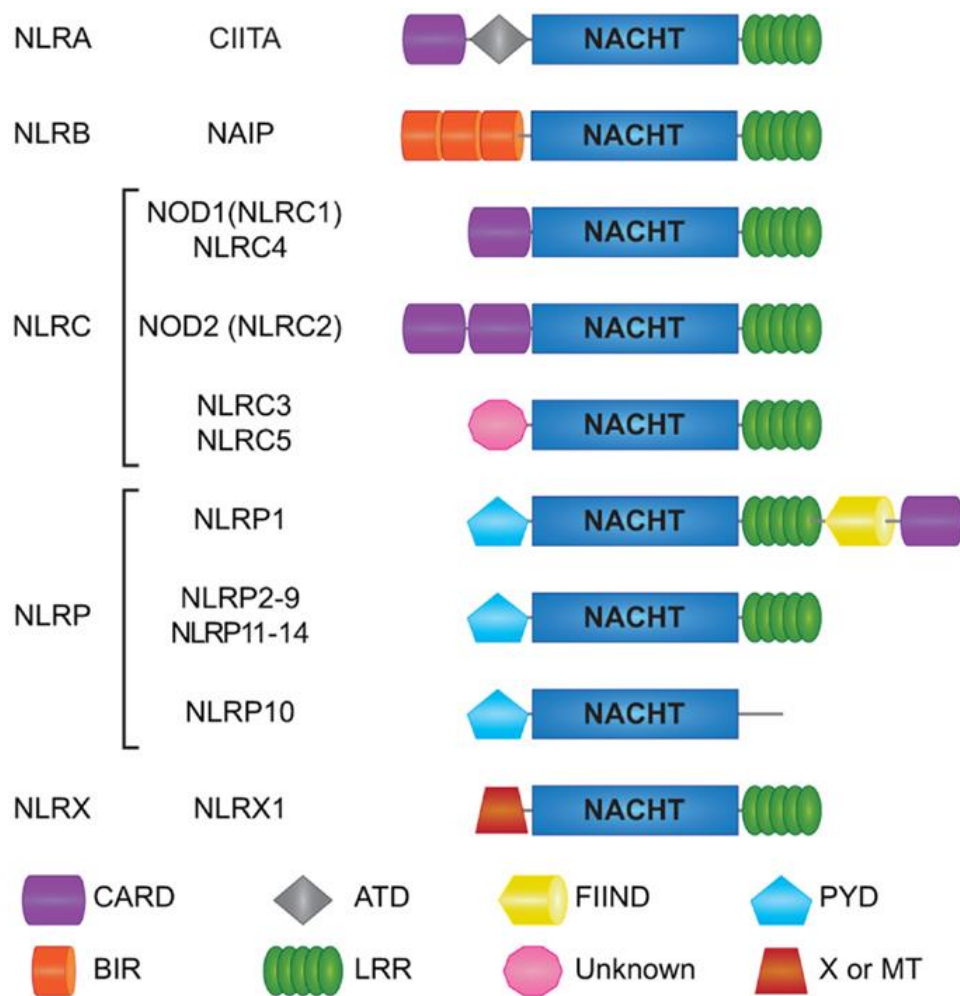


Figura 2 (revisão). Representação dos domínios dos NLRs. Os NLRs em humanos são divididos em cinco categorias: NLRP, NLRC, NLRB, NLRA e NLRX. Os 22 NLRs nos humanos contêm um domínio central (NACHT), um domínio C-terminal com LRR, com exceção do NLRP10. NLRA ou CIITA apresenta domínio CARD e ATD, os NAIPs possuem domínio BIR, os NLRCs possuem domínio CARD, os NLRPs domínio PYD e o NLRX, domínio X (Saxena & Yeretssian, 2014).

Inflamassomas

Os sensores NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 e IPAF/NLRC4 são expressos por neutrófilos, CDs e principalmente monócitos e macrófagos e são capazes de ativar o inflamassoma. O inflamassoma consiste de uma plataforma de múltiplas proteínas, capaz de ativar proteases inflamatórias cisteína-aspártico como as caspase-1, 4 e 5. Várias proteínas são substratos dessas caspases, entretanto elas são principalmente conhecidas pela ação proteolítica de clivar os precursores de IL-1 β e IL-18 (pró-IL-1 β e pró-IL-18) e liberar as formas maduras e ativas

destas citocinas (51). A ativação do inflamassoma e das caspase-1, 4, 5 e 11 também resulta em um tipo de morte celular inflamatória denominada piroptose, caracterizada pelo intumescimento celular e formação de poros na membrana, por onde o conteúdo citoplasmático é liberado para o meio extracelular. A ativação de piroptose também resulta na liberação de IL-1 β e IL-18 (53).

O inflamassoma é composto pelo sensor, a proteína adaptadora ASC (*proteína associada à apoptose com domínio CARD e PYD*) e a caspase-1 (44,50). Ele se forma após o reconhecimento de PAMPs/DAMPs no citosol pelos próprios receptores NLRs (NLRP1, NLRP3, NAIP/NLRC4) ou por outros receptores que não são NLRs mas que contém um domínio PYD (AIM2,IFI16) (50,51). Esse reconhecimento pode ser direto como é o caso do receptor NAIP que reconhece flagelina de bactérias e ativa inflamassoma através do sensor NLRC4/IPAF; ou indireto como o NLRP3, que detecta alterações no citosol causadas por PAMPs e DAMPs (44,54). Tanto a ligação direta com o PAMP quanto as alterações no citosol resultam na realocação de monômeros dos NLRPs no citosol e em alterações conformacionais (oligomerização) no sensor, de modo que a interação NACHT e LRR se modifica (a molécula se abre adquirindo conformação ativa) permitindo a exposição do domínio PYD e a consequente associação do sensor com a proteína ASC/PYCARD. A ligação com ASC recruta a pró-caspase-1, que sofre autoclivagem e libera a caspase-1 ativa, responsável por processar as formas imaturas da IL-1 β e IL-18 (44,55).

A regulação positiva ou negativa de inflamassomas pode ocorrer de maneira extrínseca ou intrínseca nas células (56). A desubiquitinação de NLRP3 mediada pela desubiquitinase BRCC3 é identificada como um *priming* na ativação deste inflamassoma e provavelmente ocorre após estimulação de PRRs (57). A proteína quinase PKC codificada pelo gene PRKCD é produzida após estímulo com PRRs e é responsável pela fosforilação e ativação do inflamassoma NLRC4 (58). Moléculas da superfamília do receptor de TNF (TNFR), como a CD40L, podem inibir a ativação de NLRP3 e NLRP1 de uma maneira contato-dependente com células TCD4 efetoras (59). Indução de Gatto, M., 2018

iNOS e produção de óxido nítrico, também podem acarretar nitrosilação de NLRP3 e inibir sua atividade (60). IFNs do tipo I também estão relacionados com diminuição de IL-1 β e IL-18 por inibir a produção das suas pró-formas e por reprimirem a clivagem destas citocinas pelos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 (61). A quantidade de mRNA de NLRP3 tem mostrado ser regulada por microRNA miR-223, o qual é responsável por diminuir os níveis deste receptor (62).

Dentre os NLRPs, o inflamassoma NLRP3 é o que está descrito de forma mais detalhada até o momento e sua ativação ocorre em níveis transcricionais e pós-transcricionais. Para a ativação de NLRP3 são necessários dois sinais. O sinal 1 ou *priming* é induzido através de ligantes de TLRs, NLRs, receptores de citocinas e ativação de NF- κ B que resulta no aumento da expressão de NLRP3, caspase-1, pró-IL-1 β e pró-IL-18 (55,63). O segundo sinal consiste da ativação do inflamassoma NLRP3 por uma grande variedade de estímulos. Como esses estímulos apresentam grande variedade estrutural e química, o NLRP3 não é ativado ligando-se diretamente a esses ativadores e sim através de sinais celulares que são induzidos em resposta a esses ativadores. Dentre os sinais celulares propostos para ativação de inflamassoma NLRP3, destacam-se efluxo de potássio (K⁺), sinalização de cálcio (Ca²⁺), formação de ROS, disfunção mitocondrial e ruptura de lisossomos (63,64).

Diminuição da concentração intracelular de K⁺ ocorre em resposta à alguns agonistas como ATP extracelular ou toxinas de bactérias, como a nigericina. Por exemplo, ATP extracelular ativa o receptor purinérgico P2X7 induzindo a formação de poro pelo canal panexina-1, liberando desse modo K⁺ para o meio extracelular, o que resulta na alteração da concentração iônica intracelular e ativação de inflamassoma (65–67). O fluxo de Ca²⁺ intracelular relacionado ao retículo endoplasmático também é conhecido por ativar inflamassoma NLRP3 (68,69). O reconhecimento de PAMPs e DAMPs pode resultar na geração de ROS, principalmente provenientes da mitocôndria. Danos na oxidase NADPH ou em outros sistemas oxidativos por ROS mitocondrial

determinam ativação de inflamassoma NLRP3. Além disso, disfunção mitocondrial e morte celular, resulta no aumento de DNA mitocondrial oxidado no citosol o qual é capaz de ligar-se no NLRP3 e ativar inflamassoma (70–72). Algumas partículas ambientais como sílica, asbesto, alumínio, amiloide- β ou mesmo patógenos, quando são endocitados ou fagocitados, formam agregados que levam à desestabilização e ruptura dos lisossomos, liberando catepsina B no citosol, a qual induz ativação de inflamassoma e produção de IL-1 β (73,74) (**Figura 3, revisão**).

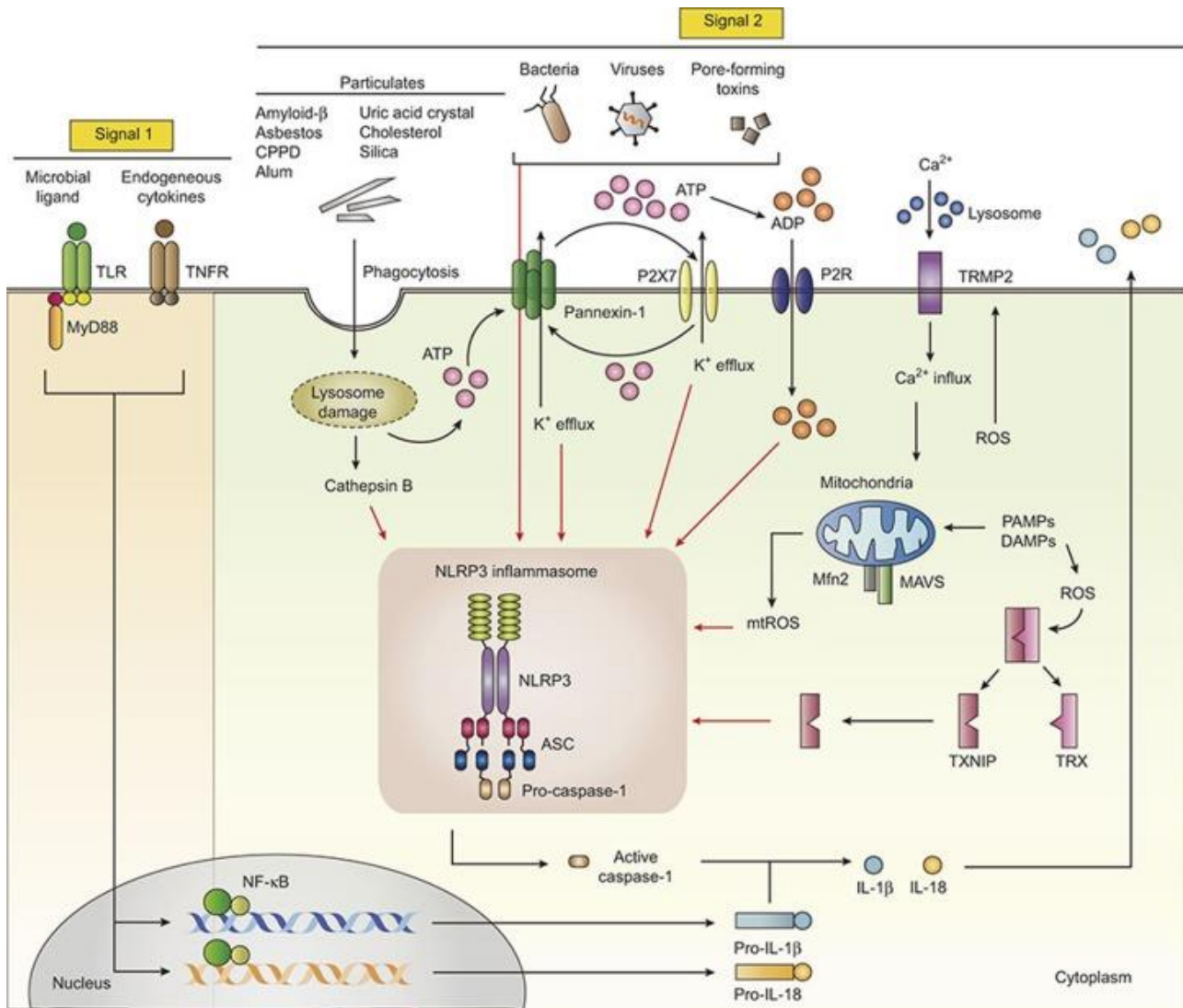


Figura 3 (revisão). Mecanismos de ativação de inflamassoma NLRP3. O 1º sinal de ativação ocorre quando PAMPs ou DAMPs são reconhecidos por TLRs ou citocinas como o TNF- α . Sinal 1 ativa NF- κ B, que no núcleo promove a transcrição de NLRP3, pró-IL-1 β , pró-IL-18, os quais após a tradução permanecem no citoplasma nas formas inativas. O 2º sinal ativa o inflamassoma NLRP3 formando um complexo juntamente com a ASC e pró-caspase-1. A formação desse complexo catalisa a conversão da pró-caspase-1 em caspase-1 ativa, que contribui para a produção de IL-1 β e IL-18 maduras. Os modelos propostos para ativação de inflamassoma NLRP3 são: 1) ATP extracelular induz o efluxo de K⁺ via receptor P2X7 e panexina-1, ativando inflamassoma; 2) partículas endógenas e exógenas como sílica, asbesto, alumínio e ácido úrico são fagocitadas e determinam a ruptura dos lisossomos, liberando catepsina B no meio intracelular, desencadeando a ativação do inflamassoma; 3) PAMPs e DAMPs ativam a geração de ROS ou de ROS mitocondrial, promovendo a ativação de inflamassoma; 4) Influxo de Ca²⁺ através de TRPM2 ativa inflamassoma por gerar ROS; 5) ROS é capaz de dissociar TXNIP de TRX. TXNIP liga-se no NLRP3 e ativa inflamassoma. (Shao B et al., 2015).

O inflamassoma NLRP3 também pode ser ativado por via não canônica, o que acontece através das caspase-11, 4 e 5 e resulta na liberação de IL-1 β e IL-18 (75). Sinalização de IFN I e ativação da cascata de sinal TLR4-TRIF são fatores requeridos para ativar a caspase-11 (76). Estudos mostraram que lipopolissacarídeo (LPS) citosólico é capaz de ativar o inflamassoma por essa via. TLR4 pode ser sensibilizado por LPS extracelular enquanto caspase-11 reconhece LPS citosólico. O LPS é capaz de se ligar diretamente na caspase-11 através do domínio CARD e desencadear a oligomerização e sinalização da caspase-11 (77,78). Monócitos humanos são capazes de produzir IL-1 β em resposta à ligação de LPS com TLRs, por exemplo. A ativação de inflamassoma nesse caso ocorre por um mecanismo autócrino. LPS induz a liberação de ATP endógeno o qual ativa o receptor P2X7, resultando em ativação de NLRP3 e liberação de IL-1 β (67,79). O processamento de pró-IL-1 β também pode ocorrer pela ativação da caspase-8. Quando há perda ou inibição de proteínas apoptóticas (XIAPs), há formação do complexo FADD, RIPK1 e caspase-8 que ativa RIP3, responsável por clivar pró-IL-1 β tanto pela caspase-1 quanto pela caspase-8 via NLRP3 (80). Estímulo com LPS e sinalização via TLR4-TRIF também ativa o complexo RIPK1, FADD e caspase-8 e NLRP3. Tanto ASC quanto caspase-1 são requeridas nesta ativação (81).

Outro inflamassoma que vem sendo alvo de estudos é o NLRP1. Esse receptor foi o primeiro a ser identificado e pode ser encontrado em monócitos, macrófagos, CDs, linfócitos B e T, granulócitos e neurônios. Em humanos, o NLRP1 é codificado por um único gene e contém domínios PYD, NACHT, LRR, FIIND e CARD enquanto que camundongos apresentam três genes polimórficos parálogos (Nalp1a, Nalp1b, Nalp1c). NLRP1 em humanos ativa a caspase-1 através da ligação do domínio PYD com ASC ou através da ligação direta do domínio CARD com a pró-caspase-1 (51,82). Embora NLRP1 possa ativar caspase-1 diretamente dispensando a necessidade de recrutar ASC, o recrutamento dessa proteína aumenta a eficiência da ativação da caspase-1 e Gatto, M., 2018

maior produção de IL-1 β (83,84). Além da caspase-1, NLRP1 também interage com caspase-5, contribuindo para a produção de IL-1 β em células humanas (51).

Estudos experimentais prévios mostram que NLRP1 pode ser ativado por LeTx (toxina letal de *Bacillus anthracis*) (84,85) ou quando há redução de ATP celular (86). Outro ativador de NLRP1 é o muramil dipeptídeo (MDP) também denominado peptideoglicano, que se encontra presente na parede celular de bactérias. O MDP liga-se ao domínio LRR de NALP1 levando a mudanças conformacionais e oligomerização do receptor e resulta na ativação da caspase-1 (83) (**Figura 4, revisão**). Além disso, NALP1 associa-se com o receptor NOD2 e forma um complexo capaz de ativar caspase-1 em resposta ao MDP. NOD2 promove o sinal 1, induzindo a síntese de pró-IL-1- β via NF- κ B e regula a ativação de caspase-1 por MDP através da interação direta com NALP1 (84).

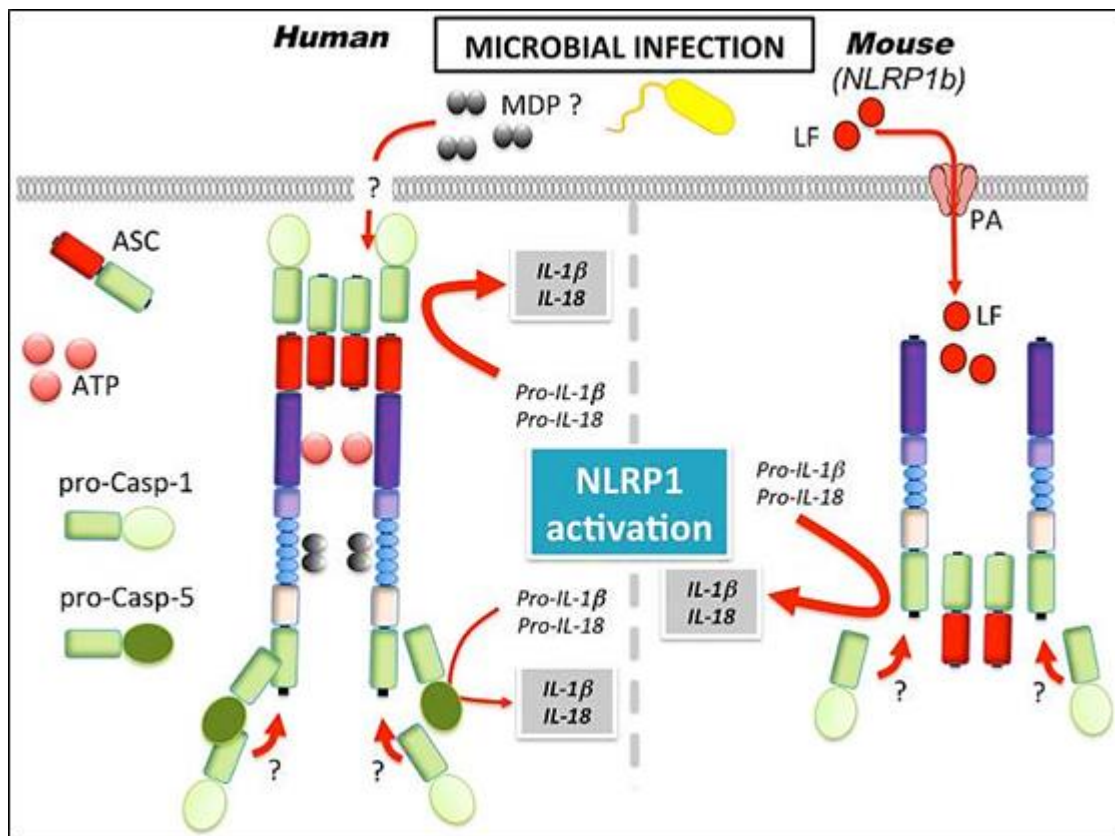


Figura 4 (revisão). Mecanismos de ativação de NLRP1. Em humanos, NLRP1 pode ativar caspase-1 pelo domínio PYD e ligação com ASC ou através da ligação direta do domínio CARD com CARD de prócaspase-1. NLRP1 também pode se ligar na caspase-5 pelo domínio CARD. Em camundongos, o NLRP1b é clivado pela toxina letal de *B. anthracis* e a ativação desse receptor recruta pró-caspase1 que se liga diretamente no domínio CARD de NLRP1b (Ratsimandresy RA et al, 2013).

