KELY CATARINE MATTEUCCI

**Papel de NLRP3 no controle da autofagia durante a
infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof.^a Karina Ramalho Bortoluci

Versão Original.

São Paulo

RESUMO

Matteucci KC. Papel de NLRP3 no controle da autofagia durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. [tese (Doutorado em Imunologia)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo- 2018.

Autofagia e ativação dos inflamassomas são dois processos celulares autônomos, que podem interagir entre si. Estes processos participam ativamente do controle de infecções ocasionadas por diversos patógenos intracelulares. Anteriormente, descrevemos o inflamassoma NLRP3 no controle do *T. cruzi*, agente causador da Doença de Chagas. Entretanto, o papel da autofagia nesse controle não era conhecido. Neste trabalho, foi demonstrado que o *T. cruzi* induz aumento da expressão de LC3-II, formação de autofagossomas e autolisossomos em macrófagos peritoneais (MPs) de camundongos C57BL/6 selvagens. Ainda, a manipulação farmacológica da autofagia interferiu com a capacidade dos MPs em controlar a infecção pelo *T. cruzi*, apontando esse processo como um mecanismo efetor envolvido no controle do protozoário por macrófagos. Nesse contexto, NLRP3 parece funcionar como um modulador do processo autofágico. Na ausência de NLRP3, a manipulação farmacológica da autofagia não interferiu no controle do *T. cruzi* por MPs. Isso se correlacionou ao fato do fluxo autofágico se encontrar interrompido em MPs de camundongos deficientes para NLRP3 em resposta à infecção, mas não em resposta à rapamicina e *starvation*. A razão do bloqueio no fluxo autofágico parece ser a incapacidade de MPs deficientes em NLRP3 em formar autolisossomos, fato visualizado em microscopia confocal e eletrônica. Interessante, NLRP3 parece agir independente de caspase-1/11 na regulação da autofagia. Por outro lado, a análise da expressão de genes autofágicos por PCR-array revelou que MPs de animais deficientes em NLRP3 apresentam alta expressão basal de genes relacionados com a formação e maturação de autofagossomas e autolisossomas. Em contrapartida, a infecção pelo *T. cruzi* inibe a expressão desses genes na ausência de NLRP3, ao contrário da indução observada em MPs selvagens. Juntos, esses dados mostram que NLRP3 induz autofagia funcional em resposta ao *T. cruzi*, sendo sua presença fundamental para impedir o escape do parasita pela inibição de genes autofágicos.

Palavras-chaves: NLRP3. Inflamassoma. Autofagia. *T. cruzi*. Macrófagos.

ABSTRACT

Matteucci KC. The role of NLRP3 in the control of autophagy during *T. cruzi* infection. [tese (Doutorado em Imunologia)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo- 2018.

Autophagy and inflammasome activation are two cell-autonomous and cross-regulated processes involved in host resistance against infections. Our group previously described that NLRP3 inflammasome is required for the control of *T. cruzi*, causative agent of Chagas disease. However, the involvement of autophagy in this process was largely unknown. Here, we demonstrated that *T. cruzi* is able to induce an increase in LC3II expression, formation of autophagosome and autolysosomes in peritoneal macrophages (PMs) from C57BL/6 mice. Moreover, the pharmacological modulation of autophagic machinery influenced the trypanocidal ability of PMs, pointing out autophagy as an effector mechanism to control *T. cruzi* infection. In this sense, NLRP3 seems to be involved in the modulation of the autophagic process. In the absence of NLRP3, the pharmacological modulation of autophagy did not interfere in the control of *T. cruzi* by PMs. Furthermore, autophagic flux is blocked in these cells in response to infection, but not in response to rapamycin and starvation. In fact, whereas *T. cruzi* induces the formation of large autolysosomes (LC3⁺ and *LysoTracker*⁺)-containing amastigotes in WT macrophages, only small and single positive vesicles are found in the absence of NLRP3. Interesting, NLRP3 appears to act independently of caspase-1/11 on the regulation of autophagy. On the other hand, the PCR-array analysis of autophagic genes demonstrated that NLRP3^{-/-} PMs have higher basal expression of genes related to the formation and maturation of autophagosomes and autolysosomes in comparison to WT cells. In contrast, *T. cruzi* inhibited the expression of these genes in the absence of NLRP3, unlike the induction observed in WT PMs. Together, these data show that NLRP3 induces functional autophagy in response to *T. cruzi*, being its presence required to overcome the escape of the parasite by preventing its inhibition of autophagic genes.

Keywords: NLRP3. Inflammasome. Autophagy. *T. cruzi*. Macrophages.

1.1 A Doença de Chagas.

1.1.1 Breve histórico.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), protozoário intracelular da família *trypansomatidae*, possui DNA mitocondrial expandido, o cinetoplasto, sendo essa característica que o divergiu dos primeiros eucariotos (1,2). Estima-se que a existência desses protozoários na América seja superior a 10 milhões de anos (3). Entretanto, o seu descobrimento como agente causador da Doença de Chagas se deu há pouco mais de cem anos, pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, no interior de Minas Gerais. A partir desse momento começaram os estudos em busca de um melhor entendimento sobre esse parasito (4,5).

É estimado que a Doença de Chagas começou a ser transmitida para humanos há 10 mil anos devido ao começo dos hábitos sedentários, das atividades agrícolas, e da domesticação de animais pelos povos andinos (3,6). Os animais e o armazenamento de grãos começaram a atrair hematófagos para perto do homem, incluindo os triatomíneos, os vetores do *T. cruzi* (3). Os triatomíneos, por sua vez, se adaptaram nesse novo habitat, encontrando ótimas condições para sobrevivência e reprodução nas habitações de barro e palha (7).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que no ano de 2015 aproximadamente 6 milhões de pessoas estão infectadas com o *T. cruzi* e 70 milhões vivem em áreas de risco, sendo a taxa de mortalidade de 10 mil por ano (8). Além do impacto considerável na morbidade e mortalidade dessa doença, a OMS a classifica como negligenciada, pois menos de 1% dos indivíduos infectados possuem acesso ao diagnóstico e ao tratamento (8,9), sendo um dos principais problemas de saúde pública e socioeconômico (10,11).

Na América Latina, dentre as doenças parasitárias, a Doença de Chagas é considerada como principal fator de morte, tendo 21 países endêmicos (Figura 1) (8). Argentina, Bolívia, Brasil e México são os países com o maior índice de prevalência da doença, tendo 71% dos casos (4,2 milhões de pessoas infectadas) (Figura 1) (12). Como consequência da globalização e da grande diversidade genética do parasito há uma ampla distribuição da doença com cenários epidemiológicos distintos, não apenas na América Latina, mas também em outras

regiões não-endêmicas, como: América do Norte, Europa, Japão e Austrália (Figura 1) (13–18).

Figura 1: Globalização da Doença de Chagas.

Distribuição global de pessoas infectadas com o *T. cruzi*. Dados estatísticos entre os anos de 2006-2010. Fonte: *Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases*, (2013) (19).

1.1.2 Transmissão do parasito.

Inicialmente, o *T. cruzi* começou a ser transmitido pela via vetorial através do triatomíneo, conhecido popularmente como barbeiro. Em áreas endêmicas há três espécies principais do inseto, distribuídos tanto em áreas florestais quanto em áreas mais secas (10).

