

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Ativação do inflamassoma: a importância na leishmaniose, na  
influenza e na COVID-19**

**KEYLA SANTOS GUEDES DE SÁ**

Ribeirão Preto

2022

KEYLA SANTOS GUEDES DE SÁ

**Ativação do inflamassoma: a importância na leishmaniose, na  
influenza e na COVID-19**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desse trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Sá, Keyla Santos Guedes de  
Ativação do inflamassoma: a importância na  
leishmaniose, na influenza e na COVID-19  
Ribeirão Preto, 2022.  
182 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e  
Molecular.

Orientador: Zamboni, Dario Simões

1. Leishmaniose. 2. Influenza. 3. COVID-19. 4.  
Inflamassoma.

Trabalho realizado no Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata,  
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade  
de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da  
FAPESP e CAPES.

Nome: Keyla Santos Guedes de Sá

Título: Ativação do inflamassoma: A importância na leishmaniose, na influenza e na COVID-19

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva

Instituição: Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Kelly Grace Magalhães

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de, inicialmente, agradecer a Deus por ter me amparado em todos os momentos difíceis e me dado forças para continuar mesmo quando tudo parecia desabar ao meu redor.

Agradeço ao professor Dr. Dario Simões Zamboni por ter me dado a oportunidade de fazer o doutorado no laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata. O meu aprendizado e amadurecimento foram enormes durante todo período, e nossas conversas e seus conselhos permitiram-me enxergar e trilhar um caminho para novas possibilidades que antes pareciam tão distantes da minha realidade.

Agradeço ao professor Dr. Alexandre Todorovic Fabro por todos os ensinamentos, orientações e enorme disponibilidade para ajudar. O seu trabalho durante a pandemia com a coleta das autópsias e depois com todos os ensinamentos, permitiram-me desbravar um novo horizonte no conhecimento.

A todos os colegas que passaram pelo laboratório durante todos esses anos, pela harmoniosa convivência e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Gostaria de agradecer de forma especial à Luana Alexandrina Amaral por ter me acompanhado durante todos esses anos e ter trabalhado de forma incansável ao meu lado.

Gostaria de agradecer a todos os técnicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à Roberta R. Costa Rosales, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifoton, e à Vani Maria Alves, do Laboratório Multiusuário de Histotécnica.

Agradeço aos colegas Sabrina Setembro Batah, Ronaldo Bragança Martins Junior pela colaboração no trabalho, por terem sido extremamente solícitos e muito dispostos a ajudar.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos que mesmo estando longe se fizeram presentes na minha vida.

Gostaria de agradecer a todos os pacientes que fizeram parte deste trabalho, apesar de toda a dor e sofrimento do momento em que passamos, a contribuição deles nos ajudou a avançar um pouco mais no conhecimento da leishmaniose, da influenza e da COVID-19.

Gostaria de agradecer de forma especial aos meus pais Arildo Marçal Guedes de Sá e Maria Salete Santos de Sá por todo o apoio e conselho. Vocês sempre me

incentivaram a construir os meus sonhos e batalharam junto, enfrentando todas as dores e alegrias comigo para que esse sonho se tornasse realidade.

Fontes Financiadoras: FAPESP (Processo 2018/16777-8) e CAPES, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro que me deram condições de realizar o meu doutorado e me dedicar integralmente à pesquisa científica.

“Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a  
força necessária para o tirar do lugar em que está”

Augusto Curry



## Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	20
1.1. Inflamassomas .....	20
1.2. Piroptose e Gasdermina .....	21
Capítulo 1: .....	24
<b>A ativação da Gasdermin-D em resposta à infecção por Leishmania induz a formação de um poro transiente que promove a ativação de NLRP3 .....</b>	<b>24</b>
RESUMO .....	25
ABSTRACT .....	26
2. INTRODUÇÃO .....	27
2.1 Classificação e Taxonomia .....	27
2.2 Epidemiologia .....	27
2.3 Morfologia .....	29
2.4 Ciclo Biológico .....	30
2.5 Apresentação Clínica da Leishmaniose Cutânea .....	32
2.6 Aspectos Imunológicos .....	33
2.7 Ativação do inflamassoma na leishmaniose .....	33
3. JUSTIFICATIVA .....	36
4. OBJETIVOS .....	38
4.1 Objetivo Geral .....	38
4.2 Objetivos Específicos .....	38
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
5.1 Animais e infecção .....	40
5.2 Cepas de parasitas e cultivo de parasitas .....	40
5.3 Preparação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongo e infecção in vitro .....	41
5.4 Transdução retroviral de GSDMD-mNeon .....	41

5.5	Imunofluorescência.....	42
5.6	Ensaio ELISA .....	43
5.7	Ensaio de permeabilização de membrana .....	43
5.8	Quantificação do K <sup>+</sup> intracelular .....	44
5.9	Quantificação de parasitas em células e tecidos .....	44
5.10	Quantificação de parasitas e expressão de mRNA na orelha e linfonodos de camundongos infectados .....	45
5.11	Quantificação de citocinas ex vivo .....	46
5.12	Western Blot .....	46
5.13	Avaliação de Citotoxicidade por Liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) .....	47
5.14	Aquisição de Vídeo.....	47
5.15	Ensaio de oligomerização ASC .....	47
5.16	Amostras de biópsia de pele .....	48
5.17	Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real das amostras embebidas em parafina .....	48
5.18	Análise estatística .....	49
7.	RESULTADOS .....	50
7.1	A infecção por Leishmania em macrófagos induz a ativação transiente de GSDMD, mas não a morte celular.....	50
7.2	Leishmania induz a formação de poros transientes dependente de GSDMD em macrófagos membranas. ....	53
7.3	GSDMD é importante para a formação de puncta de ASC e secreção de IL-1 $\beta$ em resposta à infecção por Leishmania. ....	57
7.4	GSDMD contribui para o controle da infecção por Leishmania em macrófagos de camundongos.....	61
7.5	GSDMD contribui para a restrição da infecção por Leishmania e ativação do inflamassoma ativação in vivo.....	65
7.6	Os inflamassomas e a GSDMD são ativados na pele de pacientes com Leishmaniose. ....	71