O inflamassoma NLRC4 (IPAF) contém domínio CARD, o que lhe confere capacidade de ligar-se diretamente à caspase-1. Ele é ativado pela flagelina ou por sistemas de secreção do tipo III e IV (T3SS, T4SS) de bactérias (54,87). No entanto, a ativação deste inflamassoma em resposta a esses ligantes está relacionada com outra classe de receptores NLRs, os NAIPs (NLRBs, contém domínio BIR). Estudos mostram que NAIP5 e NAIP6 capazes de reconhecer flagelina e que NAIP2 reconhece T3SS; após o reconhecimento desses componentes bacterianos, os NAIPs se ligam ao sensor de inflamassoma NLRC4 e induzem sua ativação (54).

Um membro da família HIN-200, o AIM2, é um sensor citosólico para DNA de dupla fita (dsDNA) que induz a maturação de IL-1 β via caspase-1. Foi o primeiro membro da família não-NLR identificado que é capaz de ativar inflamassomas. No entanto, a oligomerização não ocorre pelo

domínio NACHT e sim através dos múltiplos sítios de dsDNA que ele contém. O reconhecimento do ligante causa sua auto-ativação através da porção C-terminal do domínio HIN-200. O inflamassoma AIM2 é formado pelo sensor, ASC e caspase-1. Ele contém um domínio PYD, o qual se liga a ASC, recruta a caspase-1 e leva à maturação de IL-1 β e IL-18 (88,89).

Inflamassomas e leishmanioses

Muitos autores vêm buscando um melhor entendimento dos inflamassomas em doenças infecciosas como as causadas por *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* (90–92). No entanto, além de fungos e bactérias, estudos com inflamassomas e doenças parasitárias também têm sido realizados. Infecção com *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em camundongos induz aumento da expressão dos genes *Asc*, *Casp1*, *Casp11*, *IL1r* e *IL18* nas células cardíacas sendo que a ativação de NLRP3 em macrófagos requer ASC para ativação de caspase-1 e produção de IL-1 β . A ativação de caspase-1 foi comprometida quando inibidores de NLRP3 foram usados, sugerindo que esse sensor é importante durante a infecção com *T. cruzi* (93). Camundongos *Nlrp3*^{-/-} e *casp1*^{-/-} infectados com *T. cruzi* exibiram baixo *clearence* dos parasitas por macrófagos e baixa produção de NO (94). Estudos com *Toxoplasma gondii* mostram que este parasita é capaz de ativar NLRP1. Camundongos *Nalp1*^{-/-} sucumbiram à infecção pelo *T. gondii* e apresentaram aumento de mortalidade e da carga parasitária (95). Esse parasita é capaz de ativar resposta inflamatória e produção de IL-1 β mediada por inflamassoma NALP1, o que contribui para diminuir a carga parasitária (96). Linhagem de células monocíticas cujo NALP1 foi silenciado por RNA de interferência indicou que esse receptor tem influência na morte celular e replicação parasitária (97).

Em relação às leishmanioses, o possível envolvimento dos inflamassomas na resposta imune tem sido mais estudado em modelos experimentais de leishmaniose cutânea. Infecção de

macrófagos murinos com *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* resulta em ativação da via NLRP3/caspase-1 e produção de IL-1 β (98,99). Ativação de inflamassoma NLRP3 limitou o crescimento intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos derivados de medula óssea por induzir a produção de NO. Neste estudo o mecanismo proposto para ativação de NLRP3 foi via ruptura lisossomal e liberação de catepsinas (98). No entanto, estudo realizado por Shio et al. (39) utilizando *Leishmania mexicana* e *L. major* mostrou resultados contrários; infecção de macrófagos murinos e células THP-1 inibiu a maturação de IL-1 β via inflamassoma NLRP3. Essa inibição resultou do efeito da metaloprotease gp63, um fator de virulência de *Leishmania*, que interfere em vias de sinalização responsáveis pela síntese de ROS e, como consequência, interfere na ativação de inflamassoma NLRP3. Ulcerações e aumento das lesões cutâneas em infecção experimental com *L. major* foram relacionadas com aumento da produção de IL-1 β via NLRP3 e recrutamento de neutrófilos para o local da lesão (100). No entanto, em outro estudo experimental, ausência de cura das lesões por *L. major* foi relacionada com desenvolvimento de resposta anti-inflamatória Th2, promovida pela ativação de inflamassoma NLRP3 e produção de IL-18 (34). A **figura 5 (revisão)** resume a ativação de inflamassoma NLRP3 em resposta à infecção por *Leishmania*.

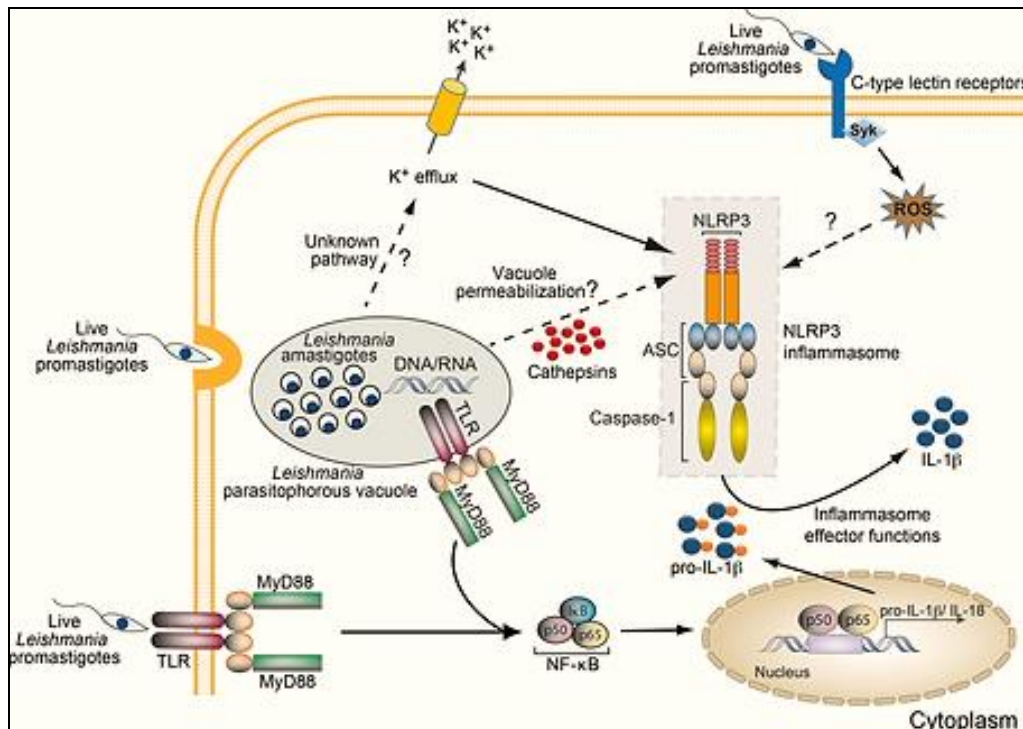


Figura 5 (revisão). Ativação de inflamassoma NLRP3 em resposta à infecção por *Leishmania*. Os parasitas são, no início da infecção, reconhecidas por TLRs presentes na membrana extracelular e nos endossomos. Sinalização de TLRs via MyD88 leva à ativação de MAPK e degradação de IκB, com consequente ativação de NF-κB. NF-κB e MAPK desencadeiam a transcrição de genes pró-inflamatórios incluindo componentes do inflamassoma e substratos como NRP3, pró-IL-1β e pró-IL-18. Por mecanismos desconhecidos, os parasitas intracelulares induzem efluxo de K⁺ e liberação de catepsinas B os quais ativam o inflamassoma NLRP3. Os parasitas também podem se ligar nas lectinas tipo C como dectina-1 e receptor de manose e induzir a geração de ROS dependente de Syk, também ativador de inflamassoma. Uma vez ativado, NLRP3 cliva e ativa caspase-1 que por sua vez cliva pró-IL-1β na sua forma madura (Zamboni & Lima-Junior, 2015).

NODsomas

Além dos NLRs ativadores de inflamassomas, receptores como os NODs também têm sido estudados. NOD1 e NOD2 da subfamília NLRC, são amplamente expressos em monócitos, macrófagos, CDs e células do intestino. Esses receptores apresentam domínio central (NBD), domínio LRR e domínio CARD (101,102). NOD1 contém um domínio CARD e reconhece principalmente ácido d-glutamil-meso-diaminopimérico (DAP), um dipeptídeo derivado de peptideoglicano de bactérias Gram-negativas. NOD2 contém dois domínios CARD e reconhece MDP (103,104). Após reconhecimento dos ligantes, domínio NACHT de NOD1 e NOD2 sofrem oligomerização e pelo domínio CARD recrutam a quinase RIPK2 (do inglês, *Receptor Interacting Protein 2*) através de interação homotípica CARD-CARD, formando o complexo multiproteico

NODsoma (52). O NODsoma ativa o complexo de quinases IKK ($IKK\alpha$, $IKK\beta$ e $NF-\kappa B$ – NEMO) resultando na translocação do fator de transcrição $NF-\kappa B$ e consequente transcrição de genes pró-inflamatórios e antimicrobianos (52,105,106). Estímulo de NOD1 e NOD2 também pode resultar na ativação da via de sinalização das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógeno – JNK, ERK e p38) (50) (Figura 6, revisão).

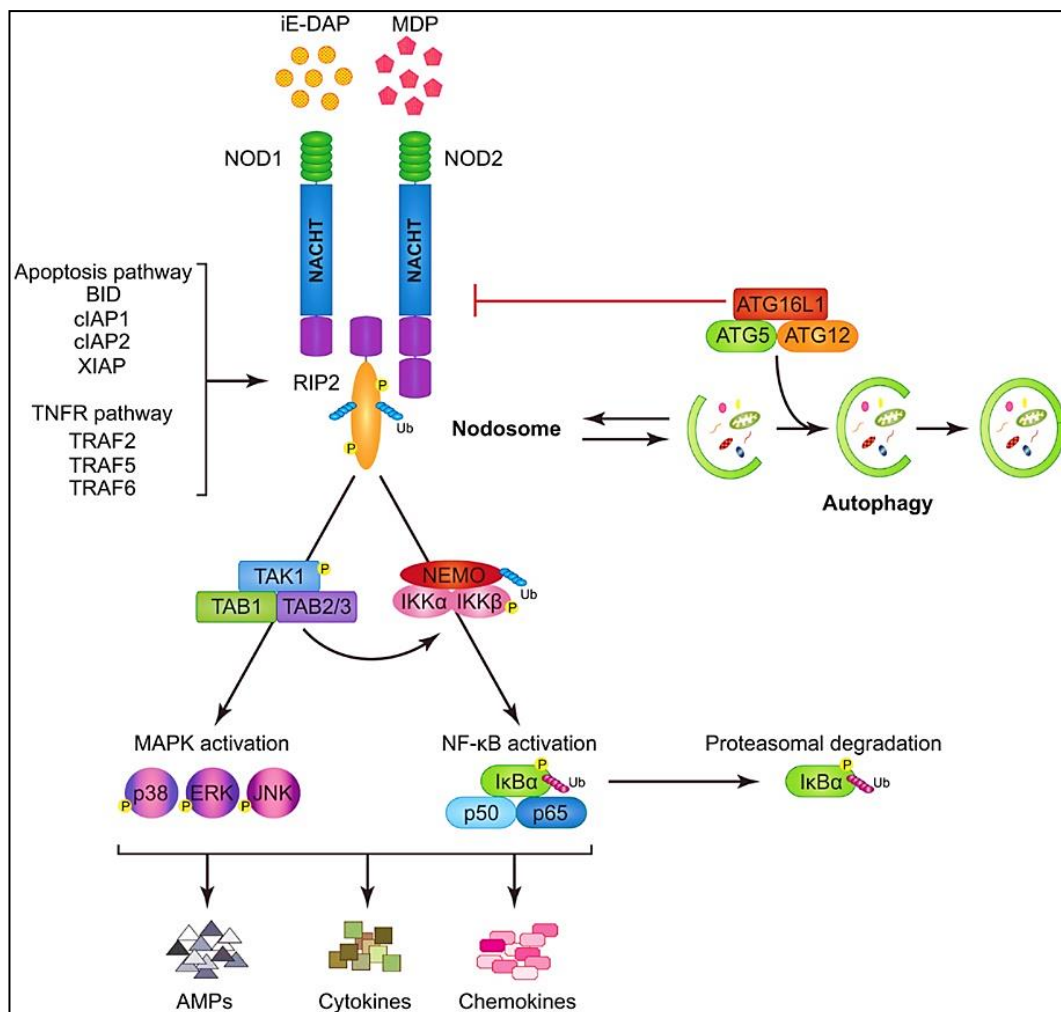


Figura 6 (revisão). Modelo de sinalização de NOD1 e NOD2. NOD1 e NOD2 reconhecem iE-DAP e MDP respectivamente. Após a sensibilização recrutam RIP2 e induzem sua fosforilação. Membros da família TRAF (TRAF2, 5 e 6), da família IAP (XIAP, cIAP1 e cIAP2) e da família BCL2 (BID) se ligam a RIP2 causando sua ativação. RIP2 ativado facilita a ubiquitinação de NEMO, levando a fosforilação e degradação de IκB, ativação do NF-κB e consequente transcrição de genes. Por outro lado, pode ocorrer ativação de MAPK (p38, ERK, JNK) e consequente ativação de NF-κB (Saxena & Yeretssian, 2014).

NOD1 e NOD2 parecem ter papel importante na indução da resposta imune adaptativa, aumentando a produção de citocinas por CDs e contribuindo para a diferenciação e ativação de células T (107,108). Agonistas desses receptores sinergizam com TLRs e aumentam a produção de citocinas inflamatórias (109,110). Como dito anteriormente, estímulo com MDP ativa NOD2, o qual associa-se com o receptor NLRP1 e ativa a caspase-1; o MDP também é capaz de ativar NLRP3 (84,111).

Em condições basais, a região LRR de NOD2 regula a ativação do domínio de ligação, o que previne oligomerização espontânea (83,112). A ativação do NODsoma também resulta em autofagia, um processo que recruta ATG16L e resulta em degradação lisossomal, contribuindo para a apresentação de antígeno por MHC II (113). Esse processo é regulado pela via apoptótica de proteínas (BID, XIAP, cIAPs) e pela sinalização via TNFR, através da ubiquitinação e fosforilação (50).

Estudo experimental com *Chlamydia spp* indicou que NOD1 e NOD2 são importantes para eliminar as bactérias e produzir NO (114). Por outro lado, estudo com *E. coli* mostrou que NOD2 está relacionado com aumento da inflamação intestinal (115).

Em relação aos parasitas, foi descrito que NOD2 é importante para a resistência contra infecção experimental com *T. gondii*. Animais *Nod2^{-/-}* apresentam defeito intrínseco em células T, as quais são incapazes de produzir IL-2 e desenvolver uma resposta imune Th1 eficiente, facilitando assim a permanência dos protozoários (116). Estudo experimental com *T. cruzi* revelou que NOD1 tem relação com resistência à infecção. Macrófagos de camundongos *Nod1^{-/-}* infectados apresentam alta carga parasitária, aumento da mortalidade e produção baixa de TNF- α , IL-12 e NO (117). Em relação às leishmanias foi demonstrado que infecção com *L. infantum* ativa NOD2-RIP2 em CDs e que essa ativação resulta no direcionamento de resposta Th1, aumentando a produção de IL-12 através de sinalização de MAPK. Animais *Nod2^{-/-} Rip2^{-/-}* exibiram baixa resposta

Th1 e carga parasitária mais elevada. Além disso, os autores mostraram que ativação de NOD2-RIP2 resulta na modulação de resposta Th17, pois camundongos *Nod2*^{-/-} *Rip2*^{-/-} mostraram aumento de T CD4⁺IL-17⁺ e da produção de IL-23 e diminuição de T CD4⁺IFN- γ ⁺ (118).

Em conjunto, os trabalhos citados mostram que em modelos experimentais de leishmaniose, em especial nas formas cutâneas, tanto os inflamassomas quanto os NODsomas contribuem para a resposta imune anti-parasitária, sendo importantes para a indução de uma resposta de tipo Th1 protetora contra o patógeno. No entanto, pouco tem sido investigado sobre o envolvimento dos NLRs e dos complexos citosólicos relacionados na evolução e no prognóstico/desfecho da leishmaniose visceral. Neste trabalho nos propomos a investigar este aspecto através de uma metodologia empregada no detalhamento dos processos biológicos denominada transcriptoma. Esta abordagem permite investigar a extensão da transcrição gênica em larga escala em diferentes modelos de interação, incluindo as interações patógeno-hospedeiro. Este assunto tem sido foco de revisões aprofundadas e recentes (119,120). Utilizamos esta abordagem para investigar o envolvimento de inflamassomas e NODsomas na interação inicial entre leishmania e células do hospedeiro vertebrado. Para isto empregamos células THP-1 (linhagem de monócitos humanos) infectadas *in vitro* com promastigotas de *L. infantum*.

Capítulo 2

Projeto executado

Objetivos

Objetivo geral

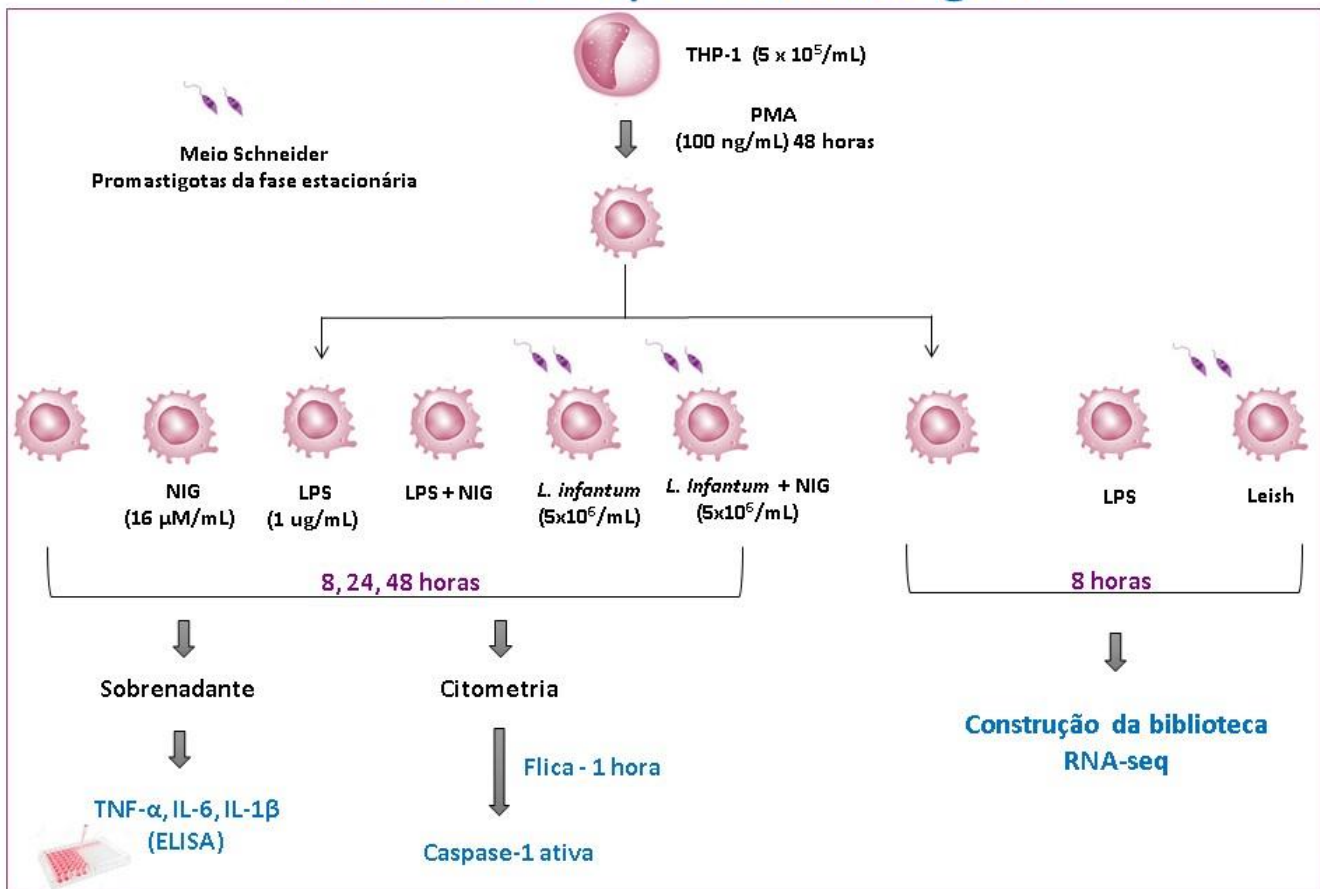
Para uma melhor compreensão dos mecanismos imunes envolvidos na leishmaniose visceral caracterizamos o perfil transcricional, com ênfase nos receptores NLRs e formação de inflamassoma ou NODsoma em células THP-1 infectadas com *Leishmania infantum*.