Hoje sabe-se que a transmissão também pode se dar através de outras vias, que não incluem o inseto, principalmente em áreas não-endêmicas. A transmissão pode ser congênita ou vertical, que acontece quando a mãe passa para o filho (10). A taxa média de transmissão em países não-endêmicos é de aproximadamente 6%,

e pode ser ainda maior em áreas endêmicas, visto que não se tem o controle absoluto dos dados estatísticos nessas regiões (10). Estudos mostram que há 9 mil novos casos todos os anos apenas através da transmissão congênita (8,20).

Outra via importante para a transmissão do *T. cruzi* é a oral (9,10). A transmissão oral se dá através de alimentos e/ou bebidas contaminadas com as fezes de triatomíneos contendo o parasito (9,10). Visto que a via de entrada pela transmissão oral é a mucosa, a Doença de Chagas, nesse caso, apresenta-se de forma mais severa com mortalidade maior do que a transmitida via vetor (9,10).

Além dessas vias, há a transmissão por acidentes laboratoriais ou iatrogênica (9,10). Iatrogênica tem por significado qualquer “dano” causado relacionado a um determinado tratamento médico (21). Nesse caso, pode se dar através de transfusão sanguínea e/ou componentes do sangue, ou transplantes de órgãos provindos de pessoas infectadas com o parasito (9,10,22).

1.1.3 Desenvolvimento do ciclo celular do *T. cruzi*.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, possuindo quatro estágios morfológicos (10). Inicia-se no triatomíneo através da ingestão de sangue proveniente de indivíduos infectados com a forma sanguínea, tripomastigota, do parasito (Figura 2 – etapa 1). No intestino do triatomíneo, tripomastigotas diferenciam-se na forma replicativa, epimastigotas (Figura 2 – etapa 2). Após replicação, epimastigotas diferenciam-se em sua forma infectante, os tripomastigotas metacíclicos (Figura 2 – etapa 3). Os metacíclicos são depositados junto com as fezes do vetor no momento em que se alimentam do sangue do mamífero (Figura 2 – etapa 4). A saliva do triatomíneo possui componentes que causam coceira, fazendo com que o indivíduo, ao ser picado, coce o local permitindo a entrada do parasito em seu organismo através do orifício formado pela picada (10). Tripomastigotas metacíclicos são flagelados o que permite grande mobilidade e, também, possuem a habilidade de infectar qualquer célula nucleada do hospedeiro mamífero (10). Ao invadir a célula do hospedeiro assumem sua forma intracelular replicativa, a amastigota, que não possui flagelo (Figura 3) (10).

Figura 2: Ciclo celular do *T. cruzi* no triatomíneo.

O ciclo celular do *T. cruzi* no triatomíneo pode ser dividido em quatro etapas. Etapa 1: Triatomíneo ingeri sangue contendo tripomastigotas. Etapa 2: Tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas. Etapa 3: Epimastigotas replicam-se e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos. Etapa 4: Tripomastigotas metacíclicos são depositados junto com as fezes do inseto no momento em que eleingere o sangue do indivíduo. Fonte: Adaptado de Bern (2011) (23).

No homem, assim que a forma extracelular do parasita, tripomastigota, invade a célula hospedeira é formado um vacúolo parasitóforo, do qual o protozoário tem a habilidade em escapar (Figura 3) (10). Após a evasão, o parasito aloja-se no citoplasma celular, local em que assume a forma intracelular, amastigota (Figura 3) (10). A amastigota replica-se pelo processo de divisão binária, que posteriormente irá se diferenciar, novamente, em tripomastigotas até o momento em que a célula hospedeira não suporte a carga parasitária sofrendo ruptura em sua membrana plasmática (Figura 3). A ruptura na membrana celular permite a liberação dos

parasitos para o meio extracelular, sendo estes capazes de invadir outras células, fechando assim o ciclo celular (Figura 3) (10).

Figura 3: Ciclo celular do *T. cruzi* em células nucleadas de mamíferos.

Células nucleadas ao serem invadidas por tripomastigotas formam um vacúolo parasitóforo. Tripomastigotas tem habilidade de escapar do vacúolo e se alocar no citoplasma da célula, local em que assumem a forma replicativa- amastigota. Após replicação, as amastigotas transformam-se novamente em tripomastigotas. As células nucleadas sofrem rupturas em sua membrana plasmática, liberando os parasitos para o meio extracelular. No meio extracelular tripomastigotas podem invadir outras células nucleadas, reiniciando o ciclo celular. Fonte: Autoria própria, Matteucci (2018). Modelo de célula e tripomastigotas são do banco de dados de ilustrações disponibilizados pela Servier em:< www.fcienicias.com>. Acessado em Agosto de 2015.

1.1.4 Trajetória clínica da Doença de Chagas.

O curso clínico da Doença de Chagas é dividido em duas fases: aguda e crônica. Após o período de incubação, por volta de 1-3 semanas, se dá a fase aguda com duração de 4 a 8 semanas, e é assintomática na maioria dos casos (Figura 4) (10). Nos casos sintomáticos o quadro clínico inclui febre, calafrios, náuseas, vômitos, diarreia e erupção cutânea (9,10). Em alguns casos, pode observar lesão inflamatória no local da inoculação (chagoma), edema palpebral unilateral (sinal de

Romaña), conjuntivite, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (9,10). A versão grave dessa fase pode ocorrer em menos de 5% dos pacientes sintomáticos, e inclui miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite; sendo fatal em 2% dentre esses indivíduos (9).

Geralmente, na fase aguda há o controle da infecção através da ativação do sistema imunológico (Figura 4). A resposta inflamatória é intensa, e depende tanto dos componentes pertencentes à imunidade inata quanto da imunidade adaptativa (2,24). Neste sentido, vale destacar os macrófagos e as células dendríticas, que se encontram amplamente distribuídos nos diversos tecidos do hospedeiro, e desempenham um papel crucial no reconhecimento, na fagocitose, na produção de citocinas pro-inflamatórias e na apresentação de antígenos para os linfócitos T e B. Os linfócitos, por sua vez, são capazes de ativar diferentes tipos celulares, matar células infectadas pelo parasito e produzir anticorpos (2,24). Devido a essa intensa resposta imunológica, a carga parasitária diminui significativamente, não sendo mais detectável no sangue (Figura 4) (9,10).

A persistência da infecção junto com a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro pode ocasionar progressão do quadro clínico e, após décadas, o indivíduo pode entrar na fase crônica da doença (Figura 4) (9,10,24).

A fase crônica, assim como a aguda, pode ser assintomática, ou sintomática (9,10). No caso dos indivíduos assintomáticos, eles não desenvolvem nenhum sintoma, mas são capazes de transmitir o parasito (Figura 4) (10). Já os indivíduos sintomáticos constituem 30% dos casos, e possuem quadro clínico relacionado com cardiomiopatias e patologias no trato digestivo (9,10).

Figura 4: Progressão das fases da Doença de Chagas relacionada com a resposta imunológica.

A Doença de Chagas pode ser dividida em duas fases. A fase aguda manifesta-se nos primeiros meses e caracteriza-se pela presença de alta carga parasitária (verde). Devido a resposta imunológica contra o parasito, a carga parasitária diminui podendo ser indetectável. Após anos, o indivíduo pode ou não manifestar sintomas na fase crônica. Em média 30% dos pacientes desenvolvem quadro clínico severo (azul). m (meses) e y (anos). Fonte: Chatelain (2016) (9).