8. DISCUSSÃO.....	75
9. CONCLUSÃO .....	80
Capítulo 2: .....	81
<b>A Ativação Do Inflamassoma e a Carga Viral Pulmonar Define Dois Perfis Clínicos Distintos na COVID-19.....</b>	<b>81</b>
RESUMO .....	82
ABSTRACT .....	83
10. INTRODUÇÃO.....	84
10.1 Histórico e Classificação do Vírus da Influenza.....	84
10.2 Epidemiologia da Influenza .....	84
10.3 Estrutura Viral e Ciclo de Replicação da Influenza.....	86
10.1 Apresentação Clínica da Influenza .....	88
10.2 Aspectos gerais da resposta imune inata na Influenza.....	89
10.3 Inflamassoma na Influenza .....	91
10.4 Histórico e Classificação do COVID-19 .....	91
10.5 Epidemiologia da COVID-19 .....	92
10.6 Estrutura Viral e Ciclo de Replicação do COVID-19.....	93
10.7 Apresentação Clínica da COVID-19 .....	95
10.8 Aspectos gerais da resposta imune inata na COVID-19.....	96
10.9 Inflamassoma no COVID-19 .....	97
11. JUSTIFICATIVA .....	98
12. OBJETIVOS.....	99
12.1 Objetivo Geral.....	99
12.2 Objetivos Específicos .....	99
13. MATERIAL E MÉTODOS.....	100
13.1 Amostras .....	100
13.2 Imuno-histoquímica (IHC) .....	100
13.3 Imunofluorescência.....	101

13.4	Avaliação Histológica.....	101
13.5	Extração de RNA .....	101
13.6	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para genes inflamatórios	102
13.7	Reação em cadeia da polimerase em tempo real para RNA viral.....	102
13.8	Aquisição e avaliação de imagens de tomografia computadorizada de tórax	103
13.9	Análise Estatística.....	104
14.	RESULTADOS .....	105
14.1	Casos letais de COVID-19 desenvolvem síndrome do desconforto respiratório agudo grave (SDRA) e maior ativação do inflamassoma no parênquima pulmonar do que pacientes com influenza.....	105
14.2	O perfil celular de ativação do inflamassoma difere em casos letais de COVID-19 e influenza.....	110
14.3	A progressão da doença em casos letais de COVID-19 ocorre com a diminuição da carga viral e aumento da ativação do inflamassoma no parênquima pulmonar ao longo do tempo .....	114
14.4	A ativação do inflamassoma e a carga viral pulmonar definem dois desfechos clínicos distintos em casos letais de COVID-19.....	115
14.5	Expressão gênica e perfil celular de ativação do inflamassoma não estão associados ao uso de ventilação mecânica em pacientes .....	123
14.6	A caspase-4 é regulada positivamente em pacientes com COVID-19 e ativada durante infecção por SARS-CoV-2 e correlaciona-se com mediadores inflamatórios e componentes do inflamassoma. ....	127
14.7	A ativação do inflamassoma ocorre de forma sistêmica, podendo levar ao envolvimento de diversos órgãos.....	130
15.	DISCUSSÃO.....	132
16.	CONCLUSÃO.....	137
17.	REFERÊNCIAS .....	138
18.	Anexo 1: Trabalhos de primeira autoria .....	170

---

18.1	Artigo em revisão: .....	170
18.2	Artigo em revisão (Preprint): DOI: <a href="https://doi.org/10.1101/2022.06.24.22276878">10.1101/2022.06.24.22276878</a> ...	171
19.	Anexo 2: Trabalhos de colaboração .....	172
19.1	Artigo publicado: DOI: <a href="https://doi.org/10.1084/jem.20201707">10.1084/jem.20201707</a> .....	172
19.2	Artigo Publicado: DOI: <a href="https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119376">10.1016/j.lfs.2021.119376</a> .....	173
19.3	Artigo publicado: DOI: <a href="https://doi.org/10.1002/JLB.MA1118-471R">10.1002/JLB.MA1118-471R</a> .....	174
19.4	Artigo Publicado: DOI: <a href="https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106946">10.1016/j.vph.2021.106946</a> .....	175
19.5	Artigo Publicado: DOI: <a href="https://doi.org/10.1002/ctm2.648">10.1002/ctm2.648</a> .....	176
19.6	Artigo Publicado: DOI: <a href="https://doi.org/10.1126/sciadv.abo5400">10.1126/sciadv.abo5400</a> .....	178
19.7	Artigo em Revisão (Preprint): DOI: <a href="https://doi.org/10.1101/2022.06.29.22277067">10.1101/2022.06.29.22277067</a> ;	179
20.	Anexo 3: Trabalho voluntário.....	180
21.	Anexo 5: Prêmios .....	181
21.1	Prêmio Jovem Cientista em Ciências da Vida – Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ) e Cytiva. ....	181
21.2	Menção Honrosa no Prêmio Newton Freire-Maia – Genética Humana e Médica e Farmacogenética – Sociedade Brasileira de Genética (SBG).....	182