Objetivos específicos

- Definir se células THP-1 infectadas por *Leishmania infantum* produzem TNF- α , IL-6 e IL-1 β
- Investigar se a infecção de células THP-1 com *Leishmania* resulta em ativação de caspase-1
- Caracterizar o padrão global de expressão de genes de células THP-1 infectadas com *Leishmania infantum* e compará-lo com o padrão determinado por estimulação destas células com LPS.

Métodos

Protocolo experimental geral



Manutenção e diferenciação de células THP-1

As células THP-1 (linhagem celular humana derivada de leucemia monocítica aguda - ATCC®-TIB-202 - Manassas, VA, EUA) foram obtidas comercialmente e cultivadas em frascos de cultura estéreis de 25 cm² (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) com densidade de 10⁶ células/mL em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10% de soro fetal bovino inativado (Cripion Biotecnologia, Andradina, São Paulo, Brasil) e 1% de penicilina-estreptomicina (Life Technologies, Carlsband, CA, EUA). Frascos com as suspensões celulares foram mantidos em estufa a 37°C em tensão de 5% de CO₂, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias.

As células THP-1 foram distribuídas em placas de 24 poços (TPP, Lab-Tek Chamber Slide System, USA) na concentração de 5x10⁵/mL (1 ml por poço) em meio completo contendo RPMI-Gatto, M., 2018

1640 e 10% soro fetal bovino inativado. A viabilidade das células foi determinada utilizando-se o corante azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer, sendo que somente células viáveis foram utilizadas na contagem. Para a diferenciação das células THP-1 em macrófagos-like, foram acrescidos 100 ng/mL de PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) nas culturas durante 48 horas, 37°C, 5% de CO₂. Após estímulo com PMA, as células apresentaram características de macrófagos como alteração da morfologia celular e aderência em placa de cultura.

Cultivo de *Leishmania infantum*

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania infantum* (isolado HU-USF 14) gentilmente cedidas pelo Dr. João Santana Silva, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto–USP. As formas promastigotas foram mantidas em frascos de cultura estéreis de 25 cm² (Corning) contendo 5 mL de meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Cripion), 2% de urina humana masculina, 5% de estreptomicina-penicilina (Sigma) e 5% de L-glutamina (Life Technologies) a 25°C em estufa BOD (Biologic Oxygen Demand TE-381). Repiques dos parasitas no meio Schneider foram realizados a cada três dias. Parasitas até a 12^a passagem foram utilizados para a infecção in vitro. A virulência da *L. infantum* foi mantida por infecção in vivo em camundongos BALB/c.

Infecção das THP-1 com *Leishmania infantum*

Foram utilizadas para a infecção in vitro promastigotas de *L. infantum* da fase estacionária, obtidas no 5º dia da passagem. Após 48 horas de diferenciação das células THP-1 com PMA, os poços foram lavados com RPMI-1640 e as promastigotas foram adicionadas às culturas na concentração de 5x10⁶/mL (10 parasitas: 1 célula); estas culturas foram incubadas por 4 horas,

37°C e 5% de CO₂. Após esse período, os poços foram lavados com RPMI-1640 para remoção dos parasitas livres. Em seguida, a cultura foi acrescida de meio completo contendo RPMI-1640 e 10% soro fetal bovino inativado e incubada por 8, 24 e 48 horas, 37°C e 5% de CO₂. Para confirmar a infecção, lamínulas redondas de 10 mm foram adicionadas no fundo dos poços da placa de cultura e coradas com corante panótico (LabHouse, Belo Horizonte, MG, Brasil). A leitura das lamínulas foi realizada em microscópio óptico. O percentual de células infectadas nos três períodos testados variou de 80 - 89%.

Para estabelecer a melhor proporção entre células e parasitas para a infecção *in vitro*, foram testadas diferentes concentrações de *L. infantum* : 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20 célula: parasitas). Embora todas as concentrações testadas resultaram em células infectadas pela *L. infantum*, a proporção 1:10 (célula: parasitas) apresentou viabilidade de 83% após 48 horas de infecção e 89% de células infectadas.

Estímulo das células THP-1 com LPS e nigericina

Células não infectadas foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS ultrapuro (InvivoGen, San Diego, CA, USA) como controle positivo de ativação celular e também como *priming* de ativação de inflamassoma. Em alguns experimentos, células infectadas e não infectadas e células estimuladas com LPS foram desafiadas com 16 µM de nigericina (InvivoGen) por 1 hora ou com 1 nM de ATP por 15 minutos antes do término dos períodos avaliados, como estímulo de segundo sinal de ativação de inflamassomas. As culturas foram incubadas por 8, 24 e 48 horas, 37°C e 5% de CO₂.

Quantificação de TNF- α , IL-6 e IL-1 β

Foram quantificadas TNF- α , IL-6 e IL-1 β no sobrenadante das culturas infectadas com *L. infantum* ou estimuladas com LPS e/ou nigericina após 8, 24 e 48 horas. As dosagens das citocinas foram realizadas utilizando kits Quantikine and DuoSet Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Quantificação de caspase-1 ativa

A avaliação da presença de caspase-1 ativa foi realizada através do kit FAM-FLICA (ImmunoChemistry, Bloomington, MN, EUA). Células infectadas com *L. infantum*, infectadas e estimuladas com nigericina e células estimuladas com LPS e nigericina foram avaliadas quanto à ativação de caspase-1 após 8, 24 e 48 de infecção. As células THP-1 foram inicialmente retiradas da placa através da adição de solução de 1M de EDTA e PBS estéril e transferidas para tubos Falcon (BD). As células foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 10 μ L de reagente inibidor da caspase-1 (FAM-YVAD-FMK). Após incubação por 1 hora, 37°C e 5% de CO₂ as células foram lavadas duas vezes e analisadas através de citômetro de fluxo FACSCaliburTM (BD) pelo software CellQuest (BD). Aquisição foi realizada utilizando 20.000 eventos por amostra.

Construção da biblioteca de transcriptoma e RNA-seq

Avaliamos o perfil transcricional em períodos iniciais da infecção (após 8 horas) pois alguns genes, como os de inflamassomas, são transcritos rapidamente. Para avaliação do transcriptoma, RNA total foi extraído de células sem infecção, de células infectadas com *L. infantum* ou de células estimuladas com 1 μ g/mL de LPS após 8 horas de infecção, utilizando kit de extração de RNA total (*Total RNA Purification Kit* - Norgen Biotek, Thorold, ON, Canada) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA total foram determinadas em espectrofotômetro (*NanoDrop*,

Thermo Scientific, River Oaks Parkway, San Jose, CA) a partir dos valores de absorbância em 260 nm e foram expressos em ng/ μ l. Todas as amostras apresentaram relação 260/280 em torno de 2.0. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A qualidade do RNA foi determinada com auxílio do *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Em seguida as amostras foram submetidas ao protocolo de preparação das bibliotecas por meio do *SureSelect Strand-Specific RNA Library Preparation Kit* for Illumina Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies). O RNA poly (A) de todas as amostras foi inicialmente purificado por micropartículas e fragmentado. A seguir foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA seguida pela síntese e purificação da dupla fita de cDNA. Posteriormente, o cDNA foi adenilado, foram adicionados os adaptadores e então foi realizada a purificação das bibliotecas de cDNA por meio do kit *AMPure XP beads* (Beckmann Coulter, Fullerton, EUA). Em seguida foram adicionados os primers indexadores apropriados. Posteriormente foi realizada a purificação das bibliotecas por kit *AMPure XP beads* seguida da quantificação em RT q-PCR (7500 fast Real Time PCR Systems - Applied Biosystems) usando *Kit Kapa* de quantificação de biblioteca (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas foram preparadas com o kit *TruSeq RNA Sample Prep* Ki v.2 (RS-122-2001, Illumina, San Diego, EUA) conforme as instruções do fabricante. O pool de amostras foi preparado e submetido ao sequenciador *Illumina NextSeq 500* (Illumina) utilizando a flow Cell de 50 ciclos.

Bioinformática e análise bioestatística

As bibliotecas obtidas foram avaliadas com o programa *FastQC* (121). Com base nas informações obtidas, a limpeza foi feita pelo programa *Trimmomatic* v0.36 (122). As sequências foram então alinhadas com o programa *HISAT* (123) contra o genoma de *Leishmania infantum* (GCA_000002875.2) disponível no banco de dados do NCBI (124). As sequências alinhadas foram

removidas e as demais foram mapeadas com o programa *HISAT* (123) no genoma de *Homo sapiens* (GRCh38, gencode v24) disponível no banco de dados GENCODE (125). Em seguida os dados seguiram para a análise de expressão diferencial, de enriquecimento de vias e termos ontológicos.

A contagem de leituras para cada gene foi efetuada pelo programa *BEDTools intersect* v2.25.0 (126) usando os parâmetros default, com base nas anotações fornecidas junto ao genoma obtido. O teste de expressão diferencial foi feito no ambiente de análise estatística R (127) com o pacote *DESeq2* (128). Genes com *false discovery rate* (FDR) menores que 0.01 foram considerados diferencialmente expressos e separados em sobre/sub expressos com base no sinal do valor de *log2 fold change* fornecido pelo *DESeq2*.

A análise de enriquecimento de termos ontológicos (Gene Ontology - GOs) (129) e de vias presentes no banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - KEGG (130) foi feita pelo pacote R GAGE (131) e as visualizações de vias metabólicas enriquecidas foram feitas pelo pacote R Pathview (132). Termos e vias com FDR menores que 0.01 foram considerados significativos.

Análise estatística

Em relação aos outros métodos empregados no trabalho, dados simétricos entre grupos dependentes foram analisados por análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguido do teste Tukey de comparações múltiplas. As análises foram feitas pelo programa *GraphPad* (La Jolla, CA, EUA). O nível de significância foi fixado a 5% ou valor de p correspondente.

Resultados

Infecção de células THP-1 infectadas com *L. infantum*

Para validar o uso de células THP-1 diferenciadas em macrófagos como células-alvo de infecção por *L. infantum*, avaliamos a internalização 48 horas após a infecção dos parasitas testando diferentes proporções entre células e *Leishmania* (**Figura 1**). Todas as proporções células/parasitas testadas (1:1, 1:5, 1:10, 1:20) mostraram que as células foram capazes de internalizar os parasitas, principalmente nas proporções de 1:10 e 1:20, as quais resultaram em 89% e 94% de células infectadas, respectivamente. No entanto, a viabilidade celular da proporção 1:20 foi de 56% enquanto que na proporção 1:10 a viabilidade foi de 83%. Em função deste achado, optamos por realizar os ensaios com a proporção 1:10 que também é bastante empregada na literatura.

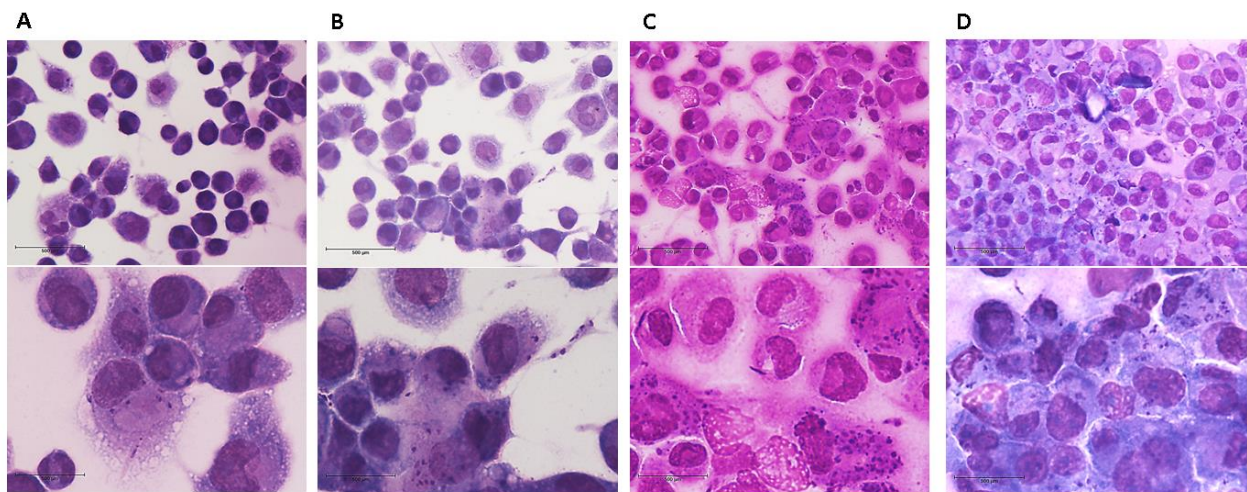


Figura 1. Internalização de *L. infantum* por células THP-1 diferenciadas em macrófagos: efeito de diferentes proporções entre células e parasitas. Os painéis superiores representam aumento de 400x e os inferiores aumento de 1000x. Proporção 1:1 (A), proporção 1:5 (B), proporção 1:10 (C) e proporção 1:20 (D).

Perfil de citocinas

Para verificarmos o perfil de citocinas pró-inflamatórias produzido por células THP-1 infectadas com *L. infantum* e/ou estimuladas com LPS e nigericina, avaliamos os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em sobrenadante de cultura após 8, 24 e 48 horas de infecção (**Figura 2**). Em relação ao TNF- α , foi observado que células estimuladas com LPS apresentaram produção significativamente maior ($p < 0.0001$) em relação às células sem estímulo (Cells), estimuladas com nigericina (NIG), estimuladas com LPS e nigericina (LPS+NIG), infectadas com *L. infantum* (L. inf) ou infectadas e estimuladas com nigericina (L. inf + NIG) em todos os períodos testados. Células estimuladas com LPS + NIG também produziram níveis significativamente maiores de TNF- α ($p < 0.0001$) em relação às células não estimuladas, NIG, infectadas com *L. infantum* ou infectadas + NIG nos momentos avaliados. A produção de TNF- α por células infectadas com *L. infantum* foi muito discreta e um leve aumento foi detectado nas células infectadas estimuladas com nigericina. Os níveis de TNF- α detectados não foram significativamente maiores que os detectados nas culturas controle (Cells) (**Figura 2A**).

Quanto à produção de IL-6 (**Figura 2B**) constatamos níveis significativamente elevados nas culturas estimuladas com LPS ou LPS + NIG ($p < 0.001$) em relação às demais condições nos três momentos avaliados. O estímulo com *L. infantum* ou *L. infantum* + NIG não determinou produção significativa de IL-6.

A produção de IL-1 β apresentada neste trabalho é baseada em resultados preliminares obtidos no início deste trabalho. A avaliação da produção dessa citocina foi feita em sobrenadante de cultura após 48 horas de infecção com *L. infantum*, nas mesmas condições das culturas deste trabalho. No entanto, nesses ensaios prévios, além da estimulação com LPS, as células foram estimuladas com ATP (1 nM/mL meia hora antes do término do período), que assim como a nigericina, é um indutor de segundo sinal de ativação de inflamassomas. Observamos que células

THP-1 infectadas com *L. infantum* não produzem IL-1 β após 48 horas de infecção, nem mesmo quando ATP foi adicionado. Foram encontrados níveis significativamente maiores de IL-1 β ($p < 0.05$) somente quando células foram estimuladas com LPS (**Figura 3**). A avaliação da IL-1 β nos ensaios de 8, 24 e 48 horas será realizada em breve, no entanto, baseado nos resultados prévios e em outros apresentados neste trabalho, acreditamos que o parasita não induz produção de IL-1 β nos diferentes períodos avaliados.

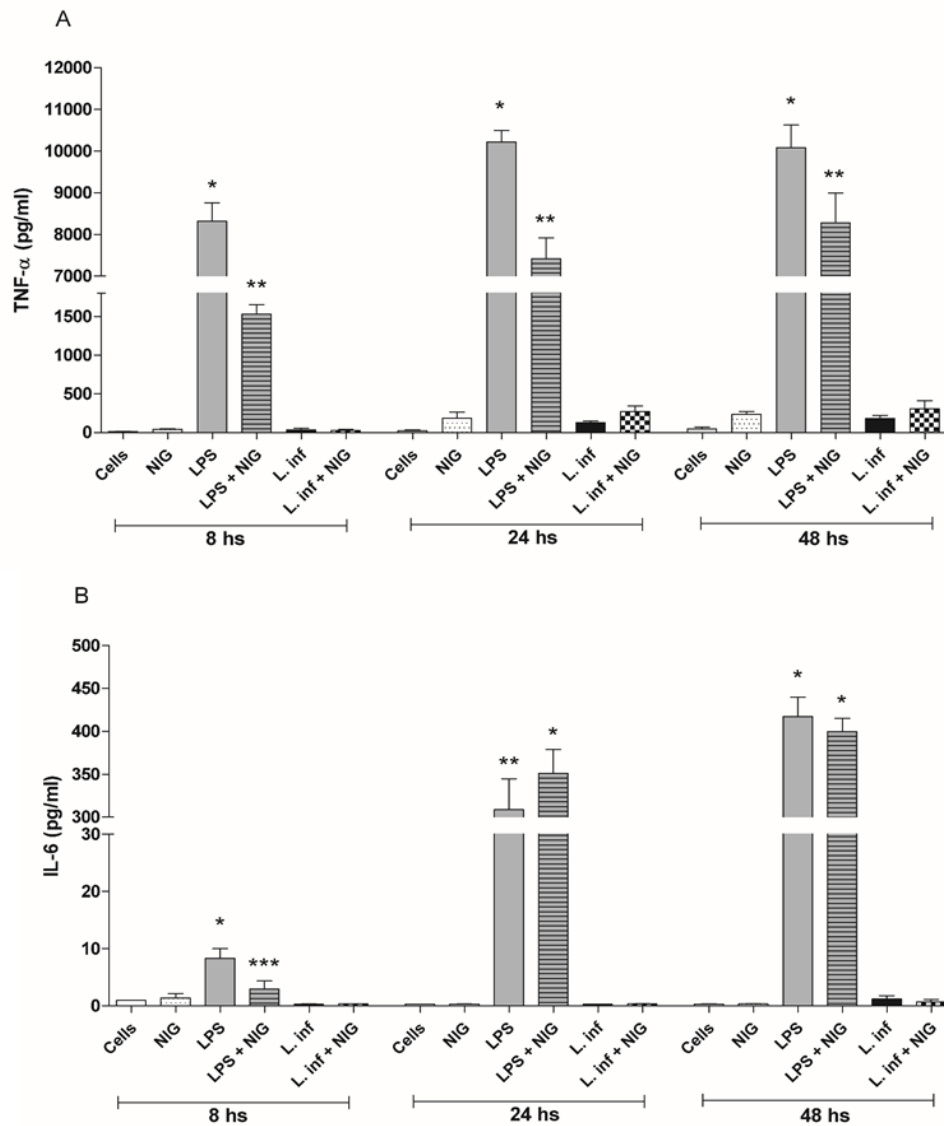


Figura 2. Produção de citocinas por células THP-1 cells infectadas com *L. infantum*. Células THP-1 previamente diferenciadas em macrófagos foram infectadas com *L. infantum* (1:10) e os níveis de TNF- α (A) e IL-6 (B) foram avaliados nos sobrenadantes das culturas após 8, 24 e 48 horas. Além da *L. infantum*, foram testados os seguintes estímulos: LPS (LPS), nigericina (NIG), LPS + nigericina (LPS+NIG) e *L. infantum* + nigericina (L. inf + NIG). Culturas foram estimuladas com nigericina por 1 hora antes do término dos períodos testados. Os resultados derivam de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados são expressos em média \pm SD. * LPS ou LPS+NIG vs. demais estímulos ($p < 0.05$); ** LPS vs. Cells, NIG, L. inf., L. inf. + NIG ($p < 0.05$); *** LPS+NIG vs. L. inf. e L. inf. + NIG ($p < 0.05$).