1.2 Receptores da imunidade inata envolvidos no reconhecimento do *T. cruzi*.

A resposta imunológica contra o parasito é complexa, envolvendo diversos fatores que não estão completamente elucidados (2). Macrófagos e células dendríticas são responsáveis pelo reconhecimento inicial deste protozoário, através de receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs), que são proteínas altamente conservadas (2,25).

Esses receptores possuem a habilidade de reconhecer tanto padrões moleculares associados aos patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns* - PAMPs), estruturas comuns aos patógenos e ausentes nas células do hospedeiro, quanto de detectar sinais de distúrbios fisiológicos na célula do hospedeiro,

conhecidos como padrões moleculares associados ao dano (*Damage Associated Molecular Patterns* - DAMPs) (26,27).

Os PRRs estão localizados em distintos compartimentos celulares, podendo ser classificados em PRRs membranares ou PRRs intracelulares (Figura 5) (28). Dentre esses, há um destaque para duas grandes famílias: receptores do tipo *Toll* (*Toll-like Receptors* – TLRs) e do tipo NLR (*Nucleotide-binding domain Leucine-rich repeat containing Receptors*) (Figura 5) (26,29).

Figura 5: Localização celular dos PRRs.

Os TLRs são receptores membranares, distribuídos entre a membrana plasmática e a membrana endossomal. Já os NLRs são receptores citosólicos, distribuídos pelo citoplasma celular. Fonte: Adaptado de Bortoluci e Medzhitov (2010) (25) e Zhong *et. al.*(2013) (30).

1.2.1 TLRs no controle do *T. cruzi*.

A família dos TLRs é composta por treze membros, sendo TLR11, TLR12 e TLR13 expressos apenas em camundongos e TLR10 expresso apenas em humanos (31). Esses receptores estão presentes na membrana plasmática celular, ou na membrana de vesículas endossomais (Figura 5) (32). Cada TLR é capaz de

reconhecer ligantes específicos, sendo estes conservados em todos os patógenos (32).

Estes receptores são caracterizados por possuírem: um domínio extracelular N-terminal do tipo LRR (LRRs- *leucine-rich repeats*), responsável pela ligação com seu agonista, e um domínio intracelular C-terminal (TIR- *Toll/IL-1 receptor*), sendo este capaz de recrutar e interagir com proteínas adaptadoras específicas, como: MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) quando há o reconhecimento de PAMPs por estes receptores (31–34).

Essas moléculas adaptadoras permitem a interação proteína-proteína, responsáveis pela formação da cascata de sinalização que induz à ativação dos fatores de transcrição, como: NF- κ B (*Nuclear factor kappa enhancer binding protein*) e IRFs (*IFN-responsive factors*). A ativação destes leva a indução da transcrição dos genes pró-inflamatórios, tendo como consequência a produção de moléculas efetoras essenciais para o ambiente inflamatório frente a uma infecção, e também se fazem necessárias na condução da resposta imune adaptativa (35,36).

A importância dos TLRs na resistência a infecção pelo *T. cruzi* é apoiada por observações que camundongos deficientes da proteína adaptadora MyD88 mostram-se mais vulneráveis a esta infecção (37). Porém, alguns dos receptores TLRs se mostram mais importantes que outros no controle da infecção, como: TLR2 (38,39), TLR3, TLR4 (40,41), TLR7 (42) e TLR9 (39), cujos animais deficientes para estas proteínas possuem maior susceptibilidade ao *T. cruzi* em relação aos camundongos selvagens.

Alguns trabalhos identificaram quais são os antígenos presentes no parasito que estes receptores são capazes de reconhecerem. O TLR2 foi relatado em reconhecer a proteína Tc52 (43) e âncoras de GPI (*glicosilfosfatidilinositol*) presentes na superfície da membrana dos tripomastigotas (38). O TLR4 mostrou ser importante para o reconhecimento de outro membro da família de GPI, os GIPLs (*glicoinositolfosfolipideo*) presentes na superfície da membrana dos epimastigotas (41). O TLR7 e TLR9 são responsáveis pelo reconhecimento do material genético do parasita, na presença de RNA purificados (42) ou de motivos de CpG não metilados (39), respectivamente.

1.2.2 NLRs no controle do *T. cruzi*.

NLRs possuem localização citosólica e são formados por 3 domínios: o domínio C-terminal composto por sequências ricas em leucinas (LRR), o domínio central do tipo NOD comum a todos os membros é responsável pela oligomerização proteica, e o domínio N-terminal é responsável pela especificidade das suas interações moleculares e, conseqüentemente, pelas suas funções efetoras (Figura 6) (27). De acordo com o domínio N-terminal são agrupados em subfamílias: NLRA (*NLRs containing acid transactivation - CIITA*), NLRBs (*NLRs containing a baculovirus inhibitor repeat- BIR*), NLRCs (*NLR caspase activating and recruitment domain- (CARD) domain containing*) e NLRPs (*NLR pyrin domain (PYD) containing*) (Figura 6) (27,30). A via de sinalização induzida pelos NLRs depende do tipo de molécula adaptadora recrutada(44–46)

Figura 6: Estrutura dos NLRs.

Os NLRs são compostos por 22 membros sendo que cada receptor é composto por 3 domínios. Da esquerda para a direita, um domínio N-terminal, um domínio central tipo NOD e um domínio C-terminal. De acordo com o seu domínio N-terminal, os receptores são subdivididos em subfamílias: NLRA, NLRB, NLRC e NLRP. Fonte: Adaptada de Zhong *et. al.* (2013) (30).

NOD1 e NOD2 induzem a ativação da cascata de sinalização do NF- κ B, dependente da proteína adaptadora Rip2, levando a secreção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (47).

Foi demonstrado que animais deficientes em NOD1, mas não em NOD2, são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (48). Esses animais exibem alta carga parasitária e alta taxa de mortalidade quando comparados aos animais selvagens (48). Entretanto, até o exato momento não se sabe o mecanismo pelo qual NOD1 medeia o controle da infecção.

1.2.2.1 Formação do complexo inflamassoma, proveniente da ativação de alguns dos NLRs.

NLRPs e o NLRC4, que no estado celular basal permanecem em um estado inativado através da conformação do domínio LRR, quando ativados são capazes de formar um complexo multiprotéico denominado inflamassoma (Figura 7) (27,46). Na presença de seus agonistas específicos, sofrem mudança conformacional, expondo seu domínio efetor o que permite interações heterodiméricas e, posteriormente, oligoméricas (Figura 7)(46).

Figura 7: Formação do complexo inflamassoma.

A ativação de NLRPs e NLRC4 por ligantes ou alterações citoplasmáticas faz com que mudem sua conformação estrutural. A mudança conformacional permite a interação com a molécula adaptadora ASC e recrutamento da protease caspase-1 por interações homotípicas, caracterizando a formação do complexo multiprotéico, denominado inflamassoma. Fonte: Adaptado de Ting *et. al.* (2008) (49).

Os NLRPs, que possuem domínio efetor PYD (Figura 6), recrutam a molécula adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) pela interação homotípica entre os domínios PYD (Figura 7) (27,46,50).