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação do inflamassoma (Criado com Biorender).....	21
Figura 2: Mecanismo para a formação de poro pela Gasdermina (Criado com Biorender)....	23
Figura 3. Taxa de prevalência da leishmaniose cutânea no mundo, 2020. Dados obtidos no WHO.....	28
Figura 4. Taxa de prevalência leishmaniose cutânea no Brasil por unidade federativa, 2020. Dados obtidos no (Datasus, 2022).....	29
Figura 5. Série histórica do número de casos reportados versus taxa de prevalência da leishmaniose cutânea no Brasil. Dados obtidos no (Datasus, 2022).....	29
Figura 6: Esquema da morfologia da <i>Leishmania</i> (Criado com Biorender). ....	30
Figura 7: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> (Criado com Biorender). ....	32
Figura 8. Lesão de leishmaniose Cutânea. (Brasil, 2017).....	32
Figura 9. Ativação do inflamassoma na leishmaniose (Criado com Biorender). ....	35
Figura 10. Infecção por <i>Leishmania</i> induz clivagem de GSDMD em macrófagos.....	51
Figura 11. A atividade de caspases é dispensável para clivagem GSMDM em resposta à infecção por <i>Leishmania</i> e ESCRT não está envolvido na inibição de piroptose em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs). ....	53
Figura 12. GSDMD colocaliza com a membrana plasmática. ....	54
Figura 13. GSDMD induz uma permeabilização transitória em macrófagos infectados por <i>Leishmania</i> . ....	56
Figura 14. GSDMD é importante para a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com <i>Leishmania</i> .....	58
Figura 15. Promastigotas metacíclicas e amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> induzem a formação de poros dependente de GSDMD em macrófagos, priming não é necessário para clivagem não canônica de GSDMD.....	60
Figura 16. GSDMD é responsável pela restrição da infecção por <i>L. amazonensis</i> em BMDMs. ....	62
Figura 17. A GSDMD é importante para a restrição de <i>Leishmania spp.</i> em macrófagos..	64
Figura 18. A GSDMD é importante para a restrição da infecção por <i>L. amazonensis in vivo</i> . ....	66
Figura 19. GSDMD é importante para a restrição da infecção por <i>L. amazonensis</i> e ativação do inflamassoma de NLRP3 <i>in vivo</i> .....	68
Figura 20. Expressão de citocinas inflamatórias na orelha e linfonodo drenante dos camundongos WT e <i>Gsdmd</i> <sup>-/-</sup> infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	69
Figura 21. A GSDMD é importante para a restrição de <i>Leishmania spp. in vivo</i> . ....	71
Figura 22. Expressão de genes do inflamassoma e citocinas inflamatórias em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea. ....	73
Figura 23. O inflamassoma NLRP3/ASC e a GSDMD estão ativos em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea. ....	74

Figura 24. Modelo esquemático que ilustra o papel de Gasdermin-D (GSDMD) na ativação do inflamassoma e restrição da infecção por <i>Leishmania</i> .....	80
Figura 25. Série histórica da prevalência da influenza por unidade federativa do Brasil. Dados obtidos no (Datasus, 2022).....	85
Figura 26. Série histórica da taxa de letalidade da influenza por unidade federativa do Brasil. Dados obtidos no (Datasus, 2022).....	86
Figura 27. Estrutura do vírus da influenza (Criado com Biorender).....	87
Figura 28. Ciclo de replicação do vírus influenza (Criado com Biorender).....	88
Figura 29. Mortalidade e fatores de risco associados à Influenza (Adaptado de (Flerlage <i>et al.</i> , 2021).....	89
Figura 30. Resistência antiviral e tolerância à doença (Adaptado de (Iwasaki and Pillai, 2014)).....	91
Figura 31. Série histórica da prevalência da COVID-19 por unidade federativa do Brasil. Dados obtidos no (Datasus, 2022).....	93
Figura 32. Série histórica da taxa de letalidade da COVID-19 por unidade federativa do Brasil. Dados obtidos no (Datasus, 2022).....	93
Figura 33. Estrutura do SARS-CoV-2 (Criado com Biorender).....	94
Figura 34. Ciclo de Replicação do SARS-CoV-2 (Criado com Biorender).....	95
Figura 35. Pacientes com Influenza e SARS-CoV-2 possuem maior área de parênquima pulmonar.....	107
Figura 36. Controle do anticorpo primário para o canal 488 e 594.....	108
Figura 37. Padrões histopatológicos e ativação do inflamassoma em autópsia pulmonar de pacientes com COVID-19 e influenza.....	109
Figura 38. Macrófagos, células endoteliais e pneumócitos contribuem para a ativação do inflamassoma nos pulmões de pacientes com COVID-19 e influenza.....	112
Figura 39. Imunohistoquímica de autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19, influenza e adenocarcinoma pulmonar.....	113
Figura 40. A ativação do inflamassoma se correlaciona positivamente com o tempo de doença, e a carga viral se correlaciona inversamente com o tempo de doença.....	114
Figura 41. Correlação não significativa entre as cargas virais e ativação do inflamassoma em casos letais de pacientes com COVID-19.....	115
Figura 42. Expressão gênica pulmonar de pacientes com COVID-19.....	116
Figura 43. Expressão gênica pulmonar de pacientes com influenza.....	117
Figura 44. Carga viral pulmonar e expressão gênica de genes inflamatórios definem dois grupos de pacientes em casos letais de COVID-19.....	119
Figura 45. Os pacientes com COVID-19 do Cluster 1 contêm cargas virais mais altas nos pulmões em comparação com os pacientes do Cluster 2.....	121
Figura 46. Evolução CXR de pacientes do Cluster 1 e Cluster 2.....	122
Figura 47. A ventilação mecânica não está relacionada ao aumento da ativação do inflamassoma em pacientes com COVID-19.....	126
Figura 48. A caspase-4 é regulada positivamente em pacientes com COVID-19 e ativada durante a infecção por SARS-CoV-2.....	128