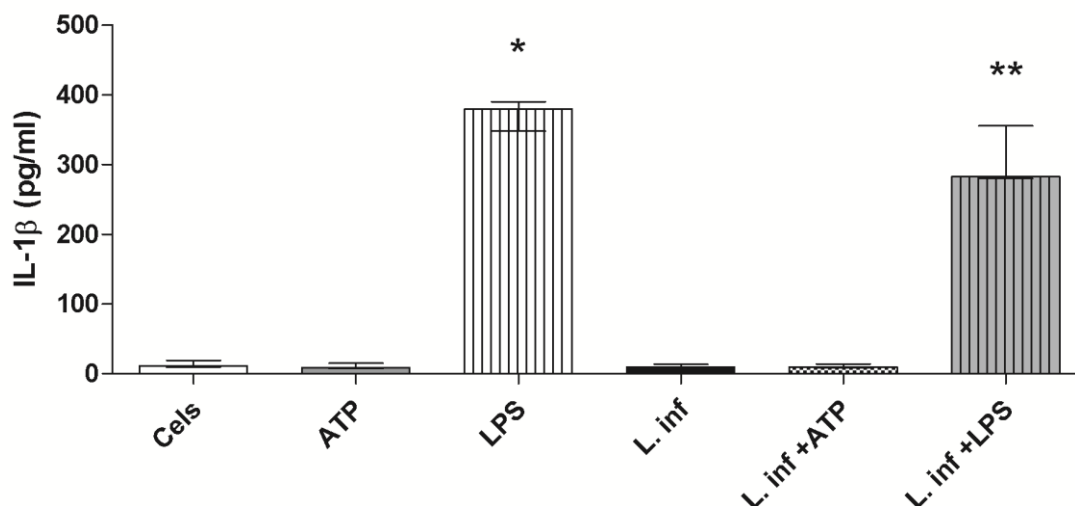


Figura 3. Produção de IL-1 β por células THP-1 cells infectadas com *L. infantum*. Células THP-1 previamente diferenciadas em macrófagos foram infectadas com *L. infantum* (1:10) e os níveis de IL-1 β foram avaliados nos sobrenadantes das culturas após 48 horas. Além da *L. infantum*, foram testados os seguintes estímulos: LPS, ATP, *L. infantum* + ATP e *L. infantum* + LPS. Culturas foram estimuladas com ATP por 30 minutos antes do término do período. Os resultados derivam de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados são expressos em média \pm SD. * $p < 0.05$ LPS vs. outros estímulos, ** $p < 0.05$ *Leishmania* + LPS vs. células, ATP, *Leishmania* e *Leishmania* + ATP.

Avaliação de caspase-1 ativa

Avaliamos se infecção com *L. infantum* ativa caspase-1 após 8, 24 e 48 horas de infecção.

Observamos que em todos os períodos avaliados, a porcentagem de células com caspase-1 ativa foi maior ($p < 0.01$) em células estimuladas com LPS e nigericina (LPS + NIG) em relação às células sem estímulo (Cells), infectadas (*L. inf.*) ou infectadas e estimuladas com nigericina (*L. inf.* + NIG) (**Figura 4A**). Este aumento é significativo, mas a porcentagem de células expressando caspase-1 ativa já é elevado nas células THP-1 não estimuladas. A infecção com *L. infantum* na ausência ou presença de nigericina não resultou em aumento do percentual de células expressando caspase-1 ativa (**Figura 4A**). Células estimuladas com LPS+NIG também apresentaram aumento significativo ($p < 0.001$) da MFI em relação às células não estimuladas, infectadas com *L. infantum* ou infectadas + NIG após 8 e 24 horas. Após 8 e 24 horas, células infectadas + NIG apresentaram MFI maior ($p < 0.001$) quando comparadas com células só infectadas ou com células não estimuladas (**Figura**

4B). O aumento da MFI nas culturas estimuladas com *L. infantum* + NIG se manteve após 48 horas mas não apresentou diferença significativa em relação às células estimuladas com LPS + NIG (Figura 4B).

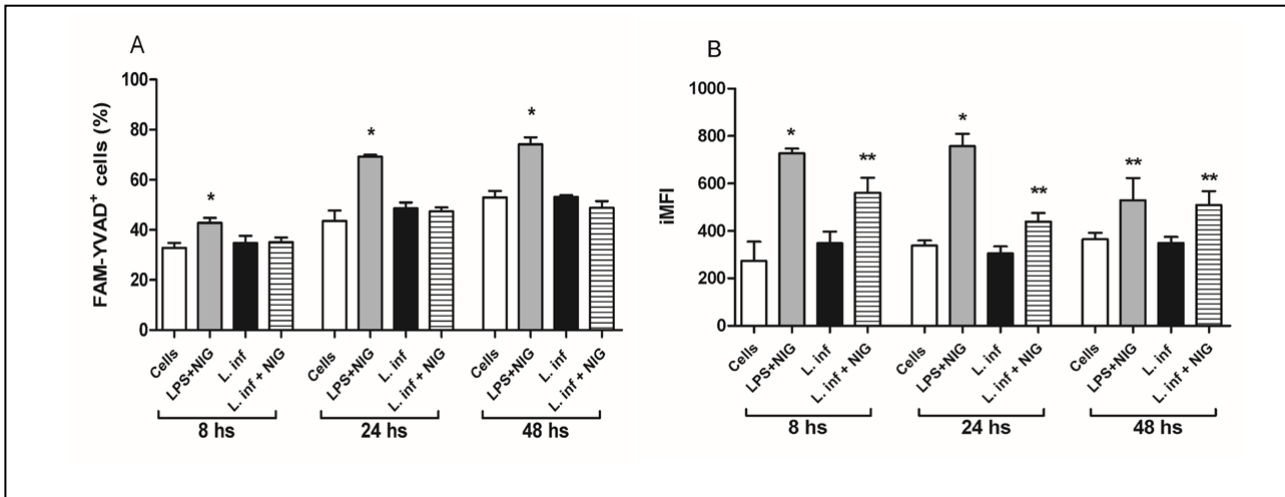


Figura 4. Avaliação de caspase-1 ativa em células THP-1 infectadas com *L. infantum*. Células THP-1 previamente diferenciadas em macrófagos foram infectadas com *L. infantum* (1:10) e a porcentagem de células expressando caspase-1 ativa (A) e a média de intensidade de fluorescência (MFI) (B) foram avaliadas após 8, 24 e 48 horas. Além da *Leishmania*, foram testados estímulos com LPS + nigericina (LPS+NIG) e *Leishmania* + nigericina (L.inf. + NIG). As culturas foram estimuladas com nigericina por 1 hora antes do término dos períodos testados. Os resultados derivam de três experimentos independentes realizados em triplicata. Resultados são expressos em média \pm DP. * LPS+NIG vs. demais estímulos ($p < 0.05$); ** L. inf. + NIG ou LPS + NIG vs. demais estímulos ($p < 0.05$).

Expressão global de transcritos em células THP-1 infectadas com *L. infantum* através da técnica de RNA-seq

Após avaliarmos a produção de citocinas e caspase-1 ativa em células THP-1 infectadas com *L. infantum* após 8, 24 e 48 horas, analisamos a expressão gênica (transcriptoma) após 8 horas de infecção com *L. infantum*. Esta etapa foi realizada com a finalidade de analisar a expressão de transcritos em momentos iniciais da infecção e analisar uma possível expressão diferencial de genes relacionados à resposta imune, principalmente aqueles envolvidos na sinalização de receptores NLRs, incluindo inflamassomas. Foi determinado o perfil global de transcritos em triplicatas de células sem estímulo (M1, M2, M3), células estimuladas com LPS (M4,

M5, M6) e células infectadas com *L. infantum* (M7, M8, M9) após 8 horas de infecção, pela técnica de RNA-seq. O sequenciamento gerou 10 milhões de leituras por amostra. As leituras foram alinhadas para genoma humano (GRCh38, gencode) contra genoma de *Leishmania infantum* (GCA_000002875.2, NCBI), sendo identificados 45.439 genes. Após a normalização dos valores da expressão gênica de todas as amostras por R-log, foi usado o método de distância Euclidiana para determinar clustering hierárquico (HC) nas amostras de células não estimuladas, células estimuladas com LPS e células infectadas com *L. infantum*. O heat map mostra a distância e similaridade entre as bibliotecas e de acordo com nossos resultados, as amostras foram clusterizadas em dois principais grupos; um cluster foi formado pela expressão de genes de células sem estímulo e células infectadas com *L. infantum*, mostrando que esses contrastes são similares entre si; e um outro cluster, formado pela expressão de genes de células estimuladas com LPS, as quais são mais distantes e menos similares que células infectadas e células sem estímulo. Esses dados estão ilustrados sob a forma de um heat map na **Figura 5A**. Os dados também foram avaliados por análise dos componentes principais (PCA), que permite verificar a diferença de expressão (%) entre os grupos (PCA1) e entre as amostras (PCA2). A PCA1 mostrou que células estimuladas com LPS apresentaram 80% de variação na expressão gênica em relação as células infectadas com *L. infantum* e células sem estímulo (PCA1); a PCA2 mostrou variação de no máximo 6% entre as amostras (**Figura 5B**). Esses dados revelam que 8 horas de infecção com *L. infantum* resulta em um padrão de expressão gênica similar ao de células THP-1 não estimuladas.

Expressão diferencial de genes em células THP-1 infectadas com *L. infantum*

Pelo pacote do DESeq2, genes com *false discovery rate* (FDR) < 0.01 e com valor *log2 fold change* (maior ou menor que 0 - $p < 0.05$) foram considerados diferencialmente expressos e separados em sobre e sub expressos. A expressão diferencial de genes mostrou que em células

infectadas com *L. infantum* houve aumento da expressão de 498 genes ($p < 0.01$, $FC > 0$) e diminuição da expressão de 92 genes ($p < 0.01$, $FC > 0$) em relação às células sem estímulo. Em contraste, DGE em células estimuladas com LPS, mostrou que 2640 genes foram sobre expressos ($p < 0.01$, $FC > 0$) e 1583 genes foram sub expressos em relação às células sem estímulo. A visualização da distribuição da expressão gênica de células infectadas com *L. infantum* ou estimuladas com LPS pode ser visualizada no MA-plot (**Figura 5C**). Esses dados mostram que células infectadas com *L. infantum* não apresentam grande variação da expressão gênica em relação às células sem estímulo, diferindo, portanto, do padrão de expressão encontrado em células estimuladas com LPS.

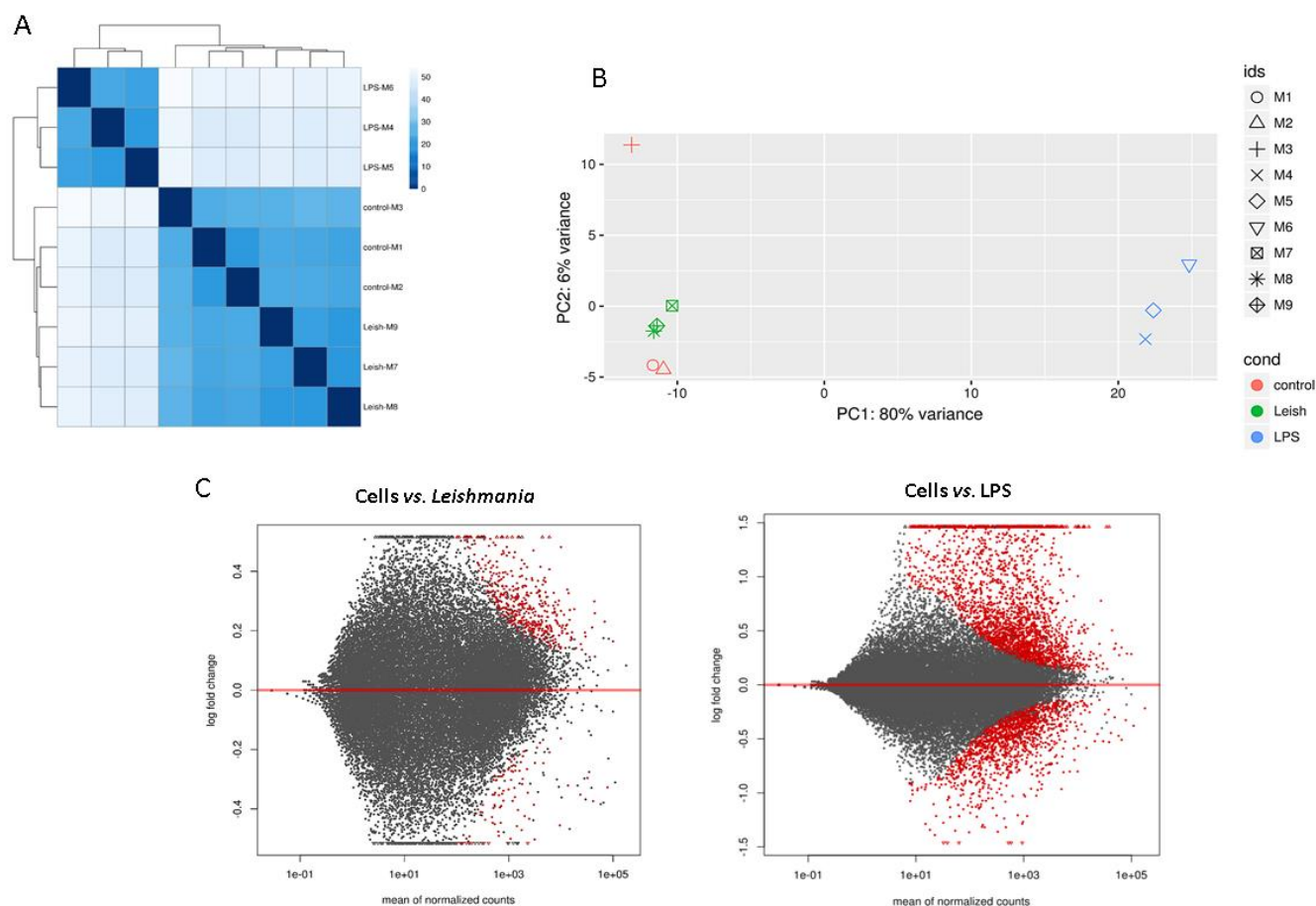


Figura 5. Padrões de expressão gênica em células THP-1 infectadas com *L. infantum* ou estimuladas com LPS. **A)** O heat map foi construído usando o método de distância Euclidiana e mostra a distância entre as amostras sendo que M1,M2,M3 são triplicatas de células, M3,M4,M5 são triplicatas de células infectadas com *L. infantum* e M7,M8,M9 são triplicatas de células estimuladas com LPS. **B)** A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada com os dados normalizados: PC1 (eixo x) mostra a diferença de expressão (%) entre os grupos e PC2 (eixo y) mostra a diferença de expressão (%) entre as amostras de cada grupo. **C)** O MA-plot mostra a distribuição dos coeficientes estimados da expressão gênica baseada no $\log_2\text{fold change}$ ($\text{FDR} < 0.01$) em células infectadas com *L. infantum* ou estimuladas com LPS em relação às células sem estímulo. O eixo x mostra a média de contagem normalizada por fator de tamanho e o eixo-y mostra a comparação por $\log_2\text{fold change}$ ($\log_2\text{FC}$). Cada gene é representado por um ponto. Genes em vermelho com valor de p ajustado (*False Discovery rate* - *FDR*) acima de 0 no eixo-y são genes sobre expressos e abaixo de 0 são genes sub expressos.

Análise de enriquecimento das categorias ontológicas dos genes diferencialmente expressos

Após a caracterização inicial da expressão gênica desencadeada pela infecção de células THP-1 com *L. infantum*, foi feita uma análise de enriquecimento ontológico (Gene Ontology – GO) dos genes diferencialmente expressos. Esta análise permitiu identificar processos biológicos (ênfatisados neste trabalho), funções moleculares e componentes celulares, associados com os genes sobre ou sub expressos em células THP-1 infectadas com *L. infantum* ou estimuladas com LPS em relação às células sem estímulo. A análise foi realizada utilizando-se o pacote R GAGE (131). Termos GOs enriquecidos (FDR<0.01) em genes sobre expressos foram resumidos e os termos redundantes foram removidos. Os resultados mostraram que células THP-1 infectadas com o parasita apresentaram 37 processos biológicos enriquecidos (FDR<0.01) em genes sobre expressos em comparação com células sem estímulo. Células estimuladas com LPS apresentaram 217 processos biológicos enriquecidos (FDR<0.01) em genes sobre expressos em relação às células sem estímulo.

Dos 37 processos biológicos enriquecidos em células infectadas, 12 também foram enriquecidos em células estimuladas com LPS; os outros 25 processos biológicos foram enriquecidos somente em células infectadas. Estes 25 processos podem ser resumidos em: adesão celular (*ACTG1, CTNNA1, PIK3R2, ACTB*), ativação de plaquetas (*ADAMTS1, FERMT3, ITGA, PRKCD, TIMP3, CD36*), regulação da cascata MAPK (*DUSP2, DUSP5, MAP3K11, ACTG1, PSMD3, DUSP7, ACTB*), regulação negativa de transporte (*MMP9, ANXA1, HMOX1, IER3, NEDD4L, IRAK1, IRS2, LGALS3*), regulação negativa da transcrição da RNA polimerase II (*ZBTB7B, NOTCH1, NOTCH2, SQSTM1, USP2*), coagulação (*CD36, FERMT3, PRKCD*) e resposta celular a estímulo hormonal (*ADCY8, IRS2, UCN2, PTGER4, ATP6V1H*). O gráfico interativo dos processos biológicos enriquecidos por genes sobre expressos em células infectadas e células estimuladas com LPS (**Figura 5**) foi feito usando o *REVIGO* e o software *Cytoscape* (133,134). Não foram detectados

Gatto, M., 2018

termos GO enriquecidos significativos ($FDR < 0.01$) nos genes sub expressos em células infectadas ou células estimuladas com LPS em relação às células sem estímulo. Os genes *ACTG1*, *ACTB*, *CD36*, *DUSP2*, *DUSP5*, *DUSP7* foram genes expressos em células infectadas, mas não em células estimuladas com LPS.

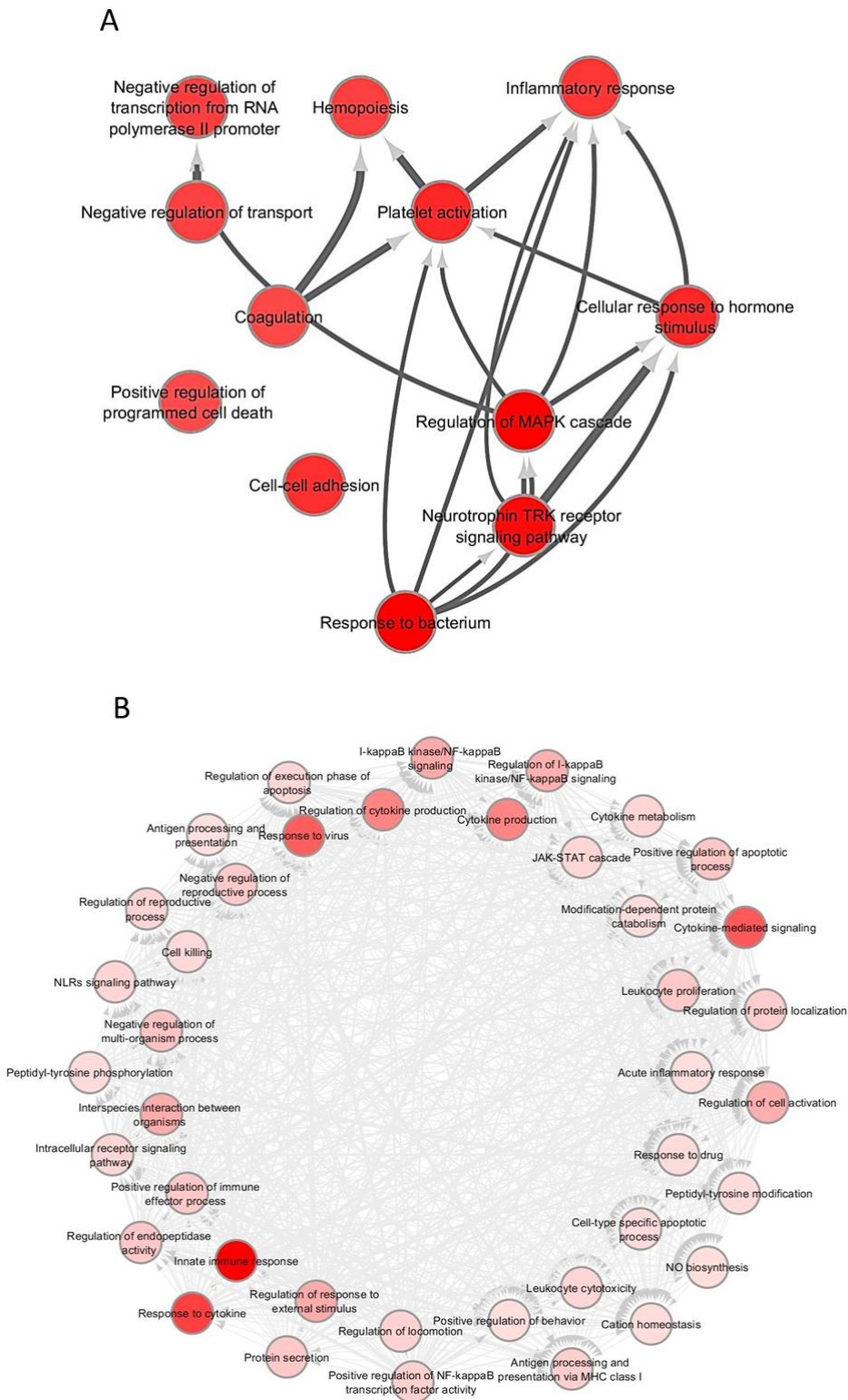
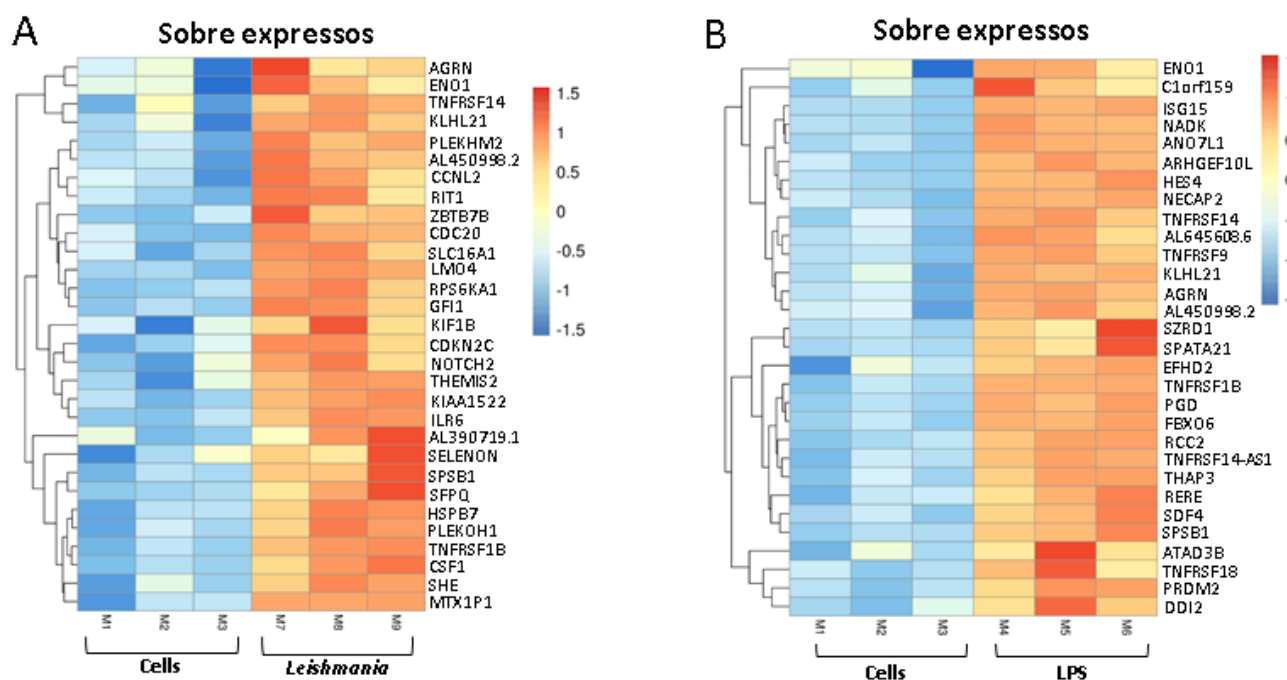