Simultaneamente, o domínio CARD de ASC recruta e liga-se na forma imatura da protease caspase-1, também por ligação homotípica (Figura 7) (27,46,50). Todas essas moléculas juntas formam o complexo do inflamassoma (Figura 7) (46). Importante mencionar que proteínas da família PYHIN (*Pyrin and HIN domain-containing protein*), como AIM2 (*Absent in Melanome 2*) e PYHIN também formam complexos inflamassomas por interações homotípicas entre os domínios da proteína e molécula adaptadora ASC. Vale ressaltar que o NLRC4, por possuir seu domínio efetor CARD (Figura 6), pode recrutar ASC ou interagir diretamente com caspase-1 (46).

Caspase-1 é uma protease presente no citoplasma celular em sua forma inativa, a pró-caspase-1 (46). Após ser recrutada para o complexo do inflamassoma, sofre auto clivagem proteolítica transformando-se em um heterodímero enzimaticamente ativo (46). Caspase-1 ativada medeia a clivagem das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, sendo estas secretadas pela célula (Figura 8) (46).

Figura 8: Mecanismos efetores clássicos mediados pela caspase-1 ativa.

A forma ativa da caspase-1 cliva os substratos pro-IL-1 β , pro-IL-18 e gasdermina D (GsmD). A clivagem das citocinas permite a sua maturação e secreção. O fragmento N-terminal da GsmD se insere na membrana celular, permitindo a formação de poros e induzindo o processo de morte celular denominado piroptose. Fonte: Adaptado de Broz e Dixit (2016) (50).

Adicionalmente, a ativação dos inflamassomas pode induzir um processo de morte celular denominada piroptose (Figura 8) (46,51,52). A piroptose é classificada

como um processo pró-inflamatório, pois ao final a membrana plasmática celular é rompida liberando todo o conteúdo intracelular para o meio extracelular, induzindo a ativação de células vizinhas (46). Recentemente, foi mostrado a participação da gasdermina D (GsdMD) nesse processo, sendo esta um substrato de caspases inflamatórias (53–57). A clivagem de GsdMD pela caspase-1/11 ativa resulta na liberação do fragmento N-terminal que interage com lipídeos presentes na membranas celulares, direcionando a formação de poros (Figura 8) (53–57).

Indução de piroptose e secreção de IL-1 β e IL-18 são os mecanismos efetores mediados pelo inflamassoma melhor descritos na literatura, porém, nos últimos anos, nosso grupo e outros têm mostrado que os inflamassomas são capazes de ativar diversas respostas efetoras como a produção de moléculas microbidas e mediadores lipídicos pelos macrófagos ativados (58,59), regulação de genes inflamatórios por modificações epigenéticas dependente da ativação da caspase-1 (60), a acidificação do fagossoma (61), indução de diversos processos de morte celular (62–64); entre outros (50,65–67).

1.2.2.1.1 O inflamassoma NLRP3 e seu papel na infecção pelo *T. cruzi*.

A ativação de NLRP3 requer um primeiro sinal, proveniente de estímulos extracelulares, para a indução transcricional do mesmo (50). A proteína NLRP3 possui a habilidade de responder a diversos estímulos com classes distintas (DAMPs ou PAMPs) (27,50). Já foram descritos na literatura os seguintes agonistas de NLRP3: cristais de ácido úrico (68), alúmen (69,70), sílica (71), ATP extracelular (68), toxinas bacterianas formadoras de poros (72–74), dupla fita de RNA viral presente no citoplasma (75,76). Sua ativação também já foi descrita na presença de patógenos de diversas classes, como: vírus, fungos, bactérias e protozoários (50,76–78), incluindo o *T. cruzi* (77,78).

O modo em que se dá a ativação do NLRP3 é ainda muito debatido. Por mais que hajam diversos trabalhos na literatura que discorram sobre seus agonistas, nenhum deles descreve de fato como ou o que o NLRP3 reconhece ou “sente”. Atualmente, a teoria mais aceita é que ele responda a eventos celulares comuns acionados por todos os seus agonistas (45,66).

Eventos que englobam dano mitocondrial, desestabilização lisossomal, mudanças nos níveis de cálcio intracelular e, especialmente, efluxo de potássio estão envolvidos com a ativação de NLRP3. Assim, NLRP3 é reconhecido como um sensor e não como um receptor capaz de reconhecer ou se ligar diretamente ao antígeno específico (45,79). No caso da infecção pelo *T. cruzi*, há evidências que a via lisossomal pode estar envolvida, uma vez que: (1) a secreção de IL-1 β *in vitro* foi inibida na presença do CA-07ME (inibidor de catepsinas) (77) e (2) há o recrutamento de lisossomos para a membrana plasmática no local onde está acontecendo a invasão celular pelo parasita, visto que o ambiente ácido do lisossomo facilita a passagem do *T. cruzi* do vacúolo parasitóforo para o citoplasma da célula do hospedeiro (80) (Figura 9).

NLRP3, caspase-1/11 (77,78) e ASC (78) estão envolvidos no controle do *T. cruzi* (Figura 9). Camundongos deficientes nessas moléculas apresentaram altos níveis de parasitemia (77) e mortalidade (78) em comparação aos camundongos selvagens. Adicionalmente, animais ASC^{-/-} e caspase-1/11^{-/-} tiveram alta carga parasitária e inflamação nos tecidos cardíacos (78). *In vitro*, macrófagos infectados com *T. cruzi* secretam IL-1 β de maneira dependente do receptor NLRP3 (77,78), caspase-1/11 (77) e ASC (78). Na ausência de NLRP3 ou caspase-1/11, os macrófagos falham em controlar a infecção, apresentando um aumento significativo de sua carga parasitária em relação aos macrófagos selvagens, como consequência da deficiência na produção de NO (77).

Figura 9: PRRs envolvidos no controle do *T. cruzi*.

Ativação dos receptores TLRs e NOD1 induzem a cascata de ativação que culminam na ativação do fator de transcrição NF-κB necessário para a produção de citocinas pró-inflamatórias. O parasito também pode induzir a ativação do receptor NLRP3 através de um mecanismo ainda não elucidado. A ativação de NLRP3 leva a clivagem de caspase-1, que faz o processamento da pró-IL-1β e produção de NO. Fonte: Zamboni e Lima-Junior (2015) (81).

1.3 A via autofágica.

A autofagia é um processo homeostático altamente conservado em todos os eucariotos (82). O processo autofágico é catabólico, que leva a degradação dos próprios componentes celulares quando necessário, e de diferentes patógenos intracelulares, proporcionando a homeostasia celular (25,83–87).

Em mamíferos, a via autofágica é classificada em três tipos: microautofagia, macroautofagia (daqui adiante citada apenas como autofagia) e a mediada por chaperonas (CMA), sendo cada uma distinta morfologicamente (Figura 10). A microautofagia acontece através de invaginações formadas na membrana lisossomal usadas para capturar diretamente o cargo (Figura 10) (88). CMA utiliza

chaperonas para identificar estruturas particulares no cargo que será degradado, sendo este capturado e levado para o lisossoma (Figura 10) (89). Já a autofagia é um processo celular mais complexo, que envolve diversas proteínas autofágicas com o intuito de formar vesículas compostas por membrana-dupla, os autofagossomas, utilizado para sequestrar o cargo e transportá-lo para o lisossoma, onde as vesículas irão se fundir formando os autolisossomas, responsáveis pela degradação do cargo (Figura 10) (90–93).