---

Figura 49. Expressão de caspase-4 não está associada com a coagulação em pacientes com COVID-19. ....	130
Figura 50. Ativação sistêmica do inflamassoma em casos letais de COVID-19. ....	131



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIM2.....	Absent In Melanoma 2
ASC.....	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A CARD
BMDM.....	Bone-Marrow-Derived Macrophage
CARD.....	Caspase Activation And Recruitment Domains
CASP1.....	Caspase 1
CASP11.....	Caspase 11
CASP4.....	Caspase 4
CCR2.....	C-C chemokine receptor type 2
cDNA.....	DNA Complementar
Células NK.....	Células Natural Killer
CL.....	Cutaneous Leishmaniasis
CLR.....	C-type Lectin Receptor
DAMP.....	Damage-Associated Molecular Patterns
DFNA5.....	Deafness, autosomal dominant, 5
EGFP.....	Enhanced Green Fluorescent Protein
GSDMA.....	Gasdermina A
GSDMA3.....	Gasdermina A3
GSDMB.....	Gasdermina B
GSDMC.....	Gasdermina C
GSDMD.....	Gasdermina D
GSDMD.....	Gasdermina D
HMGB1.....	High mobility group Box-1
IL-1 $\beta$ .....	Interleucina 1 Beta
LDH.....	Lactato Desidrogenase
LPS.....	Lipopolissacarídeo
LRR.....	Leucine-Rich Repeats
MCL.....	Mucocutaneous Leishmaniasis
MFI.....	Mean Fluorescence Intensity
NLR.....	NOD-like Receptor
NLRC4.....	Nlr Family Card Domain Containing 4
NLRP3.....	NLR Family, Pyrin Domain Containing 3
PAMPs.....	Pathogen Associated Molecular Patterns

PBS.....	Phosphate-Buffered Saline
PI.....	Propidium Iodide
PIT.....	Pore-Induced Intracellular Trap
PRR.....	Pattern Recognition Receptor
RFP.....	Red Fluorescent Protein
RFU.....	Relative Fluorescence Units
ROS.....	Reactive Oxygen Species
SFB.....	Soro Fetal Bovino
TLR.....	Receptores Do Tipo Toll
TNFR.....	Tumor Necrosis Factor Receptors
VL.....	Visceral Leishmaniasis
WGA.....	Wheat Germ Agglutinin

---

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Características dos pacientes com leishmaniose..... 72

**Tabela 2:** Resumo das principais características das pandemias de gripe dos últimos cem anos..... 84

**Tabela 3.** Características dos pacientes influenza e COVID-19..... 106

**Tabela 4.** Características dos pacientes COVID-19 ..... 120

**Tabela 5.** Análises Radiológicas..... 123

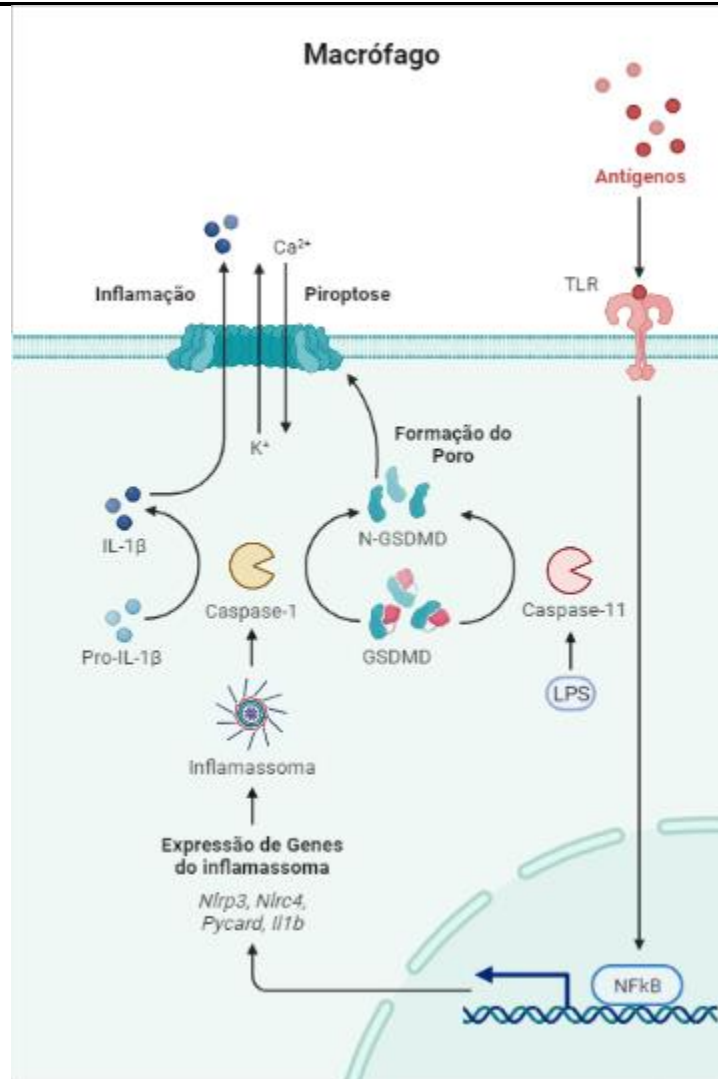
**Tabela 6.** Características dos pacientes COVID-19 que foram submetidos ou não à Ventilação Mecânica (MV). ..... 124