Figura 5. Análise de enriquecimento de processos biológicos em células THP-1 infectadas com *L. infantum* ou estimuladas com LPS. Análise dos processos biológicos enriquecidos (FDR<0.01) em genes sobre expressos em células infectadas com *L. infantum* (A) e células estimuladas com LPS (B) em relação às células sem estímulo após 8 horas. A cor das bolhas representa o p-valor e os termos GO altamente similares são ligados por linhas e a espessura das linhas indica o grau de semelhança (REVIGO).

Top 30 genes mais e menos expressos em células THP-1 infectadas com *L. infantum*

Análise pelo *DESeq2* permitiu a identificação dos 30 genes significativamente mais e menos expressos entre os contrastes. A **figura 7** mostra os 30 genes mais significativos sobre expressos e a **figura 8** mostra os 30 genes mais significativos sub expressos em infecção com *L. infantum* e em células estimuladas com LPS em relação às células sem estímulo. O *Reactome* (135) foi utilizado para determinar a via funcional na qual estes genes estão envolvidos. Infecção com *L. infantum* aumentou a expressão de genes relacionados com ciclo celular (*CDC20*, *CDKN2C*), resposta celular a estímulo externo (*RPS6KA1*, *CDKN2C*), expressão de genes (*NOTCH2*), hemostasia (*KIF1B*, *SLC16A1*) e transporte (*SLC16A1*, *KIF1B*). Os genes mais expressos do top 30 relacionados ao sistema imune após infecção com *L. infantum* foram *CDC20*, *RPS6KA1* e *CSF1*, os quais são relacionados com ubiquitinação e degradação por proteassoma na via de processamento de antígeno de MHC classe I (*CDC20*); cascata de receptores TLRs (*RPS6KA1*) e sinalização de IL-10 (*CSF1*). O gene *CDC20* foi expresso somente por células infectadas. (**Figura 7**). Em relação aos 30 genes sub expressos por *L. infantum* em relação às células sem estímulo, verificamos genes ligados à expressão gênica ou metabolismo de RNA (*ARID4B*, *HNRNPR*, *WDR3*, *SF3A3*), organização de matriz extracelular (*BCAN*), metabolismo (*UCK2*, *BCAN*, *EEF1B2*), entre outros. Entre os genes sub expressos, foram identificados dois genes (*GBP1* e *ACKR3*) ligados à resposta imune, os quais são relacionados com a sinalização do IFN e sinalização de quimiocinas (**Figura 8**). Também foram identificados os 30 genes mais e menos expressos em células estimuladas com LPS em relação às células sem estímulo (**Figura 7 e 8**).



Biologic process	Gene
Cellular cycle	CDC20, CDKN2C
Cellular response to external stimulus	RPS6KA1, CDKN2C
Extracellular matrix organization	AGRN
Gene expression	NOTCH2
Developmental biology	AGRN, RPS6KA1
Immune system	TNFRSF14, TNFRSF1B, KLHL21, CDC20, RPS6KA1, SPSB1, CSF1
Hemostasis	KIF1B, SLC16A1
Metabolism	ENO1, AGRN, SLC16A1, CCNL2
Metabolism of proteins	KLHL21, CSF1, CDC20, SPSB1
Signal transduction	SFPQ, RPS6KA1, CDC20, NOTCH2, RIT1, AGRN
Transport	SLC16A1, KIF1B

Biologic process	Gene
Cellular cycle	RCC2
Developmental biology	AGRN
Extracellular matrix organization	AGRN
DNA repair	ISG15
Metabolism	ENO1, NADK, AGRN, PGD
Signal transduction	ARHGEF10L, RCC2, AGRN
Immune system	TNFRSF14, TNFRSF9, TNFRSF1B, TNFRSF18, ISG15, KLHL21, FBOX6, SPSB1, ATAD3B
Transport	DDI2, NECAP2

Figura 7. O heat map mostra os 30 genes mais significativos sobre expressos em células infectadas com *L. infantum* (A) e os 30 genes mais significativos sobre expressos em células estimuladas com LPS (B) em relação às células sem estímulo após 8 horas. A matriz foi construída pelo DESeq2 baseada no log_2 fold-change ($FC < 0$).

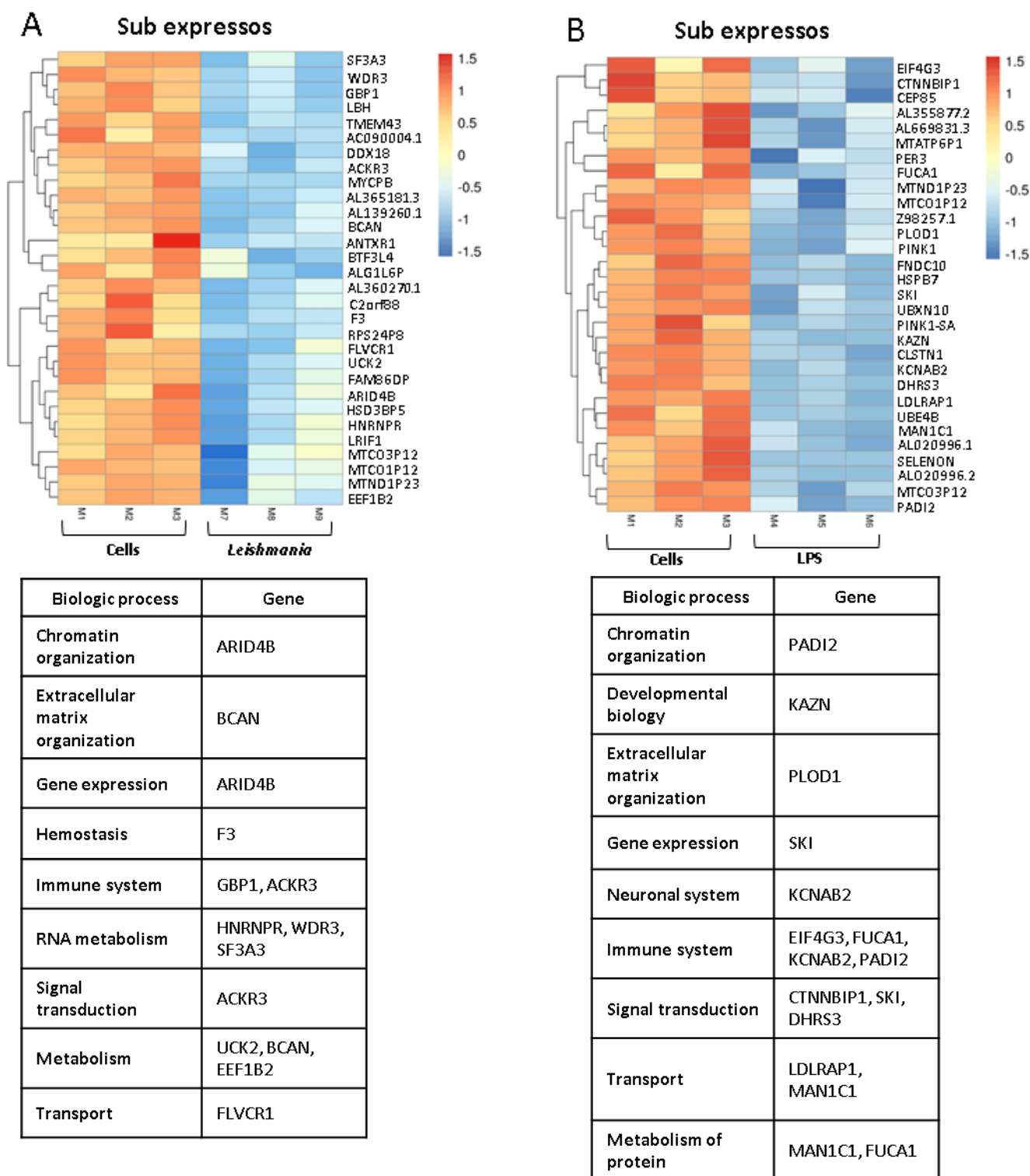


Figura 8. O heat map mostra os 30 genes mais significativos sub expressos em células infectadas com *L. infantum* (A) e os 30 genes mais significativos sub expressos em células estimuladas com LPS (B) em relação às células sem estímulo após 8 horas. A matriz foi construída pelo DESeq2 baseada no $\log_2\text{fold-change}$ (FC<0).

***L. infantum* compromete a expressão de genes associados com a resposta imune e com os receptores NLRs**

Após a análise dos genes diferencialmente expressos (sobre e sub expressos) por células infectadas ou estimuladas com LPS em relação aos controles (células sem estímulo), também foram identificados os genes envolvidos com resposta imune (135). Em relação às células infectadas com *L. infantum* dos 498 genes sobre expressos, 98 deles foram relacionados com resposta imunológica e dos 92 genes sub expressos, 10 foram relacionados à resposta imune. Em relação às células estimuladas com LPS; dos 2640 genes sobre expressos e dos 1583 genes sub expressos, 498 e 173 genes se relacionam com resposta imunológica, respectivamente. As vias imunológicas e o número de genes correspondentes a cada uma delas, estão demonstrados nas **Tabelas 1 e 2.**

Tabela 1. Identificação das vias imunológicas nas quais participaram genes sub e sobre expressos em células THP-1 infectadas com *L. infantum*.

GENES SUB EXPRESSOS (10 GENES)		
Adaptative immune system	p-value ranges	Genes
<i>MHC I mediated antigen processing and presentation</i>		
Antigen processing: folding, assembly and peptide loading of MHC I	1,0e-04	1
Innate immune system		
Neutrophil degranulation	4,28e-06 – 1,9e-04	5
<i>Cytokine signaling</i>		
IFN- α , β and γ signaling	5.56e-07	1
Interleukin-1 signaling	1,94e-04	1
Interleukin-4 and 13 signaling	1,27e-05 – 1,94e-04	2
Interleukin-10 signaling	1,27e-05	1
GENES SOBRE EXPRESSOS (98 GENES)		
Adaptative immune system	p-value ranges	Genes
TCR signaling	2,52e-04	1
Costimulation by the CD28 family	9,43e-05	1
Signaling by the B cell receptor (BCR)	1,27e05 - 4,46e-04	3
<i>MHC I mediated antigen processing and presentation</i>		
Antigen processing: ubiquitination and proteasome degradation	4,68e-09 - 2,52e-04	7
Antigen processing: folding, assembly and peptide loading of MHC I	1,5e-04	1
Antigen processing – cross presentation	7,29e-10 - 2,52e-04	5
MHC II antigen presentation	2,88e-20 - 1,97e-04	6
Immunoregulatory interactions between lymphoid and non-lymphoid cell	2,64e-11 - 3,78e-04	6
Innate immune system		
Toll-like (TLRs) receptors cascade	2,88e-20 - 3,78e-04	9
Complement cascade	2,02e-10 - 5,55e-05	3
NLRs signaling pathways	3,12e-11 - 5,15e-10	2
Advanced glycolisation endproduct receptor signaling	4,96e-05	1
DDX58/IFIH1-meadiated induction of IFN- α / β	7,44e-17 - 4,39e-06	3
Cytosolic sensors of pathogen-associated DNA	7,44e-17 - 7,53e-06	2
Fc γ receptor (FCGR) dependent phagocytosis	7,44e-17 - 3,97e-04	7
Fc ϵ receptor (FCERI) signaling	2,52e-04	1
<i>C-type lectin receptors (CLRs)</i>		
CLEC7A (Dectin-1) signaling	4,18e-06 - 2,52e-04	2
Neutrophil degranulation	3,76e-25 – 3,96e-04	42
ROS, RNS production in phagocytes	2,02e-10 - 1,55e-04	3
Cytokine signaling		
IFN- α , β and γ signaling	7,44e-17 - 2,85e-04	8
Interleukin-1 family signaling (IL-1, IL-36, IL-38)	4,52e-17 - 2,52e-04	6
Interleukin-5, 3 and GM-CSF signaling	1,05e-09	1
Interleukin-4 and 13 signaling	2,48e-28 - 3,78e-04	14
Interleukin-7 signaling	2,39e-08	1
Interleukin-10 signaling	2,72e-24 - 6,35e-05	5
Interleukin-12 signaling	4,79e-05	1
Interleukin-17 signaling	3,12e-11 - 1,66e-05	3
TNFR2 non-canonical NF- κ B pathways	2,72e-24 – 2,52e-04	4

Tabela 2. Identificação das vias imunológicas nas quais participaram genes sub e sobre expressos em células THP-1 estimuladas com LPS.

GENES SUB EXPRESSOS (173 GENES)		
Adaptative immune system	p-value ranges	Genes
TCR signaling	1,43e-13 – 7,21e-04	7
Costimulation by the CD28 family	1,93e-07 – 1,11e-03	6
Signaling by the B cell receptor (BCR)	1,08e-14 – 4,41e-04	11
MHC I mediated antigen processing and presentation		
Antigen processing: ubiquitination and proteasome degradation	1,70e-56 – 1,43e-03	16
Antigen processing: folding, assembly and peptide loading of MHC I	4,61e-08 – 7,37e-05	3
Antigen processing – cross presentation	3,86e-24 – 5,14e-04	5
MHC II antigen presentation	1,40e-11 – 1,64e-03	14
Immunoregulatory interactions between lymphoid and non-lymphoid cell	4,09e-14 – 1,19e-04	8
Rap1 signaling	9,90e-07 – 5,33e-04	3
Innate immune system		
Toll-like (TLRs) receptors cascade	5,70e-32 – 8,65e-05	18
Complement cascade	1,19e-04 – 1,09e-03	2
NLRs signaling pathways	5,65e-12 – 5,05e-05	4
Advanced glycolisation endproduct receptor signaling	2,11e-12 – 5,45e-05	4
DDX58/IFIH1-meadiated induction of IFN- α / β	2,11e-12 – 6,17e-04	4
Cytosolic sensors of pathogen-associated DNA	2,11e-12 - 2,64e-05	2
Fc γ receptor (FCGR) dependent phagocytosis	9,23e-32 – 8,37e-04	16
Fc ϵ receptor (FCERI) signaling	1,43e-13 – 4,41e-04	15
C-type lectin receptors (CLRs)		
CLEC7A (Dectin-1) signaling	6,27e-12 – 4,41e-04	5
Dectin-2 family	1,72e-11	1
CD209 (DC-SIGN) signaling	2,27e-06 – 1,57e-04	4
Antimicrobial peptides	9,60e-20 – 2,42e-11	2
Neutrophil degranulation	9,58e-54 – 5,05e-03	57
ROS, RNS production in phagocytes	9,60e-20 – 1,66e-03	5
Cytokine signaling		
IFN- α , β and γ signaling	1,42e-27 – 5,45e-05	13
Interleukin-1 family signaling		
Interleukin-1 signaling	2,11e-12 – 3,13e-06	3
Interleukin-18 signaling	3,83e-18 – 5,09e-07	2
Interleukin-37 signaling	7,28e-12 – 5,09e-07	4
Interleukin-2 family signaling		
Interleukin-2 signaling	2,99e-23 – 4,39e-04	4
Interleukin-15 signaling	4,39e-04	1
Interleukin-3, 5 and GM-CSF	2,99e-23 – 4,39e-04	5
Interleukin-4 and 13 signaling	5,21e-26 – 1,44e-03	14
Interleukin-7 signaling	3,33e-06	1
Interleukin-10 signaling	1,50e-04	1
Interleukin-12 signaling	7,13e-06 – 1,39e-03	6
Interleukin-17 signaling	5,70e-32 – 8,65e-05	10
TNFR2 non-canonical NF- κ B pathways	1,07e-18 – 1,40e-11	2
GENES SOBRE EXPRESSOS (498 GENES)		
Adaptative immune system	p-value ranges	Genes
TCR signaling	0e-0 – 1,37e-03	36
Costimulation by the CD28 family	9,02e-243 – 9,11e-04	16
Signaling by the B cell receptor (BCR)	0e-0 - 1,02e-03	39

Adaptative immune system	p-value ranges	Genes
MHC I mediated antigen processing and presentation		
Antigen processing: ubiquitination and proteasome degradation	0e-0 – 1,17e-03	73
Antigen processing: folding, assembly and peptide loading of MHC I	0e-0 – 3,30e-04	13
Antigen processing – cross presentation	0e-0 – 1,08e-03	47
MHC II antigen presentation	2,04e-82 – 2,30e-04	12
Immunoregulatory interactions between lymphoid and non-lymphoid cell	3,76e-204 – 1,78e-03	29
Rap1 signaling	1,33e-11 – 3,95e-04	2
Innate immune system		
Toll-like (TLRs) receptors cascade	9,48e-264 – 1,02e-03	56
Complement cascade	4,38e-62 – 8,67e-04	10
NLRs signaling pathways	0e-0 – 9,98e-04	28
Advanced glycosylation endproduct receptor signaling	5,12E-15	1
DDX58/IFIH1-mediated induction of IFN- α / β	0e-0 – 5,16e-04	37
Cytosolic sensors of pathogen-associated DNA	1,69e-275 – 1,29e-04	23
Fc γ receptor (FCGR) dependent phagocytosis	9,01e-243 – 7,61e-04	16
Fc ϵ receptor (FCER1) signaling	0e-0 – 1,02e-03	36
C-type lectin receptors (CLRs)		
CLEC7A (Dectin-1) signaling	0e-0 – 1,02e-03	39
Dectin-2 family	1,26e-147 – 4,34e-16	2
CD209 (DC-SIGN) signaling	1,26e-147 – 1,29e-04	4
Antimicrobial peptides	6,41e-55 – 4,93e-05	4
Neutrophil degranulation	0e-0 – 1,79e-03	118
ROS, RNS production in phagocytes	3,66e-246 – 7,03e-05	7
Cytokine signaling		
IFN- α , β signaling	0e-0 – 1,25e-05	44
IFN- γ signaling	0e-0 – 1,79e-03	52
Interleukin-1 family signaling		
Interleukin-1 processing	0e-0 – 1,29e-04	7
Interleukin-1 signaling	0e-0 – 9,98e-04	44
Interleukin-18 signaling	5,64e-59 - 9,04e-16	2
Interleukin-33 signaling	5,12e-08 – 2,05 - 05	2
Interleukin-36 signaling	1,95e-47 – 5,12e-08	2
Interleukin-37 signaling	8,97e-66 – 1,48e-05	7
Interleukin-38 signaling	1,95E-47	1
Interleukin-2 family signaling		
Interleukin-2 signaling	2,04e-77 – 1,25e-05	3
Interleukin-9 signaling	1,25e-05	1
Interleukin-15 signaling	1,45e-167 – 1,25e-05	6
Interleukin-21 signaling	0e-0 – 1,25e-05	5
Interleukin-3, 5 and GM-CSF	6,74e-164 – 5,24e-04	16
Interleukin-4 and 13 signaling	0e-0 – 1,14e-03	41
Interleukin-6 signaling	0e-0 – 1,25e-05	12
Interleukin-7 signaling	2,04e-77 – 5,24e-04	9
Interleukin-10 signaling	0e-0 – 1,79e-03	33
Interleukin-12 family signaling		
Interleukin-12 signaling	0e-0 – 1,14e-03	21
Interleukin-23 signaling	6,74e-164 – 3,98e-04	7
Interleukin-27 signaling	0e-0 – 1,25e-05	7
Interleukin-35 signaling	0e-0 – 1,25e-05	7
Interleukin-17 signaling	1,11e-87 – 1,02e-03	20
TNFR2 non-canonical NF- κ B pathways	0e-0 – 1,02e-03	38

Em relação aos NLRs, os resultados obtidos mostraram que após 8 horas de infecção com *L. infantum* ocorre aumento da expressão de dois genes relacionados à sinalização dos NLRs (*TNFAIP3* e *IRAK1*), ambos presentes na via sinalizadora de NOD1 e NOD2 e de quatro genes relacionados com a sinalização de IL-1 (*PSMD3*, *IRAK1*, *SQSTM1* e *IL1RN*) (**Tabela 3**). Comparativamente, estímulo com LPS resultou em aumento da expressão de 28 genes relacionados aos NLRs, incluindo inflamassomas, e 7 genes ligados ao processamento da IL-1 β (**Tabela 3**). Esta tabela mostra os genes sobre e sub expressos relacionados à sinalização de NLRs e inflamassomas em células infectadas com *L. infantum* ou estimuladas com LPS em comparação com células sem estímulo.