Figura 10: As diferentes vias de degradação celular.

Em mamíferos, a autofagia pode ser classificada como microautofagia, quando o lisossoma degrada diretamente componentes intracelulares; macroautofagia, caracterizada pela formação de autofagossomas e autolisossomas que degradam o material englobado e autofagia mediada por chaperonas (CMA) que se ligam à proteína que será degradada. Fonte: Parzych e Klionsky (2014) (82).

1.3.1 Breve descrição das etapas que conduzem a autofagia.

A etapa inicial desta via envolve a formação e maturação do autofagossoma. Esse processo ocorre através do recrutamento de diversas proteínas autofágicas (*Autophagy-Related-Genes* -ATGs) para o local de formação do autofagossoma (82,94). As ATGs formam diferentes complexos proteicos que compõe a membrana

do autofagossoma. Nesta etapa há o destaque para três grandes complexos (Figura 11) (94,95).

Primeiro, é formado o complexo ULK (*UNC-51-like kinase*), composto pelas seguintes proteínas: ATG13, FIP200, ATG101 e ULK1 ou 2 (Figura 11- ULK1/2 complex) (82,94) seguido pela ativação da via do PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinases*) classe III, que como consequência gera a proteína Vps34, a qual junto com a Vps15, Beclin1 e ATG14L formam outro complexo também responsável pelo sequestro de proteínas autofágicas para a formação do autofagossoma (Figura 11- *Class III PI3K complex*) (94).

Outro complexo, também, essencial nesta etapa é o sistema de conjugação da ATG12 (94). A ATG7, uma enzima tipo ubiquitina E1, e a ATG10, uma enzima tipo ubiquitina E2, conjugam a ATG5 com a ATG12, e este complexo recém-formado se liga não- covalentemente a ATG16L1 (Figura 11- ATG12-ATG5-ATG16L1 complex) (92,94). Este complexo recruta outras proteínas autofágicas responsáveis também pela formação e maturação do autofagossoma.

Figura 11: Complexos proteicos que compõe a etapa inicial da autofagia.

Os complexos ULK1/2 e PI3K classe III possuem a função de iniciar o processo de formação do autofagossoma recrutando outras proteínas autofágicas (ATGs). Após a ativação desses dois complexos, o complexo ATG-12-ATG5-ATG16L1 é formado, iniciando o recrutamento

de outras ATGs necessárias para a maturação da vesícula autofágica. Fonte: Adaptado de Parzych e Klionsky (2014) (82).

Em condições normais, estes complexos são inibidos pela proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*), por fosforilação. Quando o mTOR é inativado há a desfosforilação parcial dessas proteínas iniciando a formação deste complexo, induzindo a autofagia (Figura 12) (94).

Figura 12: mTOR inibe a autofagia por fosforilação das proteínas autofágicas.

No estado basal, a proteína mTOR inibe a indução da via autofágica através da fosforilação dos complexos responsáveis por iniciar a formação do autofagossoma. Em condições onde a autofagia é induzida, o mTOR é inativado havendo a desfosforilação parcial dos complexos autofágicos, e consequentemente, iniciando a formação da vesícula. Fonte: Adaptado de Parzych e Klionsky (2014) (82).

A maturação da vesícula recém-formada se dá através da incorporação da proteína LC3 (*microtubule-associated-protein-1-light-chain-3-beta*) em sua membrana, sendo esta o indício de formação de autofagossomas maduros e utilizado por muitos autores como parâmetro da avaliação da autofagia (93,96,97).

Em condições fisiológicas, a LC3, chamada de LC3-I se encontra dispersa no citoplasma celular (94). No momento em que há a indução da autofagia esta proteína é recrutada pela proteína adaptadora p62 até o local da formação do autofagossoma, onde assume a forma lipídica, LC3II, ficando disposta tanto na membrana externa quanto na interna do autofagossoma (98). Além do envolvimento na formação do autofagossoma, a p62 também pode se ligar com proteínas poliubiquitinadas, levando-as para a degradação (98).

A etapa final da autofagia ocorre através da fusão vesicular do autofagossoma maduro com os lisossomos (Figura 13) (94). Assim que é formado por completo a vesícula autofágica, os lisossomos são recrutados para o local e fundem-se ao autofagossoma dando origem aos autolisossomos (94). Nesse momento o pH da vesícula é acidificado, havendo ativação de hidrolases e proteinases que atuam na degradação, dando por completa a via autofágica (94).

Figura 13: Etapa final da via autofágica.

Etapa final da autofagia acontece quando há a fusão do autofagossoma maduro com os lisossomos sendo formado os autolisossomos. Os componentes intracelulares, que foram capturados são degradados nos autolisossomos. Fonte: Adaptado de Ciechanover e Kwo (2015) (99).

1.3.2 O envolvimento da autofagia no controle de infecções.

A via autofágica pode ser ativada por patógenos intracelulares, como no caso da *Salmonella Typhimurium*, que pode escapar do vacúolo e ir para o citoplasma da célula do hospedeiro. A bactéria citosólica é ubiquitinada, permitindo o seu

reconhecimento pela p62, e esta recruta a LC3-I levando-as para o autofagossoma (94).

A p62 também se faz necessária para recrutar agregados de proteínas citosólicas que foram ubiquitinadas para os autolisossomos, onde são degradados em peptídeos antimicrobicidas, tóxicos para *Mycobacterium tuberculosis* (100). O processo de autofagia mostrou ser essencial para induzir a maturação dos fagossomas, o que permite a sua fusão com lisossomos e, assim, ultrapassa as estratégias desenvolvidas por alguns patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Toxoplasma gondii*, no intuito de escapar da resposta imune do hospedeiro (101,102).

Além do seu envolvimento no controle de patógenos, a autofagia tem sido relacionada a outros processos imunológicos, como: apresentação de antígenos, desenvolvimento de linfócitos e secreção de citocinas (87). Estudos mostram a interação de componentes autofágicos com a expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) classe II, mostrando a colocalização dos autofagossomas com o MHC II em células epiteliais do timo (103) e em células dendríticas (104). Ainda, células dendríticas de camundongos deficientes em ATG5 mostraram uma diminuição na ativação de linfócitos T CD4⁺ após a infecção com HSV-1 (*herpes simplex virus-1*), devido à fusão tardia do fagossoma com o lisossomo resultando em uma ineficiência no processamento e na apresentação do antígeno fagocitado (105).

A autofagia parece também estar envolvida na apresentação cruzada de antígenos via MHC classe I, resultando na ativação de linfócitos T CD8⁺. Trabalhos mostram que a indução de autofagia em macrófagos infectados com HSV-1 aumenta significativamente a apresentação cruzada de antígenos e consequentemente a ativação de linfócitos T CD8⁺ (106,107). Na infecção pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, onde os linfócitos T CD8⁺ são essenciais, acredita-se que a autofagia esteja envolvida com a apresentação de antígenos através de MHC I (108), além da captação e degradação dos parasitas citosólicos em autofagolisossomos (102,109).