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. Inflamassomas

Os inflamassomas são complexos multiproteicos que são ativados quando ocorre reconhecimento de componentes específicos de um patógeno ou sinalização causado pelo dano nas células. O NLRP3 é o inflamassoma mais bem estudado e é ativado em resposta a múltiplos patógenos e moléculas que induzem danos nas membranas das células hospedeiras (Broz and Dixit, 2016). A ativação do inflamassoma é bem regulada pela célula, para isso são necessários dois sinais independentes. O primeiro sinal (também chamado de *priming*) é caracterizado pela ativação dos TLRs (ou TNFR) levando à transcrição de muitos genes inflamatórios, incluindo *Nlrp3*, *Casp11* e *Il1b*. O segundo sinal é essencial para que haja a ativação do inflamassoma, e é caracterizado quando um sinal de dano celular ou um patógeno é reconhecido pelas proteínas sensores do inflamassoma (Exemplo NLRP3, AIM2, NLRC4), alguns desses sinais que podem desencadear a ativação do inflamassoma é o efluxo de  $K^+$ , toxinas microbianas, cristais, ROS, entre outros. Após a ativação ocorre a oligomerização do NLRP3, que promove a oligomerização do ASC via interação Pirina-Pirina, expondo vários domínios CARD de ASC nos filamentos formados. Esses domínios, por sua vez, são responsáveis por recrutar caspase-1 via interação CARD/CARD para promover a ativação de caspase-1. A caspase-1 cliva IL-1 $\beta$  e GSDMD, que se insere na membrana formando poros que levam ao desequilíbrio osmótico da célula, e lise levando a uma morte celular altamente inflamatória conhecida como piroptose (**Figura 1**).

A ativação não canônica do inflamassoma ocorre após o reconhecimento de LPS intracelular, que levam a ativação de caspase-11 induzindo a formação de poros de GSDMD (Aglietti *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Sborgi *et al.*, 2016). Esses poros levam a ativação canônica do inflamassoma, pois permitem o efluxo de  $K^+$ , que é importante para ativar NLRP3 (Rühl and Broz, 2015). Dessa forma, ocorre a ativação de caspase-1 que utiliza os mesmos mecanismos de formação de poro de GSDMD e piroptose (Kayagaki *et al.*, 2015; Okondo *et al.*, 2017). A necessidade dos dois sinais fornece uma regulação fina e controlada da ativação do inflamassoma que previne a indução de inflamação desnecessária na ausência de infecção ou moléculas nocivas.



**Figura 1. Ativação do inflamassoma (Criado com Biorender).**

### 1.2. Piroptose e Gasdermina

Vários patógenos invadem as células do hospedeiro numa tentativa de escapar da resposta imune celular, servindo como reservatórios para o patógeno. Para eliminar esses reservatórios é necessário que haja a morte das células infectadas. Existem mecanismos celulares intrínsecos e extrínsecos para a morte de células infectadas. Se a infecção é detectada pelas proteínas da resposta imune inata que estão presentes na célula, irá ativar os mecanismos intrínsecos de morte celular, entre eles estão: apoptose, necroptose e piroptose. A infecção também pode ser detectada por células citotóxicas, como os linfócitos T citotóxicos e as células natural killer (NK), representando os mecanismos extrínsecos de morte celular.

O termo piroptose foi proposto inicialmente por Cookson and Brennan, 2001, para descrever uma morte programada inflamatória dependente de caspase-1. Morfológicamente, a piroptose é uma forma lítica de morte celular, caracterizada pela

formação de grandes poros na membrana plasmática, que permitem o influxo de água e de íons que leva ao desequilíbrio osmótico e a lise da célula (Fink and Cookson, 2006).

A piroptose possui um importante papel eliminando as células comprometidas, removendo o sítio de replicação dos patógenos e estimulando a resposta imune. Por exemplo, esse tipo de morte celular auxilia na eliminação de bactérias intracelulares, pois dessa forma as bactérias são retiradas do meio intracelular e apresentadas para neutrófilos (Miao *et al.*, 2010). Quando a célula morre por piroptose, as bactérias se mantêm presas nos restos celulares da célula morta, em uma estrutura denominada *pore-induced intracellular trap* (PIT) (Jorgensen, Zhang, *et al.*, 2016). Durante a piroptose, há a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-18, eicosanoids e DAMPs (Von Moltke *et al.*, 2012; Jorgensen, Lopez, *et al.*, 2016), esses DAMPS recrutam células imune para a região onde está acontecendo a infecção, dessa forma neutrófilos e macrófagos podem, então, fagocitar e matar as bactérias presas nos PITs por meio da eferocitose (Sauer *et al.*, 2011; Jorgensen, Lopez, *et al.*, 2016; Jorgensen, Zhang, *et al.*, 2016).