Tabela 3. Expressão de genes mais e menos expressos relacionados com a via dos NLRs em células THP-1 infectadas com *L. infantum* ou estimuladas com LPS.

Genes sobre expressos <i>L. infantum</i> vs. células		
Gene	p-value	FC (fold-change)
<i>NOD1/NOD2 signaling</i>		
IRAK1	3,12e-11	0,29
TNFAIP3	5,15e-10	0,35
<i>Sinalização IL-1</i>		
PSMD3, IRAK1, SQSTM1, IL1RN	4,52e-17 – 2,52e-04	0,32 – 0,19
Genes sobre expressos LPS vs. células		
Gene	p-value	FC (fold-change)
<i>NOD1/NOD2 signaling</i>		
TNFAIP3, TAB3, IRAK2, IKKKG, RIPK2, UBC, RPS27A, BIRC3, BIRC2, CASP1, NOD2, NOD1, MAPK11, CASP4, CASP8, CYLD	1,01e-288 – 9,98e-04	2,21 - 0,24
<i>NLRP3 inflammasome</i>		
NLRP3, CASP1, TXN, TXNIP, PANX1, P2RX4, P2RX7, MEFV, HSP90AB1, CASP8,	3,86e-78 – 1,40e-07	2,89 – 0,41
<i>NLRP1 inflammasome</i>		
NLRP3, BCL2	1,95e-54, 5,67e-06	0,97 – 0,38
<i>IPAF inflammasome</i>		
CASP1	8,97e-66	2,17
<i>AIM2 inflammasome</i>		
AIM2, CASP1	4,97e-70, 8,97e-66	3,30 – 2,17
<i>IL-1 processing</i>		
REL, RELA, NFKB1, NFKB2, CASP1, IL1B, IL1A	0e-0 – 1,29e-04	2,17 – 0,23
<i>Others NLRs</i>		
NLRC5, CIITA	1,54e-133, 8,80e-04	1,55 – 0,55
Genes sub expressos LPS vs. células		
Gene	p-value	FC (fold-change)
<i>NOD1/NOD2 signaling</i>		
CASP2, MAPK13	5,65e-12, 5,05e-05	-0,61 - -0,32
<i>NLRP3 inflammasome</i>		
PSTPIP1, SLC29A1	1,76e-07, 3,00e-10	-0,45 – 0,69

Pelo R pathview (132) foi realizada a análise de enriquecimento de GOs e das vias metabólicas presentes no banco de dados KEGG (130). A via de sinalização dos NLRs foi uma das vias enriquecidas (FDR=0.0006) nos genes sobre expressos (FDR=0.0006) em células estimuladas com LPS em comparação com células sem estímulo (**Figura 9**). No entanto, essa mesma via foi enriquecida (FDR=0.001 nos genes menos expressos por células infectadas com *L. infantum* em relação às células estimuladas com LPS, mostrando que infecção com o parasita resulta em menor expressão de genes relacionados à sinalização de receptores NOD-like quando comparada com células estimuladas com LPS (**Figura 9**).

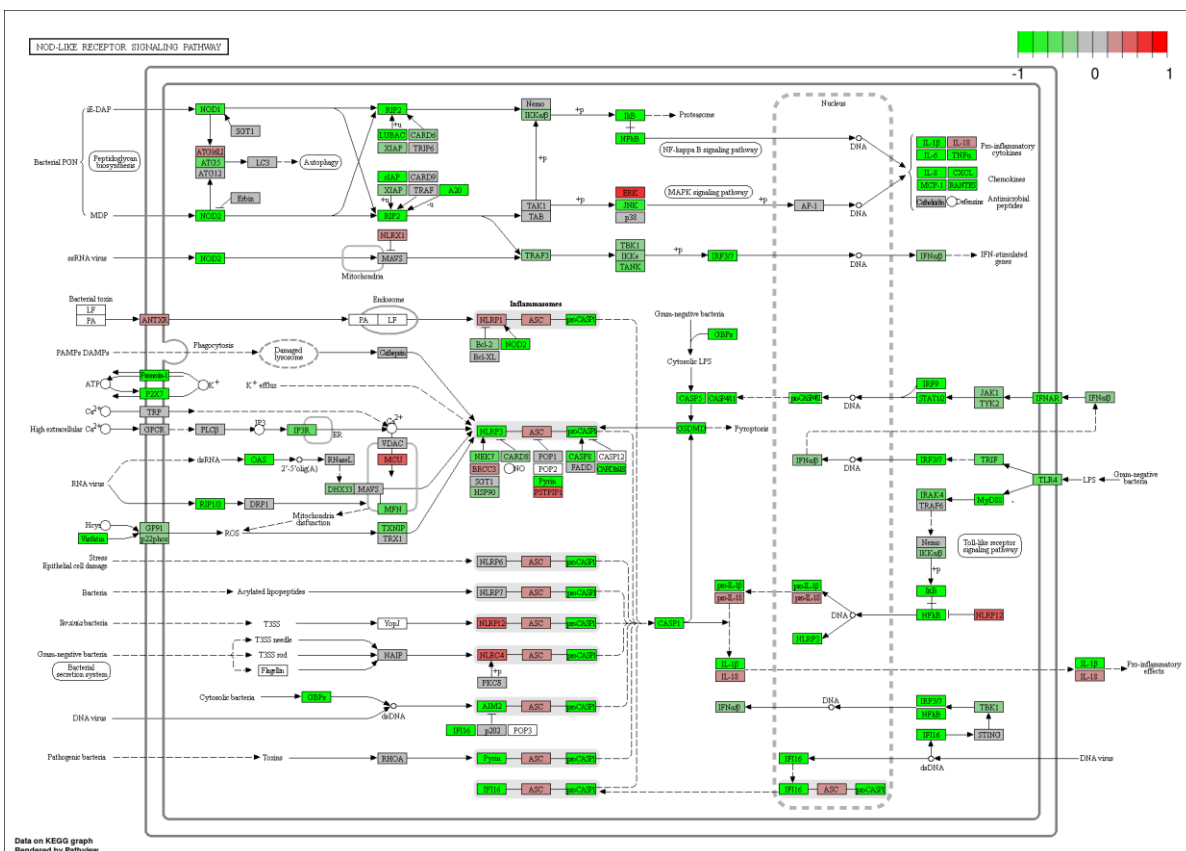
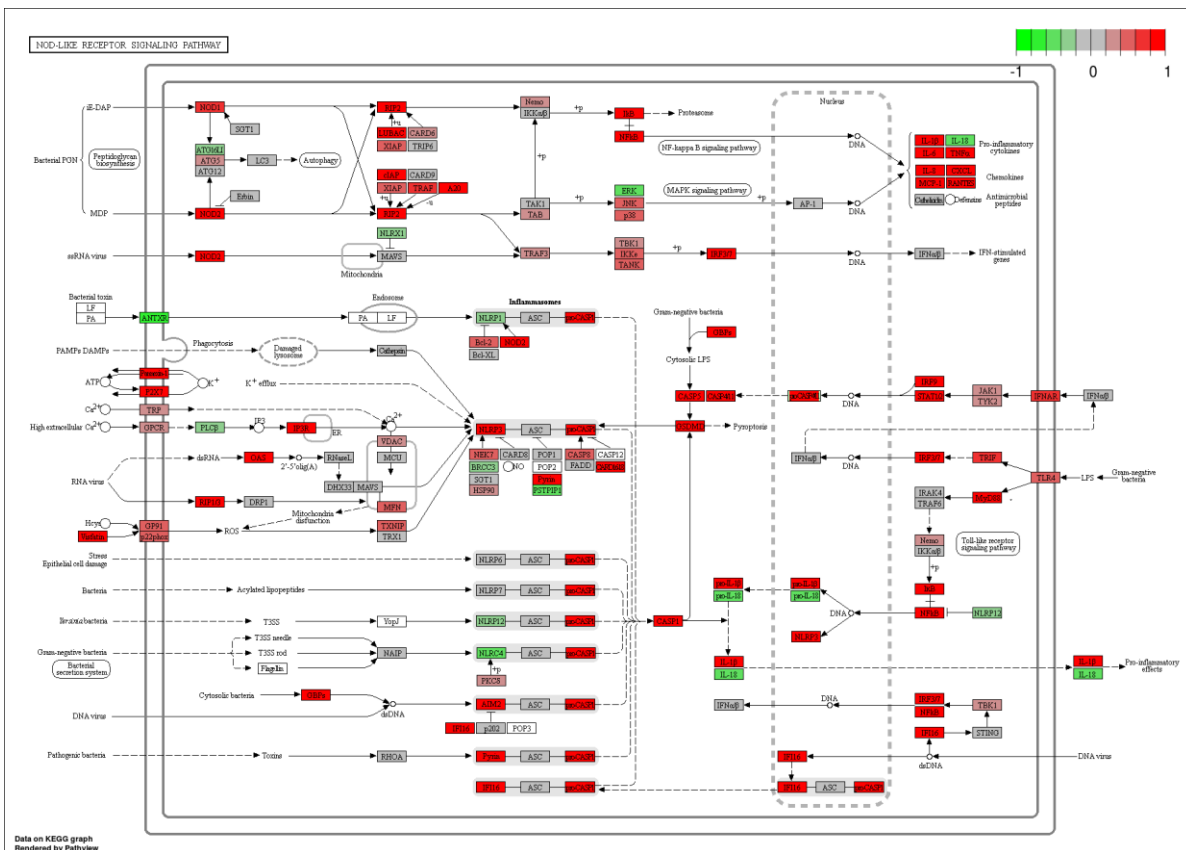


Figura 9. Análise de enriquecimento da via dos NLRs. Via dos NLRs enriquecida e baseada no banco de dados do KEGG (R pathview - FDR<0.01) após 8 horas de infecção. A via enriquecida em genes sobre expressos em células estimuladas com LPS vs. células sem estímulo é mostrada no **painel superior** e via enriquecida em genes sub expressos em células infectadas com *L. infantum* vs. LPS é mostrada no **painel inferior** após 8 horas.

Gatto, M., 2018

Discussão

Neste trabalho avaliamos o perfil de expressão gênica, com ênfase nos receptores NLR e formação de inflamassoma ou NODsoma, em células THP-1 infectadas com *L. infantum*. A participação dos inflamassomas e NODsomas na leishmaniose visceral ainda não está totalmente esclarecida e este tipo de informação é importante porque o controle das infecções causadas por parasitas do gênero *Leishmania* depende da montagem de uma resposta do tipo Th1, a qual está relacionada com a ativação destes complexos (11–14).

Para fazer esta investigação utilizamos um modelo de infecção *in vitro* com células de linhagem monocítica aguda (THP-1) diferenciadas em macrófagos com PMA. O uso de macrófagos se justifica por serem estas as células-alvo onde os parasitas se multiplicam e sobrevivem e também por expressarem genes dos inflamassomas (9,136). As condições adaptadas para diferenciar estas células em macrófagos foram estabelecidas com base em dados da literatura que utilizaram o PMA (39,137). Para validar o uso desta linhagem diferenciada como células-alvo da infecção por *L. infantum* avaliamos, após 48 horas, a internalização das *Leishmanias* testando diferentes proporções entre células e parasitas. Todas as proporções testadas resultaram em internalização da *Leishmania*, sendo que a proporção 1:10 resultou em 89% de células infectadas e viabilidade de 83% após 48 horas de infecção.

Alguns NLRs como NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRC4 e outros receptores não-NLR como o AIM2, são capazes de ativar o inflamassoma, um complexo proteico que resulta na ativação de proteases chamadas caspases, principalmente a caspase-1. Uma vez ativada, a caspase-1 cliva os precursores de IL-1 β e IL-18, liberando suas formas biologicamente ativas (44,50,51). Diferentemente da maioria das outras citocinas que são liberadas através do retículo endoplasmático e Golgi, a IL-1 β é produzida e liberada no citoplasma na forma de um precursor inativo (pró-IL-1 β) que precisa ser clivado e liberado em sua forma ativa pelas células (138). A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória capaz de ativar leucócitos, promover seu recrutamento para o

local da infecção e acentuar as funções antimicrobianas de macrófagos e neutrófilos (23–25). Além da participação na resposta imune inata, essa citocina também atua na resposta imune adaptativa, contribuindo para a diferenciação de linfócitos Th1 e Th17 (28–30).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são conhecidos por apresentarem distintas estratégias para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro; modulam funções celulares e regulam a resposta imunológica para sobreviver dentro dos macrófagos (11,14).

De acordo com nossos resultados, a infecção com *L. infantum* não determinou aumento significativo de IL-6 e TNF- α após os períodos avaliados. O TNF- α aumenta a fagocitose e desencadeia *burst* oxidativo dos macrófagos, que é um dos fatores que contribui para a eliminação dos parasitas (11,14). A não indução destas citocinas está condizente com outros trabalhos. Foi demonstrado por exemplo que *L. donovani* pode interferir na sinalização de proteínas MAPK e dificultar a fosforilação de ERK e p38, o que resulta em diminuição da produção de TNF- α (139). A protease GP63 presente na superfície da *Leishmania* desempenha papel importante na inibição da sinalização celular por clivar e ativar proteínas tirosina fosfatases do hospedeiro, inibindo assim a produção de TNF- α , IL-6 e NO e conseqüentemente, reduzindo a resposta inflamatória (140–143).

Diferentemente das células estimuladas com LPS que produziram IL-1 β , *L. infantum* não foi capaz de induzir níveis significativos desta citocina, sugerindo que o parasita pode interferir na produção de IL-1 β em níveis pré ou pós-transcricionais. De forma similar aos nossos resultados, estudos utilizando infecção de células THP-1 com *L. major* e *L. mexicana* ou macrófagos de camundongos infectados com *L. donovani* mostraram que essas espécies de *Leishmania* não induziram a produção de IL-1 β (39,144). Ao contrário destes estudos e dos nossos achados, outros autores relataram que camundongos ou macrófagos murinos infectados com *L. major* e *L.*

amazonensis produziram maiores níveis de IL-1 β aumentada, o que conferiu resistência à infecção (98–100).

Além da não produção de IL-1 β , também verificamos que infecção com *L. infantum* não alterou a média de intensidade de fluorescência (MIF) da caspase-1 nem a porcentagem de células expressando esta enzima após 8, 24 ou 48 horas em relação às células não estimuladas. Estes achados indicam que o parasita está interferindo na ativação dos inflamassomas e consequentemente na produção de IL-1 β . Esses resultados diferem de estudos com *L. major* e *L. amazonensis*, os quais mostraram que essas espécies de *Leishmania* induzem a ativação da caspase-1 em relação aos controles (98,99). Essas diferenças podem ser consequência de características inerentes às distintas espécies de *Leishmania*, fatores de virulência e distintos modelos de infecção. No entanto, células infectadas e estimuladas com nigericina apresentaram aumento da MFI da caspase-1. Isto sugere que infecção com *Leishmania* não ativa diretamente a caspase-1, mas pode funcionar como um *priming* e que a adição de um segundo sinal resulta na ativação de caspase-1. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que a ativação de caspase-1 observada nas células infectadas e posteriormente adicionadas de nigericina seja devida ao uso do PMA utilizado para a diferenciação das células. O PMA pode funcionar como indutor de primeiro sinal *in vitro* na ativação de inflamassomas, como já foi relatado em outras investigações (145,146).

Como mencionado anteriormente, o objetivo principal deste trabalho foi caracterizar o perfil transcricional de células THP-1 infectadas com *L. infantum*. Para isto avaliamos o perfil global de expressão de células infectadas ou estimuladas com LPS após 8 horas de incubação. Os resultados deixam claro que o padrão de expressão gênica de células infectadas com *L. infantum* é muito parecido com o padrão expresso por células sem infecção e muito distinto do padrão observado em células estimuladas com LPS. Resultados similares foram encontrados quando

macrófagos foram infectados com *L. mexicana* e *L. chagasi*, as quais não alteraram o padrão de expressão de genes em relação às células não infectadas (147,148). De forma distinta, infecção com *L. panamensis* aumentou de forma significativa a expressão de genes em macrófagos (149).

A análise de enriquecimento de GOs e vias metabólicas mostrou que infecção com *L. infantum* resulta na expressão de um número bem menor de vias enriquecidas; no entanto, algumas dessas vias não foram enriquecidas em células estimuladas com LPS. Na via de adesão celular, destacamos por exemplo os genes ACTG1 e ACTB, os quais codificam γ -actina e β -actina, respectivamente. As actinas são proteínas presentes em todas as células eucarióticas e fazem parte da formação do citoesqueleto celular. A γ -actina encontra-se no estado monomérico e pode ser polimerizada em filamentos como a F-actina. Esses filamentos estão relacionados com contração, endocitose, locomoção celular, adesão ao substrato e transporte de organelas (150). A locomoção celular, realizada pela emissão de pseudópodo na parte anterior e retração na parte posterior da célula e a adesão das células ao substrato, são reguladas pela reorganização de filamentos de actina (151).

Estudos indicam que as *Leishmanias* podem interferir na migração celular e adesão ao substrato. Macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* apresentaram redução de FAK (*focal adhesion kinase*) e paxilina fosforiladas, componentes estes que coordenam a polimerização da actina, adesão e locomoção celular. Isto resultou em mudanças na dinâmica da actina nos macrófagos e redução da motilidade dessas células, impedindo sua saída do local da infecção (152). Outros estudos que utilizaram monócitos humanos infectados com *L. amazonensis*, mostraram que esse parasita reduz a adesão dessas células ao substrato, o que facilitou a migração e disseminação das *Leishmanias* (153,154). Além disso, a internalização de *L. donovani* e *L. major* por macrófagos parece estar relacionada com actina. Uso de inibidor de polimerização de actina resultou em baixa ativação de MAPK provavelmente devido à endocitose reduzida dessas

células, a qual é dependente de actina (155). De acordo com nossos resultados, *L. infantum* aumenta a expressão de genes de actina e vale ressaltar que somente as células infectadas expressaram esses genes. A análise dos nossos resultados sugere duas possibilidades; a indução da expressão desses genes pelo parasita teve a finalidade de aumentar a motilidade celular e assim ampliar a chance de disseminação ou diminuir a motilidade para ter mais chance de sobreviver dentro da célula.

Um dos genes relacionados com a via de ativação de plaquetas e da via de coagulação foi o CD36; sua expressão também foi restrita às células infectadas. Esse gene codifica a glicoproteína CD36; presente na membrana de vários tipos celulares. Essa proteína está envolvida em muitos mecanismos tais como angiogênese, homeostasia e absorção de lipídios. Em fagócitos, a CD36 funciona como um receptor *scavenger*, envolvido no reconhecimento de ligantes durante a resposta imune inata (156).