Há poucos estudos a respeito do envolvimento das vias autofágicas na infecção pelo *T. cruzi*. O trabalho pioneiro nesse sentido mostrou que a entrada de tripomastigotas de cultura de tecidos (TCT) em células CHO induz o recrutamento de

LC3-II para os vacúolos parasitóforos (110). Ainda, a indução de autofagia por falta de nutrientes ou tratamento com rapamicina em momentos anteriores à infecção, induziu um aumento da invasão de linhagens celulares como CHO, HeLa e MEFs por TCT (110). Além disso, a inibição das proteínas ATG5 e Beclin1, envolvidas nas vias autofágicas inibe a invasão de tripomastigotas em linhagens de fibroblastos, provavelmente por interferir em vias lisossomais fundamentais para entrada de *T. cruzi* (110).

Esses dados mostram claramente o envolvimento da via autofágica no processo de invasão celular utilizado pelo *T. cruzi*.

Por outro lado, Martins e col. (2011) verificaram que a privação de nutrientes e o tratamento com rapamicina, ambos estímulos indutores de autofagia, têm efeitos opostos na invasão de células HeLa por tripomastigotas metacíclicos da cepa *CL Brener*. A privação de nutrientes induz a exocitose de lisossomos e aumenta a adesão de metacíclicos com HeLa, resultando no aumento da invasão. Já o pré-tratamento com rapamicina inibe a exocitose de lisossomos e também parece impedir a interação da glicoproteína gp82 do tripomastigota metacíclico com a célula HeLa, resultando na inibição da invasão (111). Apesar desses dados conflitantes demonstrando o envolvimento das vias autofágicas com a invasão do *T. cruzi*, para o nosso conhecimento não há estudos envolvendo o processo de autofagia com o controle da infecção por *T. cruzi* e ativação de células imunes como os macrófagos.

1.3.3 Interação entre os PRRs e a autofagia.

Diante de seu claro envolvimento em processos imunológicos, não há surpresa no fato de que os PRRs possam modular o processo de autofagia. Os TLRs têm sido descritos por seu papel na indução da autofagia. Em 24h de estímulo, uma importante indução de autofagia foi observada pela estimulação com POLY (I:C), agonista de TLR3; lipopolissacarídeo (LPS), ligante de TLR4 e RNA fita-simples, reconhecido por TLR7, sendo esta última, a estimulação de efeito mais potente (112). A indução de autofagia via TLR7 foi dependente da expressão de MyD88 e foi capaz de eliminar patógenos intracelulares que não estão normalmente associados à estimulação via TLR7. Um importante estudo observou que os receptores TLRs, através de suas proteínas adaptadoras, reduzem a interação entre

Beclin1 e Bcl-2 (proteína que se liga a Beclin1, inibindo a autofagia). Desta forma, a sinalização intracelular via TLR aumenta a interação de MyD88 e TRIF com Beclin1, desencadeando a via autofágica (113).

O papel dos inflamassomas na modulação da autofagia ainda é controverso na literatura. No entanto, o papel do processo autofágico na inibição da ativação dos inflamassomas está claramente demonstrado por diferentes grupos de pesquisa (114–116). Camundongos deficientes em proteínas autofágicas tem uma maior ativação da protease caspase-1, enquanto que indutores de autofagia inibem a ativação de caspase-1 mostrando efeito inibitório da autofagia na ativação dos inflamassomas (114,116). Um trabalho descreveu o mecanismo pelo qual a autofagia inibe a ativação dos inflamassomas (116). Os autores mostraram que o inflamassoma ativado por seu agonista pode ser ubiquitinado e se ligar à proteína p62, responsável pelo encaminhando do complexo para o autolisossomo, local que será degradado (116).

Por outro lado, os inflamassomas podem inibir ou promover a autofagia. BMDMs deficientes em caspase-1 ou deficientes em ASC quando primadas com LPS e tratadas com Poly(dA:dT) ou nigericina tiveram a expressão de LC3-II ligeiramente aumentada em relação às células selvagens (116). O receptor NLRC4 foi descrito por inibir a indução da autofagia devido a sua capacidade em se ligar a proteína autofágica Beclin1 (117). Na infecção ocasionada pela *Shigella*, o inflamassoma NLRC4 e a caspase-1 também regularam negativamente a autofagia em macrófagos (118). No entanto, em osteoclastos, a ausência de NLRP3 resulta na falha da indução de autofagia em resposta ao ácido úrico (119). Em adição, outro receptor inflamassoma, NLRP6, mostrou ser fundamental para a indução de autofagia em células do epitélio intestinal (120).

Para melhor compreender a interação entre os inflamassomas e autofagia, esse trabalho avaliou o papel do inflamassoma NLRP3 na modulação da autofagia em resposta ao *T. cruzi* e seu impacto na ativação de macrófagos e controle da infecção.

- 1.4 O protozoário *T. cruzi* induz autofagia funcional em MPs selvagens.
- 1.5 A autofagia auxilia no controle de *T. cruzi* pelos MPs.
- 1.6 Na ausência de NLRP3, a modulação farmacológica da autofagia não tem efeito no controle da infecção pelo *T. cruzi*.
- 1.7 NLRP3 é necessário para o desenvolvimento do fluxo autofágico em resposta ao *T. cruzi* mas é dispensável para o fluxo autofágico em resposta à rapamicina e *starvation*.
- 1.8 Caspase-1/11 não estão envolvidas no fluxo autofágico dependente de NLRP3 em resposta ao *T. cruzi*.
- 1.9 NLRP3 é fundamental para a formação de autolisossomas em resposta ao *T. cruzi*.
- 1.10 NLRP3 parece regular o processo autofágico via modulação da expressão de genes autofágicos.

Referências *

1. David Sibley L. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. Vol. 240, Immunological Reviews. 2011. p. 72–91.
2. Golgher D, Gazzinelli RT. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. Autoimmunity [Internet]. 2004;37(5):399–409. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621564>
3. Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl(June):9–16.
4. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [Internet]. 1909;1(2):159–218. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008
5. Moncayo Á. Carlos Chagas: Biographical sketch. Acta Trop. 2010;115(1–2):1–4.
6. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2004;101(7):2034–9. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0307312101>
7. Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The Process of Domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(SUPPL. 1):375–8.
8. World Health Organisation. WHO Chagas disease (American trypanosomiasis) Factsheet [Internet]. World Health Organisation. 2015. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
9. Chatelain E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? Comput Struct Biotechnol J [Internet]. 2017;15:98–103. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.002>
10. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. The Lancet. 2017;
11. Lee B, Bacon K, Bottazzi M, Hotez P. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. Lancet Infect Dis. 2013;13(4):342–8.
12. Pinheiro E, Brum-Soares L, Reis R, Cubides JC. Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. Vol. 50, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2017. p. 296–300.
13. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Trop. 2010;115(1–2):22–7.
14. Jackson Y, Pinto A, Pett S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. Trop Med Int Heal [Internet]. 2014;19(2):212–8. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/tmi.12235>
15. Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. Vol. 43, European Journal

* De acordo com o Estilo Vancouver.