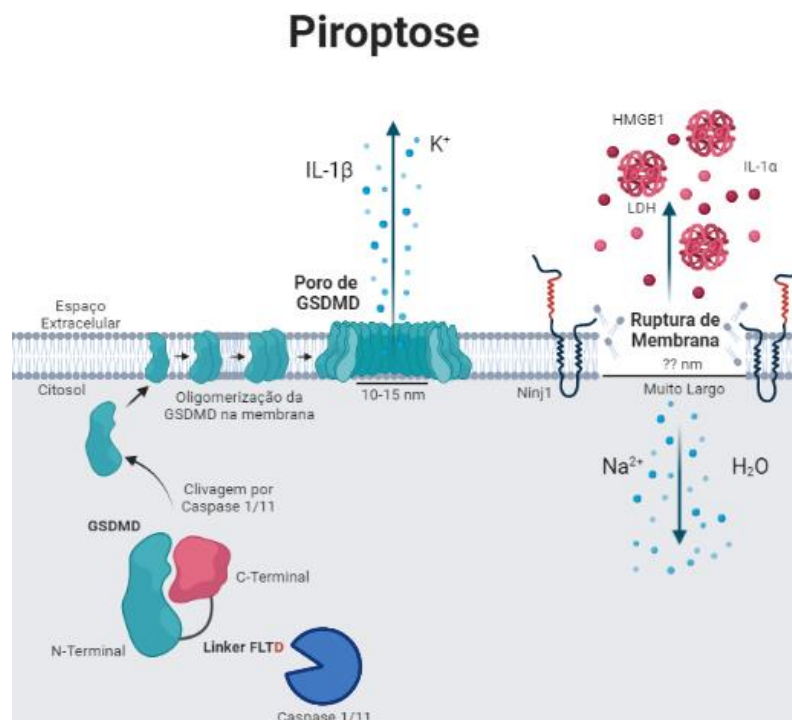
A GSDMD foi inicialmente descrita como tendo um papel importante na piroptose mediada pelas caspase-1/11, que clivam a GSDMD no resíduo D276 (peptídeo FLTD), separando em uma região N-terminal ou 'p30' e outra região C-terminal ou 'p20', a região C-terminal inibe a região N-terminal, que é a região efetora formadora de poro (Kayagaki *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018). A região N-terminal da GSDMD possui forte afinidade por lipídeos como: *cardiolipin*, fosfatidylinositol 4-phosphate [PI(4)P] e fosfatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P] (Aglietti *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). Essa afinidade explica a formação de poros pela GSDMD apenas na parte citosólica da membrana plasmática, que contém estes lipídeos (Ding *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016), além de explicar a lise de bactérias por meio da formação de poros na membrana de bactérias (Liu *et al.*, 2016).

A família da gasdermina (GSDM) é conservada entre os vertebrados e os humanos possuem quatro parálogos da gasdermina, denominados: GSDMA, GSDMB, GSDMC e GSDMD. Os camundongos possuem 3 homólogos para *Gsdma* e 4 para *Gsdmc* e *Gsdmd*, não possuindo *Gsdmb*. Todas as GSDMs possuem dois domínios preditos, com uma região variável conectante, com pouca semelhança a qualquer domínio conhecido.

O domínio N-terminal das proteínas GSDMA, GSDMB, GSDMC, DFNA5 e GSDMA3 são citotóxicos quando expressos em células, enquanto a expressão do gene completo não é (Van Laer *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2016). De forma curiosa, as gasderminas A, B, C e E não possuem o sítio de clivagem para a caspase, indicando a presença de outro mecanismo de ativação (Shi *et al.*, 2015). Além

da morte celular programada, a GSDMD pode estar envolvida em processos de regulação da proliferação celular ou diferenciação, pois são expressas principalmente em tecidos epiteliais (Saeki *et al.*, 2009). Alguns trabalhos mostram que a GSDMA é menos expressa em câncer de estômago e esôfago (Saeki *et al.*, 2007; Saeki *et al.*, 2009). A GSDMB está associada com asma infantil (Wu *et al.*, 2009), podendo estimular a proliferação celular (Sun *et al.*, 2008), estando relacionada com um prognóstico ruim em amostras de câncer de mama (Hergueta-Redondo *et al.*, 2014; Hergueta-Redondo *et al.*, 2016), e a GSDMC está associada com melanomas metastásicos (Watabe *et al.*, 2001).

Os poros formados pela GSDMD possuem um diâmetro interno entre 12-14 nm, com aproximadamente 16 subunidades (Ding *et al.*, 2016), esse diâmetro é suficiente para permitir a passagem de citocinas como a IL-1 $\beta$  e íons (Evavold *et al.*, 2018). Embora a secreção rápida de IL-1 $\beta$  seja dependente de GSDMD, a liberação tardia pode ser independente (Monteleone *et al.*, 2018). Após a clivagem de GSDMD, ocorre a oligomerização de Ninj1 que, então, realiza o rompimento da membrana plasmática das células e a liberação de LDH e HMGB1 (Kayagaki *et al.*, 2021). Um esquema sobre a piroptose está representado na **Figura 2**.



**Figura 2: Mecanismo para a formação de poro pela Gasdermina (Criado com Biorender).**

# Capítulo 1:

*A ativação da Gasdermin-D em resposta à infecção por Leishmania induz a formação de um poro transiente que promove a ativação de NLRP3*



---

**RESUMO**

A *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório que causa a leishmaniose, uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Durante a infecção, ocorre a ativação do inflamassoma de NLRP3, que é fundamental para a progressão da doença. Os mecanismos moleculares envolvidos na ativação do inflamassoma ainda não são claros, e a *Leishmania* consegue evadir a resposta imune inibindo processos específicos em células infectadas, um desses processos é a inibição da morte celular. Aqui, investigamos a participação da Gasdermina-D (GSDMD, uma proteína efetora formadora de poros associada à piroptose) durante a infecção por *Leishmania in vitro* e *in vivo*. Demonstramos que apesar da ausência de piroptose, a GSDMD é ativa nos estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis* em macrófagos, permitindo uma permeabilização celular transitória e efluxo de potássio, promovendo a ativação do inflamassoma de NLRP3. No entanto, logo após a infecção, a GSDMD é processada em um fragmento não canônico de 25 kDa em células infectadas por *Leishmania*. O processamento não canônico de GSDMD não requer ativação de caspase e pode representar uma estratégia de subversão utilizada pela *Leishmania* para inibir a morte celular. Macrófagos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> exibem menos formação de puncta de ASC e produção de IL-1 $\beta$  em resposta à infecção, sugerindo que a permeabilização de membrana mediada pelos poros transientes de GSDMD contribuem para a ativação do inflamassoma de NLRP3. Camundongos e macrófagos deficientes em GSDMD foram altamente suscetíveis à infecção por várias espécies de *Leishmania*, incluindo *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*, confirmando um papel importante da Gasdermin-D e do inflamassoma na resistência do hospedeiro à infecção. Finalmente, puncta de ASC/NLRP3 e Gasdermin-D clivada estavam presentes em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose, apoiando o papel dessas moléculas durante a doença ativa em humanos. Ao todo, nossos achados revelam que a *Leishmania* subverte as funções normais da GSDMD, uma molécula que é fundamental para promover a ativação do inflamassoma e a imunidade na Leishmaniose.