A expressão de CD36 em macrófagos após infecção com *Leishmania* parece influenciar a sobrevivência dos parasitas (157). Após a fagocitose, as *Leishmanias* se abrigam dentro dos fagossomos ou vacúolos parasitóforos (VP) sendo que a maturação do VP e a sobrevivência dos parasitas depende da fusão endocítica com lisossomos, de vias secretoras e da expressão de Rab5, Rab7a, MHC II, LAMP1 e LAMP2 (158–160). *L. donovani* sobrevive em macrófagos por atrasar a fusão dos fagossomos com os lisossomos (160). Diferente dos fagossomos clássicos, onde o conteúdo interno é degradado e a organela reciclada, VP contendo *Leishmanias* aumentam de tamanho por fundir tardiamente com lisossomos, permitindo a aquisição de nutrientes, sobrevivência, replicação parasitária e evitando a resposta imunológica (161). Neste contexto, acreditamos que o significado biológico da expressão aumentada de CD36 se relaciona com estratégias de sobrevivência do parasita, pois estudo com *L. amazonensis* mostrou que CD36 possui papel essencial na maturação do VP e sobrevivência das *Leishmanias*. Os VPs expressando

CD36 se fundiram com endossomos/lisossomos tardios, permitindo o aumento de tamanho dos VPs e sobrevivência dos parasitas. Por outro lado, macrófagos de camundongos *knockout* de CD36 apresentaram pouca fusão dos VPs com endossomo tardio, resultando em VPs menores e limitada replicação das amastigotas (157).

Outra via enriquecida após a infecção com *L. infantum* foi a de regulação das MAPK. As quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) incluindo p38, JNK e ERK1/2 são importantes na sinalização de vias imunológicas por induzir a produção de mediadores inflamatórios. No entanto, a desfosforilação e regulação das MAPKs é realizada por diferentes classes de fosfatases, as quais são ativadas durante a infecção com diferentes espécies de *Leishmania* (139,141,142,162). Dentro da família das tirosina fosfatases (PTP) existe a classe das DUSPs (fosfatases de especificidade dupla), envolvidas com desativação de MAPKs em infecção com *Leishmania* (162). Estudo mostrou que DUSP1 e DUSP6 inibiram a ativação de ERK1/2, p38 e PKC após infecção com *L. donovani*, resultando em baixa expressão de iNOS (163). Nossos resultados revelaram que infecção com *L. infantum* resulta no aumento da expressão de *DUSP2*, *DUSP5* e *DUSP7*, ressaltando que esses genes só foram expressos por células infectadas e não por células estimuladas com LPS. Embora não tenhamos encontrado na literatura estudos envolvendo as fosfatases expressas neste trabalho, essas proteínas também foram relacionadas com desfosforilação de p38, JNK e ERK1/2 (164,165). Nossos resultados sugerem, portanto, que a expressão dessas DUSPs induzidas pelos parasitas é mais um mecanismo para desativar distintas vias inflamatórias e sobreviver dentro da célula.

Entre os 30 genes significativamente mais expressos após infecção com *L. infantum*, três deles estão relacionados com a resposta imune; *CSF1*, *RPS6K1* e *CDC20*. O gene *CSF1* (*Colony stimulating factor 1*) codifica o fator 1 estimulador de colônia (M-CSF). O M-CSF e o GM-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) são citocinas que direcionam a diferenciação de

macrófagos. Macrófagos com perfil pró-inflamatório são diferenciados na presença de GM-CSF e produzem IL-12 enquanto que macrófagos com fenótipo anti-inflamatório e produtores de IL-10 são diferenciados na presença de M-CSF (166,167). Infecção experimental com *L. donovani* determinou aumento da expressão de mRNA de GM-CSF e M-CSF, o que foi relacionado com aumento da atividade hematopoiética e consequente expansão dos parasitas no baço e medula óssea (168). Um estudo *in vitro* utilizando macrófagos de camundongos *knockout* de M-CSF mostrou que essas células aumentam sua capacidade fagocítica acompanhada do aumento da produção de IL-12 e NO após infecção com *L. major*. Esses animais foram mais resistentes à infecção por montarem uma resposta do tipo Th1, a qual permitiu a eliminação dos parasitas (169). Preliminarmente esses resultados sugerem que a *L. infantum* induz a expressão desse gene para priorizar a diferenciação de macrófagos anti-inflamatórios e assim preservar sua sobrevivência no interior dessas células.

Outro gene sobre expresso foi o RPS6KA1, que codifica proteínas ribossomais do tipo serina-treonina (S6K1 e S6K2), as quais participam da sinalização de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e das quinases PI3K e são importantes em vários processos celulares como metabolismo de nutrientes, estresse, apoptose, biogênese de mitocôndrias e ciclo celular (170). Além disso, estudos têm mostrado que essas proteínas participam da regulação da via dos receptores Toll-like (171,172). A S6K1 regula negativamente a via dos TLRs por interagir com TAB1 e inibir a atividade de TAK1, uma proteína que ativa a via das MAPK e dos NOD1/2 (106,172,173). O aumento da expressão de S6K1 após estímulo de TLR2 e TLR4 em células humanas da linhagem HEK293 inibiu a atividade de TAK1 e NF- κ B, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios (172). Por outro lado, macrófagos murinos infectados com *T. gondii* aumentaram a ativação de mTOR e consequente progressão do ciclo celular dos macrófagos, no entanto essa ativação foi independente da expressão de S6K1 (174). Não encontramos na literatura estudos que elucidem o

envolvimento da S6K1 em infecções com *Leishmania*, mas acreditamos que expressão aumentada desse gene possa interferir na ativação de diferentes vias de sinalização do hospedeiro.

A expressão de CDC20 foi restrita a células infectadas e foi um dos genes mais expressos após infecção com *L. infantum*. Esse gene codifica a proteína CDC20 que é envolvida no ciclo celular. O complexo APC/C (*Anaphase promoting complex/cyclosome*) é necessário para a progressão do ciclo celular, pois tem a função de degradar reguladores deste ciclo no proteassoma. O APC/C é ativado da metáfase até transição G1/S e sua função é regulada pelo CDC20. Essa proteína ativa o complexo APC/C durante a mitose e é necessária para a degradação das ciclinas, reguladores do ciclo celular (175,176).

Embora não existam estudos que mostrem o envolvimento do CDC20 em células do hospedeiro após infecção com *Leishmanias*, alguns estudos têm mostrado que esse gene é importante no ciclo celular dos próprios parasitas. Estudo mostrou que o inibidor de proteassoma MG132 aumenta os níveis de CDC20 na fase G1 de *L. donovani*, aumentando a divisão celular das promastigotas. Isso indica que a *Leishmania* regula seu ciclo celular por degradação de proteassoma através de APC/C (177). Estudos também indicam que parasitas da família *Trypanosomatidae* regulam seu ciclo celular através da degradação por proteassoma/ubiquitinas também mediada pela maquinaria APC/C (178,179). Diante do exposto sugerimos que o parasita esteja induzindo a expressão desse gene para aumentar a proliferação dos macrófagos e assim permitir sua disseminação. Também não excluimos a possibilidade de que o parasita esteja utilizando essa molécula para auxiliar na sua própria proliferação.

Entre os 30 genes menos expressos após infecção com *L. infantum*, *ACKR3* e *GBP1* são relacionados ao sistema imunológico. O *ACKR3* codifica o receptor atípico de quimiocina (*ACKR3* ou *CXCR7*). Esse tipo de receptor não medeia diretamente a quimiotaxia, mas coordena o gradiente de quimiocinas durante a resposta imune. A função desses receptores transcorre entre a

superfície e compartimentos intracelulares, internalizando e degradando quimiocinas e liberando seus debris para o espaço extracelular. Portanto, esses receptores possuem papel crucial para coordenar a quimiotaxia durante a resposta imune (180,181). O ACKR3 degrada CXCL12 e CXCL11, internalizando essas quimiocinas e modulando a expressão dos seus respectivos receptores (182,183). O ACKR3 também está envolvido com internalização de cepas do vírus do HIV em células humanas; quando esse receptor é bloqueado ocorre diminuição da entrada dos vírus nas células (184).

Embora não existam publicações elucidando o papel do ACKR3 nas leishmanioses, alguns relatos indicam o envolvimento de CXCL12 e CXCL11 nestas infecções. A CXCL11 é importante na resposta imune do tipo Th1 por recrutar leucócitos para o sítio da infecção e ativar células T e NK para secretarem IFN- γ (185). Baixa produção dessa quimiocina foi relacionada com lesões crônicas em pacientes portadores de leishmaniose cutânea (186). A CXCL11 também foi relacionada com aumento da suscetibilidade em infecção experimental com *L. major*. Camundongos BALB/c, suscetíveis à infecção, exibiram aumento de expressão de CXCL11 e tratamento com essa quimiocina em camundongos C57BL/6, os quais são resistentes à infecção, determinou diminuição da produção de IL-12, direcionamento da resposta imune para um perfil Th2 e aumento da carga parasitária (187). Em relação à CXCL12, estudo mostrou que a presença desta quimiocina atraiu progenitores de células dendríticas com perfil regulatório durante infecção experimental com *L. donovani* (188). Considerando a função do ACKR3 de degradar quimiocinas, esperaríamos expressão aumentada desse receptor após a infecção com *L. infantum*. No entanto, diante do exposto, diminuição da expressão desse receptor pode aumentar os níveis de CXCL11 e CXCL12, ambos relacionados com polarização de resposta Th2.

Outro gene sub expresso após a infecção com *L. infantum* foi o GBP1, que codifica a proteína 1 de ligação ao guanilato (GBP1), uma GTPase que interage com membranas celulares

para regular uma ampla variedade de funções, entre elas a fusão de vesículas de transporte, transportando a maquinaria autofágica até os vacúolos com patógenos para eliminá-los (189,190). A expressão de GBPs (1 ao 7 nos humanos) pode ser induzida por IFN- γ e essas proteínas estão envolvidas na ativação de inflamassomas e caspase-1 por causarem ruptura nas membranas de vacúolos e assim liberar PAMPs no citoplasma (191,192). Células dendríticas humanas infectadas com *L. major* e *L. donovani* mostraram aumento da expressão de GPB1 (193). Expressão global gênica de macrófagos de camundongos infectados com *L. major* mostrou aumento da expressão de várias GBPs (194). Ainda são escassos estudos envolvendo as GBPs e *Leishmanias*, principalmente no que se refere à estes parasitas e inflamassoma. Tendo em vista que as GBPs são induzidas por IFN- γ e que estão relacionadas com a ativação de inflamassomas, nossa suposição é que a *Leishmania* esteja reprimindo a expressão de GPB1 como mais uma forma de escapar da resposta imune do hospedeiro.

Uma das informações importantes deste trabalho é que a infecção com *L. infantum* determina a expressão de um número bastante reduzido de genes em macrófagos. Essa diferença de expressão também pode ser notada quando se trata de genes envolvidos com a resposta imune, principalmente os genes relacionados com inflamassomas e receptores NODs. Enquanto células estimuladas com LPS mostraram aumento da expressão de genes de inflamassomas e NODosomas como *CASP1*, *CASP4*, *CASP8*, *NLRP3*, *AIM2*, *NOD1*, *NOD2*, *RIPK2*, *NFKB* e *IL1B*, não ocorreu aumento da expressão destes genes nas células infectadas. Além disso, a via dos NLRs foi significativamente enriquecida nos genes sobre expressos em células estimuladas com LPS mas não nas células infectadas com *Leishmania*. Tais resultados indicam que infecção com *L. infantum* em células THP-1 não resulta na expressão de genes de inflamassomas ou NODosomas, o que pode ser confirmado pela não produção de IL-1 β e não ativação de caspase-1. Estudos têm mostrado resultados contrários, pois outras espécies do parasita como *L. major*, *L. amazonensis* e *L.*

braziliensis ativam inflamassomas resultando em proteção e aumento da inflamação (98–100). Este achado nos parece relevante pois destaca mais uma particularidade entre as diferentes espécies de *Leishmania*. Sob esta perspectiva podemos sugerir que a *L. infantum* utiliza estas estratégias de escape justamente para evitar a montagem de uma resposta imune específica eficaz.

Dada a relevância do inflamassoma no controle da replicação e disseminação dos patógenos, não é surpreendente que os mesmos utilizem estratégias para impedir a ativação desse complexo (195). Já está estabelecido que para a montagem deste complexo e ativação da caspase-1 é necessária a transcrição de mRNA de componentes do inflamassoma e de pró-IL-1 β através da ativação de vias inflamatórias e NF- κ B por TLRs, CLRs e NOD1/NOD2 (55,63,106). A ativação de NF- κ B e indução de resposta inflamatória protetora com diferentes espécies de *Leishmanias* têm sido relatadas na literatura (12). Além disso, estudo recente mostrou que infecção de CDs com *L. infantum* resulta na ativação de NOD2-RIP2, produção de IL-12 através de MAPK e polarização da resposta imune no sentido Th1 (118). Entretanto, de acordo com nossos dados, *L. infantum* não aumentou a expressão de NOD1, NOD2 e NF- κ B. A não ativação de NF- κ B ou sua degradação por GP63 em infecções por distintas espécies de *Leishmanias* já foram descritos em diversas publicações (revisado por 196,197). A GP63 também tem sido relacionada com clivagem e ativação de fosfatases, o que interfere na produção de mediadores inflamatórios e modula as funções dos macrófagos (141–143,197).

A ausência da expressão de mRNA de IL-1 β que constatamos nas células THP-1 infectadas com *L. infantum* é validada pela literatura. Por exemplo, o LPG presente na membrana celular da *L. donovani*, interfere na expressão de mRNA de IL-1 β comprometendo sua estabilidade e reduzindo a transcrição desta citocina (40,41). Shio e colaboradores (39) observaram que infecções com *L. major* e *L. mexicana* determinaram baixa ativação de inflamassoma NLRP3 e

reduzida produção de IL-1 β , resultado da interferência da GP63 na fosforilação de PKC (proteína quinase C) prejudicando a geração de ROS que é um reconhecido ativador de inflamassoma.

Também de acordo com nossos resultados, Gupta et al (144) mostraram que infecção com *L. donovani* não resulta em maturação de IL-1 β devido a expressão de UCP2, uma proteína da membrana das mitocôndrias que inibe a produção de ROS. A forma do parasita utilizada no estudo é um fator que pode ser responsável pela baixa expressão de IL-1 β . Tem sido observado que infecção de PBMCs com amastigotas de *L. braziliensis* acarreta maturação de IL-1 β enquanto que infecção com promastigotas não resulta em maturação dessa citocina (198). As células infectadas não apresentaram expressão de mRNA para IL-1 β nem secreção da proteína correspondente, no entanto, constatamos expressão aumentada de IL1RN, que codifica o antagonista no receptor de IL-1 (IL-1RA). Este antagonista é importante na regulação de IL-1 α e IL-1 β porque ao ligar-se ao receptor de IL-1 (IL-1RI) controla a atividade dessas citocinas (199). A infecção de camundongos *knockout* para IL-1RA com *L. major* determinou lesões maiores e aumento da carga parasitária. Além disso, CDs desses animais exibiram menor capacidade fagocítica e baixa produção de IL-12, indicando que além dos efeitos na resposta Th a IL-1 também modula a homeostase das DCs, resultando em diminuição de IL-12 e agravamento das lesões (200). Nossos resultados mostram que além da infecção com *L. infantum*, o estímulo com LPS também aumentou a expressão de IL1RN. Acreditamos que as células estimuladas com LPS induzem a expressão desse antagonista para regular as ações da IL-1, produzida em níveis elevados por essas células. No caso das células infectadas, que não apresentaram produção dessa citocina, a expressão de IL1RN funcionaria como mais um mecanismo de escape da *L. infantum*.

O gene TNFAIP3, relacionado com a via dos NLRs, foi um dos poucos genes expressos por células infectadas. O TNFAIP3 codifica a proteína TNFAIP3 (*TNF- α -induced protein 3*) também conhecida como A20. A TNFAIP3 é uma proteína citosólica que regula negativamente a ativação

de NF- κ B por TLRs, por causar desubiquitinação de TRAF6 e impedir a translocação de NF- κ B para o núcleo da célula (201). Em infecção com *L. donovani* a TNFAIP3 causou desubiquitinação de TRAF6 e quando essa proteína foi silenciada houve *clearence* dos parasitas e aumento da produção de IL-12 e TNF- α (202). A TNFAIP3 também é relacionada com supressão da ativação de inflamassoma NLRP3 (203) e trabalho recente mostrou a relevância dessa proteína na ativação desse complexo. Gupta et al (144) mostraram que macrófagos de camundongos infectados com *L. donovani* exibem baixa expressão de NLRP3, ativação de caspase-1 e maturação de IL-1 β . A falta de ativação desses componentes foi relacionada com a presença de TNFAIP3, que inibiu a ativação de NF- κ B e consequentemente a expressão de NLRP3 e pró-IL-1 β . No entanto, quando TNFAIP3 foi silenciada, houve aumento da expressão de NLRP3 e maturação de IL-1 β . Esse estudo mostrou que o parasita interfere na ativação de inflamassomas.

Analisados de forma global, os resultados obtidos indicam que a *L. infantum* entra nas células THP-1 de forma mais silenciosa em comparação ao estímulo desencadeado pelo LPS. É importante ressaltar, entretanto, que a infecção com este parasita, apesar de ser capaz de modular, tanto positiva quanto negativamente alguns genes, desencadeia um perfil predominantemente anti-inflamatório nessas células. Além deste trabalho sugerir vias adicionais dos mecanismos de escape empregados por estes parasitas, ele também indica as células THP-1 como um modelo alternativo para investigar mais detalhadamente, em termos moleculares, a infecção entre *Leishmanias* e macrófagos.

Comentários finais:

- infecção com *L. infantum* resulta na baixa produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β , não ativação de caspase-1 e baixa expressão de genes relacionados à via de ativação dos NLRs; indicando que o parasita suprime a resposta inflamatória das células THP-1;
- infecção com *L. infantum* resultou em um padrão de expressão gênica similar às células sem infecção e distinto de células estimuladas com LPS, indicando que a entrada desse parasita nas células ocorre de forma mais silenciosa.
- infecção com *L. infantum* modulou a expressão de genes, associados ou não com a resposta imune. Esses genes foram relacionados com mecanismos de escape e de sobrevivência dos patógenos no interior das células;
- em conjunto esses dados mostram que a *L. infantum* utiliza recursos que permitem escapar da resposta imune do hospedeiro e garantir sua sobrevivência dentro das células.

Conclusão

O perfil transcricional de células THP-1 infectadas com *L. infantum*, comparado ao de células não infectadas e também ao de células estimuladas com LPS, revela que esta espécie de leishmania entra na célula hospedeira de uma forma bastante silenciosa. Além de não determinar ativação de diferentes vias envolvidas no alerta pró-inflamatório, também determina expressão de um número limitado de genes relacionados com sua sobrevivência e com mecanismos de escape.

Referências

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
2. Real F, Florentino PTV, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PST, Goto H, et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cell Microbiol*. 2014;16(10):1549–64.
3. WHO. Leishmaniasis: Magnitude of problem. [Internet]. 2016. Available from: www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html
4. Singh OP, Hasker E, Boelaert M, Sundar S. Elimination of visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent. *Lancet Infect Dis*. 2016;
5. Dawit G, Girma Z, Semene K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *J Bacteriol Parasitol*. 2013;4(2).
6. Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*. 2010 Oct;26(10):466–9.
7. Spiegel CN, Dias DBDS, Araki AS, Hamilton JGC, Brazil RP, Jones TM. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):580.
8. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017;6:750.
9. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:83.
10. Faria MS, Reis FCG, Lima APCA. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? *J Parasitol Res*. 2012;2012:930257.
11. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol*. 2002;72(2):132–41.
12. Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato Neto V. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun*. 2008;76(3):866–72.
13. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004;201:239–53.
14. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604–15.
15. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51(2):229–42.
16. Saha S, Mondal S, Ravindran R, Bhowmick S, Modak D, Mallick S, et al. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *J Immunol*. 2007;179(8):5592–603.
17. Rai AK, Thakur CP, Singh A, Seth T, Srivastava SK, Singh P, et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2012;7(2):e31551.
18. Ghosh K, Sharma G, Saha A, Kar S, Das PK, Ukil A. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. *J Infect Dis*. 2013;207(6):1016–25.
19. Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest*. 2009;119(8):2379–87.
20. Sacramento LA, Cunha FQ, de Almeida RP, da Silva JS, Carregaro V. Protective role of 5-lipoxygenase during *Leishmania infantum* infection is associated with Th17 subset. *Biomed Res Int*. 2014;2014:264270.
21. Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009;200(1):75–8.
22. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*. 2009;182(5):3039–46.
23. Chen KW, Schroder K. Antimicrobial functions of inflammasomes. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(3):311–8.

24. Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med.* 1984;311(22):1413–8.
25. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine.* 2014 Sep;69(1):136–45.
26. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163–89.
27. Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(1 Pt 1):11–24.
28. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* 2009;30(4):576–87.
29. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KHG. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 2009;31(2):331–41.
30. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011;32(3):110–6.
31. Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P, et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol.* 2010;185(2):974–81.
32. Lalor SJ, Dungan LS, Sutton CE, Basdeo SA, Fletcher JM, Mills KHG. Caspase-1-processed cytokines IL-1 β and IL-18 promote IL-17 production by gammadelta and CD4 T cells that mediate autoimmunity. *J Immunol.* 2011;186(10):5738–48.
33. van de Veerdonk FL, Joosten LAB, Shaw PJ, Smeekens SP, Malireddi RKS, van der Meer JWM, et al. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *Eur J Immunol.* 2011;41(8):2260–8.
34. Gurung P, Karki R, Vogel P, Watanabe M, Bix M, Lamkanfi M, et al. An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis. *J Clin Invest.* 2015;125(3):1329–38.
35. Hermoso T, Fishelson Z, Becker SI, Hirschberg K, Jaffe CL. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J.* 1991;10(13):4061–7.
36. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 1995;155(6):3102–11.
37. Scianimanico S, Desrosiers M, Dermine JF, Méresse S, Descoteaux A, Desjardins M. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by Leishmania donovani promastigotes. *Cell Microbiol.* 1999;1(1):19–32.
38. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):293–305.
39. 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;9(6):e0003868.
40. Bertholet S, Dickensheets HL, Sheikh F, Gam AA, Donnelly RP, Kenney RT. Leishmania donovani-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect Immun.* 2003;71(4):2095–101.
41. Hatzigeorgiou DE, Geng J, Zhu B, Zhang Y, Liu K, Rom WN, et al. Lipophosphoglycan from Leishmania suppresses agonist-induced interleukin 1 beta gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14708–13.
42. Tricker E, Cheng G. With a little help from my friends: modulation of phagocytosis through TLR activation. *Cell Res.* 2008;18(7):711–2.
43. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783–801.
44. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821–32.
45. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229–65.

46. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;130(2):65–74.
47. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol.* 2003;33(10):2822–31.
48. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 2002;18(6):272–8.
49. Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):985–92.
50. Barbé F, Douglas T, Saleh M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(6):681–97.
51. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10(2):417–26.
52. Tattoli I, Travassos LH, Carneiro LA, Magalhaes JG, Girardin SE. The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2007;29(3):289–301.
53. Kesavardhana S, Kanneganti T-D. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. *Int Immunol.* 2017;29(5):201–10.
54. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong Y-N, Lu Q, Xu H, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature.* 2011 Sep 14;477(7366):596–600.
55. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009;183(2):787–91.
56. Man SM, Kanneganti T-D. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev.* 2015;265(1):6–21.
57. Py BF, Kim M-S, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell.* 2013 Jan 24;49(2):331–8.
58. Qu Y, Misaghi S, Izrael-Tomasevic A, Newton K, Gilmour LL, Lamkanfi M, et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature.* 2012 Oct 25;490(7421):539–42.
59. Guarda G, Dostert C, Staehli F, Cabalzar K, Castillo R, Tardivel A, et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature.* 2009 Jul 9;460(7252):269–73.
60. Mishra BB, Rathinam VAK, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol.* 2013 Jan;14(1):52–60.
61. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity.* 2011 Feb 25;34(2):213–23.
62. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol.* 2012 Oct 15;189(8):4175–81.
63. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(12):1012–21.
64. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol.* 2016 Mar;13(2):148–59.
65. Perregaux D, Gabel CA. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem.* 1994;269(21):15195–203.
66. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity.* 2013;38(6):1142–53.
67. 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;105(23):8067–72.
68. Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature.*

- 2012;492(7427):123–7.
69. Rossol M, Pierer M, Raulien N, Quandt D, Meusch U, Rothe K, et al. Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun.* 2012;3:1329.
 70. Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J Immunol.* 2013;191(10):5230–8.
 71. Lawlor KE, Vince JE. Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: is there a role for mitochondria? *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(4):1433–40.
 72. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 2012;36(3):401–14.
 73. Shao B-Z, Xu Z-Q, Han B-Z, Su D-F, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol.* 2015;6:262.
 74. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008;9(8):847–56.
 75. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature.* 2011;479(7371):117–21.
 76. Gurung P, Malireddi RKS, Anand PK, Demon D, Vande Walle L, Liu Z, et al. Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon- β (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates Toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. *J Biol Chem.* 2012;287(41):34474–83.
 77. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science.* 2013;341(6151):1246–9.
 78. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 2014;514(7521):187–92.
 79. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood.* 2009;113(10):2324–35.
 80. Vince JE, Wong WW-L, Gentle I, Lawlor KE, Allam R, O'Reilly L, et al. Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity.* 2012 Feb 24;36(2):215–27.
 81. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity.* 2016;44(4):833–46.
 82. Chavarría-Smith J, Vance RE. The NLRP1 inflammasomes. *Immunol Rev.* 2015 May;265(1):22–34.
 83. Faustin B, Lartigue L, Bruey J-M, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell.* 2007;25(5):713–24.
 84. Hsu L-C, Ali SR, McGillivray S, Tseng P-H, Mariathasan S, Humke EW, et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(22):7803–8.
 85. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet.* 2006;38(2):240–4.
 86. Liao K-C, Mogridge J. Activation of the Nlrp1b inflammasome by reduction of cytosolic ATP. *Infect Immun.* 2013;81(2):570–9.
 87. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti T-D, Ozören N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol.* 2006 Jun;7(6):576–82.
 88. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* 2009 Mar 26;458(7237):514–8.
 89. Bürckstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):266–72.

90. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*. 2009;459(7245):433–6.
91. Meixenberger K, Pache F, Eitel J, Schmeck B, Hippenstiel S, Slevogt H, et al. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1 β , depending on listeriolysin O and NLRP3. *J Immunol*. 2010;184(2):922–30.
92. Harder J, Franchi L, Muñoz-Planillo R, Park J-H, Reimer T, Núñez G. Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol*. 2009;183(9):5823–9.
93. Silva GK, Costa RS, Silveira TN, Caetano BC, Horta CV, Gutierrez FRS, et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 β response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2013;191(6):3373–83.
94. Gonçalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, et al. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2469.
95. Gorfou G, Cirelli KM, Melo MB, Mayer-Barber K, Crown D, Koller BH, et al. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *MBio*. 2014 Feb;5(1).
96. Ewald SE, Chavarria-Smith J, Boothroyd JC. NLRP1 is an inflammasome sensor for *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2014;82(1):460–8.
97. Witola WH, Mui E, Hargrave A, Liu S, Hypolite M, Montpetit A, et al. NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect Immun*. 2011;79(2):756–66.
98. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, Mineo TWP, et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med*. 2013;19(7):909–15.
99. Sani MRM, Moghaddam MM, Aghamollaei H, Hassanpour K, Taheri RA, Farnoosh G. Investigation of caspase-1 activity and interleukin-1 β production in murine macrophage cell lines infected with *Leishmania major*. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7S1:S70-3.
100. 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.
101. Inohara, Chamaillard, McDonald C, Núñez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:355–83.
102. Moreira LO, Zamboni DS. NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Front Immunol*. 2012;3:328.
103. Hasegawa M, Yang K, Hashimoto M, Park J-H, Kim Y-G, Fujimoto Y, et al. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J Biol Chem*. 2006;281(39):29054–63.
104. Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem*. 2003;278(43):41702–8.
105. Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, et al. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem*. 2000;275(36):27823–31.
106. Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Núñez G, et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J*. 2008;27(2):373–83.
107. Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Travassos LH, Selvanantham T, et al. Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol*. 2008;181(11):7925–35.
108. Magalhaes JG, Lee J, Geddes K, Rubino S, Philpott DJ, Girardin SE. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur J Immunol*. 2011;41(5):1445–55.
109. Schwarz H, Posselt G, Wurm P, Ulbing M, Duschl A, Horejs-Hoeck J. TLR8 and NOD signaling synergistically induce the production of IL-1 β and IL-23 in monocyte-derived DCs and enhance the expression of the feedback inhibitor SOCS2. *Immunobiology*. 2013;218(4):533–42.

110. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreux D, Caroff M, et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol*. 2005;35(8):2459–70.
111. Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol*. 2004;14(21):1929–34.
112. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J Biol Chem*. 2001;276(7):4812–8.
113. Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. 2010 Jan;11(1):55–62.
114. Shimada K, Chen S, Dempsey PW, Sorrentino R, Alsabeh R, Slepkin A V, et al. The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydomonas pneumoniae* lung infection. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000379.
115. Jamontt J, Petit S, Clark N, Parkinson SJ, Smith P. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 signaling promotes hyperresponsive macrophages and colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol*. 2013;190(6):2948–58.
116. Shaw MH, Reimer T, Sánchez-Valdepeñas C, Warner N, Kim Y-G, Fresno M, et al. T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat Immunol*. 2009;10(12):1267–74.
117. Silva GK, Gutierrez FRS, Guedes PMM, Horta C V, Cunha LD, Mineo TWP, et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2010;184(3):1148–52.
118. Nascimento MSL, Ferreira MD, Quirino GFS, Maruyama SR, Krishnaswamy JK, Liu D, et al. NOD2-RIP2-Mediated Signaling Helps Shape Adaptive Immunity in Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2016;214(11):1647–57.
119. Fernandes MC, Dillon LAL, Belew AT, Bravo HC, Mosser DM, El-Sayed NM. Dual Transcriptome Profiling of Leishmania-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. *MBio*. 2016;7(3).
120. Ovalle-Bracho C, Franco-Muñoz C, Londoño-Barbosa D, Restrepo-Montoya D, Clavijo-Ramírez C. Changes in Macrophage Gene Expression Associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128934.
121. Bioinformatics B. FastQC [Internet]. Available from: www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/%3E
122. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114–20.
123. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015 Apr;12(4):357–60.
124. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D8–20.
125. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski F, et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res*. 2012 Sep;22(9):1760–74.
126. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. 2010 Mar 15;26(6):841–2.
127. R core team. R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017. Available from: <http://www.r-project.org>
128. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
129. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25–9.
130. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 1999 Jan 1;27(1):29–34.
131. Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*. 2009 May 27;10:161.

132. Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*. 2013 Jul 15;29(14):1830–1.
133. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003 Nov;13(11):2498–504.
134. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*. 2011;6(7):e21800.
135. Croft D, O’Kelly G, Wu G, Haw R, Gillespie M, Matthews L, et al. Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D691-7.
136. Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnoy P, et al. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175336.
137. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):37–45.
138. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(4):189–95.
139. Privé C, Descoteaux A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol*. 2000 Aug;30(8):2235–44.
140. Forget G, Matte C, Siminovitch KA, Rivest S, Pouliot P, Olivier M. Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Eur J Immunol*. 2005 Jun;35(6):1906–17.
141. Forget G, Gregory DJ, Whitcombe LA, Olivier M. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun*. 2006 Nov;74(11):6272–9.
142. Abu-Dayyeh I, Shio MT, Sato S, Akira S, Cousineau B, Olivier M. *Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(12):e305.
143. Gomez MA, Contreras I, Hallé M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal*. 2009 Sep 29;2(90):ra58.
144. Gupta AK, Ghosh K, Palit S, Barua J, Das PK, Ukil A. *Leishmania donovani* inhibits inflammasome-dependent macrophage activation by exploiting the negative regulatory proteins A20 and UCP2. *FASEB J*. 2017;31(11):5087–101.
145. Hu X, Moscinski LC, Valkov NI, Fisher AB, Hill BJ, Zuckerman KS. Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is required for macrophage-like differentiation of a human myeloid leukemic cell line. *Cell Growth Differ*. 2000 Apr;11(4):191–200.
146. 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.
147. Zhang S, Kim CC, Batra S, McKerrow JH, Loke P. Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Mar 30;4(3):e648.
148. Ettinger NA, Wilson ME. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Jun 25;2(6):e252.
149. Ramírez C, Díaz-Toro Y, Tellez J, Castilho TM, Rojas R, Ettinger NA, et al. Human macrophage response to *L. (Viannia) panamensis*: microarray evidence for an early inflammatory response. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10):e1866.
150. Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*. 2009 Nov 27;326(5957):1208–12.
151. Rafelski SM, Theriot JA. Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:209–39.
152. de Menezes JPB, Koushik A, Das S, Guven C, Siegel A, Laranjeira-Silva MF, et al. *Leishmania* infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex

- proteins. *Cell Microbiol.* 2017 Mar;19(3).
153. Carvalho DGF, Barbosa A, D'El-Rei Hermida M, Clarencio J, Pinheiro NF, Veras PST, et al. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Exp Parasitol.* 107(3–4):189–99.
 154. Figueira CP, Carvalho DGF, Almeida RA, Hermida M d' E-R, Touchard D, Robert P, et al. *Leishmania* infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. *Sci Rep.* 2015 Aug 7;5:12862.
 155. Ben-Othman R, Guizani-Tabbane L, Dellagi K. *Leishmania* initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in macrophages. *Mol Immunol.* 2008 Jun;45(11):3222–9.
 156. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2009 May 26;2(72):re3.
 157. Okuda K, Tong M, Dempsey B, Moore KJ, Gazzinelli RT, Silverman N. *Leishmania amazonensis* Engages CD36 to Drive Parasitophorous Vacuole Maturation. *PLoS Pathog.* 2016 Jun;12(6):e1005669.
 158. Ndjamen B, Kang B-H, Hatsuzawa K, Kima PE. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. *Cell Microbiol.* 2010 Oct;12(10):1480–94.
 159. Canton J, Ndjamen B, Hatsuzawa K, Kima PE. Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection. *Cell Microbiol.* 2012 Jun;14(6):937–48.
 160. Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 1997 Jun 16;185(12):2061–8.
 161. Real F, Mortara RA. The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1518.
 162. Soulat D, Bogdan C. Function of Macrophage and Parasite Phosphatases in Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2017;8:1838.
 163. Kar S, Ukil A, Sharma G, Das PK. MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis: involvement of distinct protein kinase C isoforms. *J Leukoc Biol.* 2010 Jul;88(1):9–20.
 164. Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.* 2013 Jan;280(2):489–504.
 165. Bermudez O, Pagès G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Aug;299(2):C189-202.
 166. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol.* 2007 Apr 15;178(8):5245–52.
 167. Xu W, Zhao X, Daha MR, van Kooten C. Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Mol Immunol.* 2013 Mar;53(3):179–86.
 168. Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 2000 Apr;68(4):1840–8.
 169. Schönlau F, Schlesiger C, Ehrchen J, Grabbe S, Sorg C, Sunderkötter C, et al. Monocyte and macrophage functions in M-CSF-deficient op/op mice during experimental leishmaniasis. *J Leukoc Biol.* 2003;73(5):564–73.
 170. Fenton TR, Gout IT. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Jan;43(1):47–59.
 171. Cao W, Manicassamy S, Tang H, Kasturi SP, Pirani A, Murthy N, et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol.* 2008 Oct;9(10):1157–64.
 172. Kim SY, Baik K-H, Baek K-H, Chah K-H, Kim KA, Moon G, et al. S6K1 negatively regulates TAK1 activity in the toll-like receptor signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2014 Feb;34(3):510–21.

173. Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, et al. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science*. 1996 May 24;272(5265):1179–82.
174. Wang Y, Weiss LM, Orlofsky A. Intracellular parasitism with *Toxoplasma gondii* stimulates mammalian-target-of-rapamycin-dependent host cell growth despite impaired signalling to S6K1 and 4E-BP1. *Cell Microbiol*. 2009 Jun;11(6):983–1000.
175. Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, Heller H, Hershko J, Luca FC, et al. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell*. 1995 Feb;6(2):185–97.
176. Simpson-Lavy KJ, Oren YS, Feine O, Sajman J, Listovsky T, Brandeis M. Fifteen years of APC/cyclosome: a short and impressive biography. *Biochem Soc Trans*. 2010 Feb;38(Pt 1):78–82.
177. Listovsky T, Brandeis M, Zilberstein D. *Leishmania* express a functional Cdc20 homologue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 29;408(1):71–7.
178. Kumar P, Wang CC. Depletion of anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C) subunit homolog APC1 or CDC27 of *Trypanosoma brucei* arrests the procyclic form in metaphase but the bloodstream form in anaphase. *J Biol Chem*. 2005 Sep 9;280(36):31783–91.
179. Hammarton TC. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 May;153(1):1–8.
180. Weber M, Blair E, Simpson C V, O'Hara M, Blackburn PE, Rot A, et al. The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. *Mol Biol Cell*. 2004 May;15(5):2492–508.
181. Bachelerie F, Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Murphy PM, Nibbs R, et al. An atypical addition to the chemokine receptor nomenclature: IUPHAR Review 15. *Br J Pharmacol*. 2015 Aug;172(16):3945–9.
182. Salvi V, Sozio F, Sozzani S, Del Prete A. Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:148.
183. Karin N, Wildbaum G, Thelen M. Biased signaling pathways via CXCR3 control the development and function of CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol*. 2016;99(6):857–62.
184. D'huys T, Claes S, Van Loy T, Schols D. CXCR7/ACKR3-targeting ligands interfere with X7 HIV-1 and HIV-2 entry and replication in human host cells. *Heliyon*. 2018 Mar;4(3):e00557.
185. Kutty RK, Samuel W, Abay R, Cherukuri A, Nagineni CN, Duncan T, et al. Resveratrol attenuates CXCL11 expression induced by proinflammatory cytokines in retinal pigment epithelial cells. *Cytokine*. 2015 Aug;74(2):335–8.
186. Moafi M, Rezvan H, Sherkat R, Taleban R, Asilian A, Hamid Zarkesh-Esfahani S, et al. Comparison of pro-inflammatory cytokines of non-healing and healing cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol*. 2017 Apr;85(4):291–9.
187. Roebrock K, Sunderkötter C, Münck N-A, Wolf M, Nippe N, Barczyk K, et al. Epidermal expression of I-TAC (Cxcl11) instructs adaptive Th2-type immunity. *FASEB J*. 2014 Apr;28(4):1724–34.
188. Nguyen Hoang AT, Liu H, Juaréz J, Aziz N, Kaye PM, Svensson M. Stromal cell-derived CXCL12 and CCL8 cooperate to support increased development of regulatory dendritic cells following *Leishmania* infection. *J Immunol*. 2010 Aug 15;185(4):2360–71.
189. Meunier E, Broz P. Interferon-induced guanylate-binding proteins promote cytosolic lipopolysaccharide detection by caspase-11. *DNA Cell Biol*. 2015 Jan;34(1):1–5.
190. Prakash B, Praefcke GJ, Renault L, Wittinghofer A, Herrmann C. Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):567–71.
191. Man SM, Place DE, Kuriakose T, Kanneganti T-D. Interferon-inducible guanylate-binding proteins at the interface of cell-autonomous immunity and inflammasome activation. *J Leukoc Biol*. 2017;101(1):143–50.
192. Kim B-H, Chee JD, Bradfield CJ, Park E-S, Kumar P, MacMicking JD. Interferon-induced guanylate-binding proteins in inflammasome activation and host defense. *Nat Immunol*. 2016 May;17(5):481–9.
193. Jayakumar A, Donovan MJ, Tripathi V, Ramalho-Ortigao M, McDowell MA. *Leishmania* major infection activates NF-kappaB and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells.

- Infect Immun. 2008 May;76(5):2138–48.
194. Frank B, Marcu A, de Oliveira Almeida Petersen AL, Weber H, Stigloher C, Mottram JC, et al. Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. *Parasit Vectors*. 2015 Jul 31;8:404.
 195. Garib FY, Rizopulu AP, Kuchmiy AA, Garib VF. Inactivation of Inflammasomes by Pathogens Regulates Inflammation. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(11):1326–39.
 196. Reinhard K, Huber M, Lohoff M, Visekruna A. The role of NF- κ B activation during protection against *Leishmania* infection. *Int J Med Microbiol*. 2012 Oct;302(4–5):230–5.
 197. Hallé M, Gomez MA, Stuiblé M, Shimizu H, McMaster WR, Olivier M, et al. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. *J Biol Chem*. 2009 Mar 13;284(11):6893–908.
 198. Gomes CM, Ávila LR, Pinto SA, Duarte FB, Pereira LIA, Abrahamsohn IA, et al. *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol*. 2014;36(5):225–31.
 199. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3720–32.
 200. Kautz-Neu K, Kostka SL, Dinges S, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. A role for leukocyte-derived IL-1RA in DC homeostasis revealed by increased susceptibility of IL-1RA-deficient mice to cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol*. 2011 Aug;131(8):1650–9.
 201. Sun S-C. Ubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):501–11.
 202. Srivastav S, Kar S, Chande AG, Mukhopadhyaya R, Das PK. *Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response. *J Immunol*. 2012 Jul 15;189(2):924–34.
 203. Duong BH, Onizawa M, Osés-Prieto JA, Advincula R, Burlingame A, Malynn BA, et al. A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity*. 2015 Jan 20;42(1):55–67.