- of Internal Medicine. 2017. p. 6–15.
16. Tanowitz HB, Weiss LM, Montgomery SP. Chagas disease has now gone global. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4).
 17. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
 18. Bern C, Montgomery SP. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009;49(5):e52–4. Available at: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/605091>
 19. WHO. Neglected tropical diseases. *Who*. 2013;2012(March):1–8.
 20. Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. Vol. 121, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2014. p. 22–33.
 21. Michaelis. *Moderno dicionário da Língua Portuguesa* [Internet]. Editora Melhoramentos. 2016. 2280 p. Available at: <http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php>
 22. Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, Dodd RY, Fearon M, Castro E. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: Evidence in support of transfusion transmission (CME). *Transfusion*. 2012;52(9):1913–21.
 23. Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2011;364:2527–34.
 24. Tanowitz HB, Wen J jun, Machado FS, Desruisseaux MS, Robello C, Garg NJ. *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease: Innate Immunity, ROS, and Cardiovascular System. *Vasc Responses to Pathog*. 2015;(December):183–93.
 25. Bortoluci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: Role of TLR and NLR. Vol. 67, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010. p. 1643–51.
 26. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. Vol. 15, *Current Opinion in Immunology*. 2003. p. 396–401.
 27. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Vol. 140, *Cell*. 2010. p. 821–32.
 28. Kesavardhana S, Kanneganti TD. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. Vol. 29, *International Immunology*. 2017. p. 201–10.
 29. Inohara N, Nuñez G. Cell death and immunity: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003;3(5):371–82. Available at:

* De acordo com o Estilo Vancouver.

<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri1086>

30. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2013;4. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00333/abstract>
31. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. 2014.
32. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004;4(7):499–511. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri1391>
33. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. Vol. 388, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009. p. 621–5.
34. Jenkins KA, Mansell A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Vol. 49, *Cytokine*. 2010. p. 237–44.
35. Kawai T, Akira S. TLR signaling. Vol. 19, *Seminars in Immunology*. 2007. p. 24–32.
36. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Vol. 5, *Nature Immunology*. 2004. p. 987–95.
37. Campos M a, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol*. 2004;172(3):1711–8.
38. Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al. Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. *J Immunol* [Internet]. 2001;167(1):416–23. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.167.1.416>
39. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* [Internet]. 2006;177(6):3515–9. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.6.3515>
40. Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, et al. TLR-Dependent Induction of IFN- Mediates Host Defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* [Internet]. 2006;177(10):7059–66. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.10.7059>
41. Oliveira A-C, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al. Expression of Functional TLR4 Confers Proinflammatory Responsiveness to *Trypanosoma cruzi* Glycoinositolphospholipids and Higher Resistance to Infection with *T. cruzi*. *J Immunol* [Internet]. 2004;173(9):5688–96. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.9.5688>
42. Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, Cerny A, dos Santos SL, Bartholomeu DC, et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* [Internet].

* De acordo com o Estilo Vancouver.

- 2011;187(4):1903–11. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3150366&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>
43. Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, et al. The _Trypanosoma cruzi_ Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol.* 2002;168(12):6366–74.
 44. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* [Internet]. 2009;227(1):106–28. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x>
 45. Heilig R, Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. Vol. 48, *European Journal of Immunology.* 2018. p. 230–8.
 46. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell.* 2002;10(2):417–26.
 47. Pashenkov M V., Dagil YA, Pinegin B V. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. Vol. 54, *International Immunopharmacology.* 2018. p. 385–400.
 48. 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* [Internet]. 2010;184(3):1148–52. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0902254>
 49. Ting JPY, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. Vol. 8, *Nature Reviews Immunology.* 2008. p. 372–9.
 50. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. Vol. 16, *Nature Reviews Immunology.* 2016. p. 407–20.
 51. Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.* 2006;8(11):1812–25.
 52. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. Vol. 10, *Nature Immunology.* 2009. p. 241–7.
 53. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* [Internet]. 2015;526(7575):666–71. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature15541>
 54. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature.* 2015;526(7575):660–5.
 55. Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H, et al.

* De acordo com o Estilo Vancouver.

- GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J* [Internet]. 2016;35(16):1766–78. Available at: <http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emboj.201694696>
56. Chen X, He WT, Hu L, Li J, Fang Y, Wang X, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res*. 2016;26(9):1007–20.
 57. Heilig R, Dick MS, Sborgi L, Meunier E, Hiller S, Broz P. The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *European Journal of Immunology*. 2018;
 58. Von Moltke J, Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, Van Rooijen N, et al. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature*. 2012;490(7418):107–11.
 59. Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, et al. A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *J Biol Chem*. 2010;285(42):32087–95.
 60. Buzzo CDL, Medina T, Branco LM, Lage SL, Ferreira LCDS, Amarante-Mendes GP, et al. Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage. *Sci Rep*. 2017;7.
 61. Sokolovska A, Becker CE, Ip WKE, Rathinam VAK, Brudner M, Paquette N, et al. Activation of caspase-1 by the NLRP3 inflammasome regulates the NADPH oxidase NOX2 to control phagosome function. *Nat Immunol*. 2013;14(6):543–53.
 62. Lage SL, Buzzo CL, Amaral EP, Matteucci KC, Massis LM, Icimoto MY, et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;110(35):E3321–30. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1305316110>
 63. Mascarenhas DPA, Cerqueira DM, Pereira MSF, Castanheira FVS, Fernandes TD, Manin GZ, et al. Inhibition of caspase-1 or gasdermin-D enable caspase-8 activation in the Naip5/NLRC4/ASC inflammasome. *PLoS Pathog*. 2017;13(8).
 64. Van Opdenbosch N, Van Gorp H, Verdonck M, Saavedra PHV, de Vasconcelos NM, Gonçalves A, et al. Caspase-1 Engagement and TLR-Induced c-FLIP Expression Suppress ASC/Caspase-8-Dependent Apoptosis by Inflammasome Sensors NLRP1b and NLRC4. *Cell Rep*. 2017;21(12):3427–44.
 65. Lage SL, Longo C, Branco LM, da Costa TB, Buzzo C de L, Bortoluci KR. Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. 2014.
 66. Place DE, Kanneganti TD. Recent advances in inflammasome biology. Vol. 50, *Current Opinion in Immunology*. 2018. p. 32–8.
 67. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. Vol. 165, *Cell*. 2016. p. 792–800.

* De acordo com o Estilo Vancouver.

68. Spreafico R, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants. Vol. 40, *European Journal of Immunology*. 2010. p. 638–42.
69. Li H, Willingham SB, Ting JP-Y, Re F. Cutting Edge: Inflammasome Activation by Alum and Alum's Adjuvant Effect Are Mediated by NLRP3. *J Immunol* [Internet]. 2008;181(1):17–21. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.181.1.17>
70. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008;453(7198):1122–6.
71. 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* [Internet]. 2008;9(8):847–56. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1631>
72. Harder J, Franchi L, Munoz-Planillo R, Park J-H, Reimer T, Nunez G. Activation of the Nlrp3 Inflammasome by *Streptococcus pyogenes* Requires Streptolysin O and NF- κ B Activation but Proceeds Independently of TLR Signaling and P2X7 Receptor. *J Immunol* [Internet]. 2009;183(9):5823–9. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0900444>
73. 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* [Internet]. 2010;184(2):922–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008285>
74. Ng J, Hirota SA, Gross O, Li Y, Ulke-Lemee A, Potentier MS, et al. *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology*. 2010;139(2).
75. Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem*. 2006;281(48):36560–8.
76. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 397–411.
77. 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).
78. Silva GK, Costa RS, Silveira TN, Caetano BC, Horta C V., Gutierrez FRS, et al. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1 Response and Host Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* [Internet]. 2013;191(6):3373–83. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1203293>
79. Schroder K, Kanneganti TD, Shao F, Broz P. Mechanisms and Consequences of Inflammasome Activation. *Journal of Molecular Biology*. 2018;430(2):131–2.