**Palavras-chave:** *Leishmania*, GSDMD, Inflamassoma

## ABSTRACT

*Leishmania* is an obligate intracellular parasite that causes Leishmaniasis, a disease that affects millions of people worldwide. *Leishmania* evades immune response by inhibiting specific processes on parasite-containing immune cells, yet the NLRP3 inflammasome activation is key for disease outcome. The molecular mechanisms upstream of the inflammasome activation are still unclear and there is no evident host cell death in *Leishmania*-infected cells. Here, we investigated the participation of Gasdermin-D (GSDMD, a pore-forming effector protein associated with pyroptosis) during *Leishmania* infection in macrophages and *in vivo*. We demonstrated that despite the absence of pyroptosis, GSDMD is active at the early stages of *L. amazonensis* infection in macrophages, allowing a transient cell permeabilization and potassium efflux, promoting NLRP3 inflammasome activation. However, soon after the infection, GSDMD is processed into a non-canonical 25 kDa fragment in *Leishmania*-infected cells. Non-canonical processing of GSDMD does not require caspase activation and may represent a subversion strategy used by *Leishmania* to inhibit cell death. *Gsdmd*<sup>-/-</sup> macrophages exhibit less ASC puncta formation and IL-1 $\beta$  production in response to infection, suggesting that the transient GSDMD-mediated permeabilization contributes for NLRP3 inflammasome activation. Mouse and macrophages deficient in GSDMD were highly susceptible to infection by several *Leishmania* species, including *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* and *L. mexicana*, confirming a key role of Gasdermin-D for inflammasome mediated host resistance to infection. Finally, ASC/NLRP3 puncta and cleaved Gasdermin-D were present in skin biopsies of leishmaniasis patients, supporting the role of these molecules during active disease in humans. Altogether, our findings reveal that *Leishmania* subvert the normal functions of GSDMD, a molecule that is key to promote inflammasome activation and immunity in Leishmaniasis.

**Keywords:** *Leishmania*, GSDMD, Inflammasome

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 Classificação e Taxonomia

A leishmaniose é uma doença transmitida por artrópodes, que possui como agentes causadores parasitas pertencentes ao Reino Eukaryota, Classe Kinetoplastea, Subclasse Metakinetoplastina, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae, Subfamília Leishmaniinae e Gênero *Leishmania* (Lainson and Shaw, 1987; Schoch *et al.*, 2020).

Atualmente, foram descritas 18 espécies de *Leishmania* que são patogênicas para os humanos, pertencentes aos subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Mundinia* e estão distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Steverding, 2017).

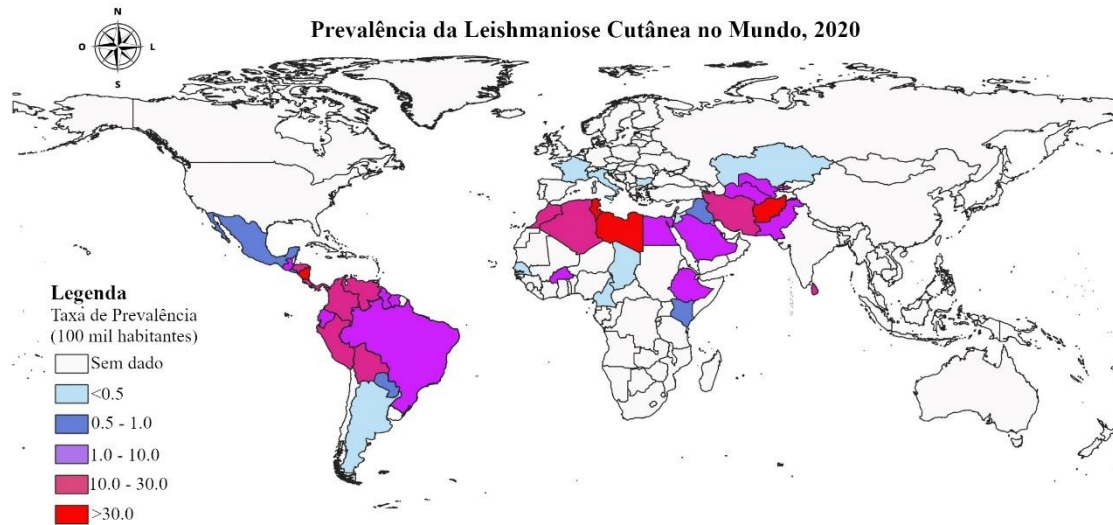
### 2.2 Epidemiologia

Existem três principais formas da doença: Leishmaniose cutânea (CL, do inglês *cutaneous leishmaniasis*), Leishmaniose visceral (VL, do inglês *visceral leishmaniasis*) e a Leishmaniose mucocutânea (MCL, do inglês *mucocutaneous leishmaniasis*). A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença. A Organização Mundial da Saúde estima de 0,6 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea no mundo. Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem com leishmaniose em áreas endêmicas. Devido à alta incidência da doença, a Organização Mundial da Saúde inclui a leishmaniose entre as seis endemias mais importantes em todo o mundo (PAHO/WHO, 2022).