* De acordo com o Estilo Vancouver.

80. Albertti LAG, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect.* 2010;12(10):784–9.
81. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. Vol. 265, *Immunological Reviews*. 2015. p. 156–71.
82. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2014;20(3):460–73. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2013.5371>
83. Deretic V, Levine B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. Vol. 5, *Cell Host and Microbe*. 2009. p. 527–49.
84. Bortoluci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: Role of TLR and NLR. Vol. 67, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010. p. 1643–51.
85. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. Vol. 132, *Cell*. 2008. p. 27–42.
86. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2009;43(1):67–93. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
87. Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity. Vol. 10, *Nature Immunology*. 2009. p. 461–70.
88. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. Vol. 7, *Autophagy*. 2011. p. 673–82.
89. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. Vol. 36, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004. p. 2420–34.
90. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: Molecular machinery for self-eating. Vol. 12, *Cell Death and Differentiation*. 2005. p. 1542–52.
91. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. Vol. 14, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. p. 759–74.
92. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998;395(6700):395–8.
93. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. *Methods in Mammalian Autophagy Research*. Vol. 140, *Cell*. 2010. p. 313–26.
94. Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ. Autophagy and the Immune System. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2012;30(1):611–46. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-020711-074948>
95. Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: From

* De acordo com o Estilo Vancouver.

- hierarchies to networks. Vol. 72, Cellular and Molecular Life Sciences. 2015. p. 4721–57.
96. Kabeya Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* [Internet]. 2000;19(21):5720–8. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/19.21.5720>
 97. Klionsky D, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-ghiso JA, Ahn HJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2016;8(April):445–544.
 98. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24131–45.
 99. Ciechanover A, Kwon YT ae. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. Vol. 47, *Experimental & molecular medicine*. 2015. p. e147.
 100. Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, et al. Delivery of Cytosolic Components by Autophagic Adaptor Protein p62 Endows Autophagosomes with Unique Antimicrobial Properties. *Immunity*. 2010;32(3):329–41.
 101. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;119(6):753–66.
 102. Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2366–77.
 103. Kasai M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Seki S, Ikeda T, et al. Autophagic Compartments Gain Access to the MHC Class II Compartments in Thymic Epithelium. *J Immunol* [Internet]. 2009;183(11):7278–85. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0804087>
 104. Schmid D, Pypaert M, Münz C. Antigen-Loading Compartments for Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity*. 2007;26(1):79–92.
 105. Lee HK, Mattei LM, Steinberg BE, Alberts P, Lee YH, Chervonsky A, et al. In Vivo Requirement for Atg5 in Antigen Presentation by Dendritic Cells. *Immunity*. 2010;32(2):227–39.
 106. English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol*. 2009;10(5):480–7.
 107. Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio JM, Kroemer G, Albert ML. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺T cells. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):991–1005.

* De acordo com o Estilo Vancouver.

108. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and Its Role in MHC-Mediated Antigen Presentation. *J Immunol* [Internet]. 2009;182(6):3335–41. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0803458>
109. Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJP, et al. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Cell Biol*. 2006;174(6):2063–71.
110. Romano PS, Arboit MA, Vázquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy*. 2009;5(1):6–18.
111. Martins RM, Alves RM, Macedo S, Yoshida N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Cell Microbiol*. 2011;13(7):943–54.
112. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *Embo J*. 2008;27(7):1110–21.
113. Shi CS, Kehrl JH. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem*. 2008;283(48):33175–82.
114. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2011;12(3):222–30.
115. Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, et al. Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting Pro-IL-1 β for degradation. *J Biol Chem*. 2011;286(11):9587–97.
116. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012;13(3):255–63.
117. Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, Ogata K, Ishii KJ, Takeshita F. NLRP4 Negatively Regulates Autophagic Processes through an Association with Beclin1. *J Immunol* [Internet]. 2011;186(3):1646–55. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1001654>
118. Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog*. 2007;3(8):1082–91.
119. Allaeyes I, Marceau F, Poubelle PE. NLRP3 promotes autophagy of urate crystals phagocytized by human osteoblasts. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6).
120. Wlodarska M, Thaïs CA, Nowarski R, Henao-Mejia J, Zhang JP, Brown EM, et al. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell*. 2014;156(5):1045–59.
121. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A,

* De acordo com o Estilo Vancouver.

- Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Vol. 8, Autophagy. 2012. p. 445–544.
122. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611–22.
 123. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. Methods [Internet]. 2001;25(4):402–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
 124. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. Vol. 50, Methods. 2010.
 125. Karageorgos LE, Isaac EL, Brooks DA, Ravenscroft EM, Davey R, Hopwood JJ, et al. Lysosomal biogenesis in lysosomal storage disorders. Exp Cell Res. 1997;234(1):85–97.
 126. Swanson MS, Byrne BG, Dubuisson J-F. Kinetic analysis of autophagosome formation and turnover in primary mouse macrophages. [Internet]. Vol. 452, Methods in enzymology. 2009. 383-402 p. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200894>
 127. Cortez C, Real F, Yoshida N. Lysosome biogenesis/scattering increases host cell susceptibility to invasion by Trypanosoma cruzi metacyclic forms and resistance to tissue culture trypomastigotes. Cell Microbiol. 2016;18(5):748–60.
 128. Martinez J, Malireddi RKS, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. Nat Cell Biol. 2015;17(7):893–906.
 129. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. Vol. 14, Nature Reviews Immunology. 2014. p. 744–57.
 130. Jabir MS, Ritchie ND, Li D, Bayes HK, Tourlomousis P, Puleston D, et al. Caspase-1 cleavage of the TLR adaptor TRIF inhibits autophagy and β -interferon production during pseudomonas aeruginosa infection. Cell Host Microbe. 2014;15(2):214–27.
 131. Wan X, Wen JJ, Koo SJ, Liang LY, Garg NJ. SIRT1-PGC1 α -NF κ B Pathway of Oxidative and Inflammatory Stress during Trypanosoma cruzi Infection: Benefits of SIRT1-Targeted Therapy in Improving Heart Function in Chagas Disease. PLoS Pathog. 2016;12(10).
 132. Bai P, Cantó C, Oudart H, Brunyánszki A, Cen Y, Thomas C, et al. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. Cell Metab. 2011;13(4):461–8.
 133. Luna A, Aladjem MI, Kohn KW. SIRT1/PARP1 crosstalk: Connecting DNA damage and metabolism. Vol. 4, Genome Integrity. 2013.

134. Wu Y, Li X, Zhu JX, Xie W, Le W, Fan Z, et al. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *NeuroSignals*. 2011;19(3):163–74.
135. Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG. ATGL Promotes Autophagy/Lipophagy via SIRT1 to Control Hepatic Lipid Droplet Catabolism. *Cell Rep*. 2017;19(1):1–9.
136. Ou X, Lee MR, Huang X, Messina-Graham S, Broxmeyer HE. SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress. *Stem Cells* [Internet]. 2014;32(5):1183–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449278>^{5Cn}<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3991763>
137. Salminen A, Kaarniranta K. SIRT1: Regulation of longevity via autophagy. Vol. 21, *Cellular Signalling*. 2009. p. 1356–60.

* De acordo com o Estilo Vancouver.