Os parasitas que costumam causar a leishmaniose cutânea são comumente divididos em espécies do velho mundo (*Leishmania major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*), que são prevalentes no Mediterrâneo, África, Índia e espécies do novo mundo (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*) que são endêmicas na América Central e do Sul.

Nos últimos anos, tem se observado um grande aumento da leishmaniose em áreas de conflito do Oriente Médio, com a Síria e o Afeganistão possuindo as maiores prevalências mundiais (Du *et al.*, 2016) (**Figura 3**). Em 2020, o Brasil possuía uma prevalência de 7,5 casos para cada 100 mil habitantes, uma taxa mais baixa que a Costa Rica (10,19 casos para cada 100 mil habitantes), Colômbia (11,96 casos para cada 100 mil habitantes), Peru (12,52 casos para cada 100 mil habitantes), Honduras (14,5 casos

para cada 100 mil habitantes), Bolívia (17,4 casos para cada 100 mil habitantes) e Panamá (21,4 casos para cada 100 mil habitantes), seus países vizinhos na América Central e do Sul (**Figura 3**) (WHO, 2020b).



**Figura 3.** Taxa de prevalência da leishmaniose cutânea no mundo, 2020. Dados obtidos no WHO.

A prevalência da leishmaniose cutânea é bastante variável entre os estados brasileiros, possuindo casos autóctones em todos eles. A região da Amazônia Legal (que compreende os estados do Acre, Amazonas, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins, Pará e Maranhão) é a região que contribui com o maior número de casos, possuindo uma prevalência acima de 30 casos para cada 100 mil habitantes (**Figura 4**) (Datusus, 2022). A grande contribuição da Amazônia Legal nos casos de leishmaniose pode ser devido a surtos epidêmicos associados à derrubada das matas e da exploração desordenada das florestas. Nesse caso, a leishmaniose pode ser transmitida fundamentalmente por animais silvestres quando o homem entra em contato com áreas de mata fechada ou na interface da área peridomiciliar com áreas de mata, onde o homem costuma desenvolver atividades ligadas à agricultura.

## Prevalência da Leishmaniose Cutânea por Unidade Federativa - Brasil, 2020

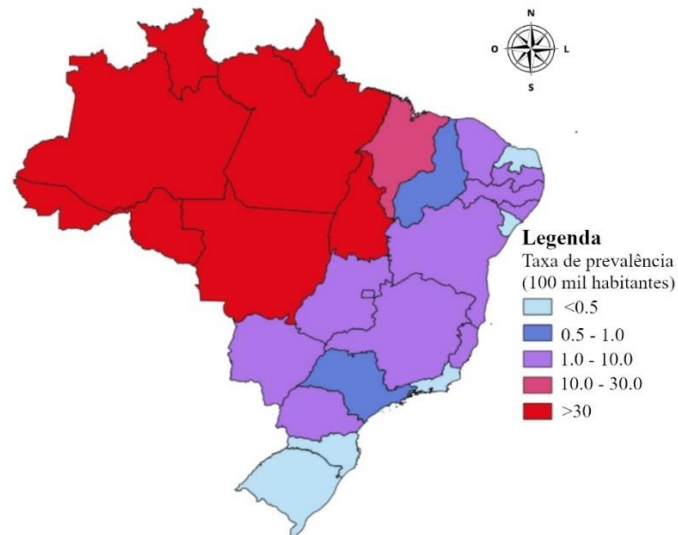


Figura 4. Taxa de prevalência leishmaniose cutânea no Brasil por unidade federativa, 2020. Dados obtidos no (Datasus, 2022).

Analisando a série histórica dos casos de leishmaniose no Brasil, observa-se nos últimos anos uma tendência de diminuição no número de casos reportados e na taxa de prevalência da doença (Datasus, 2022). Figura 5

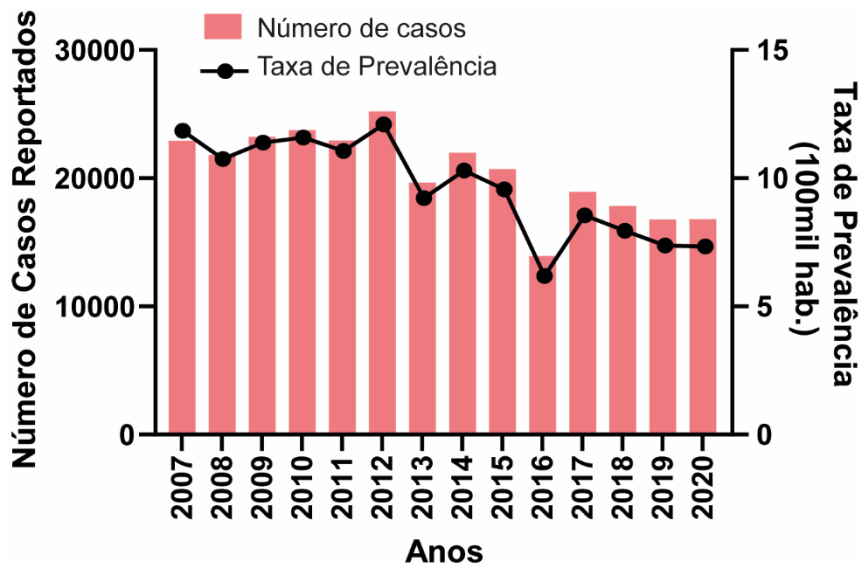


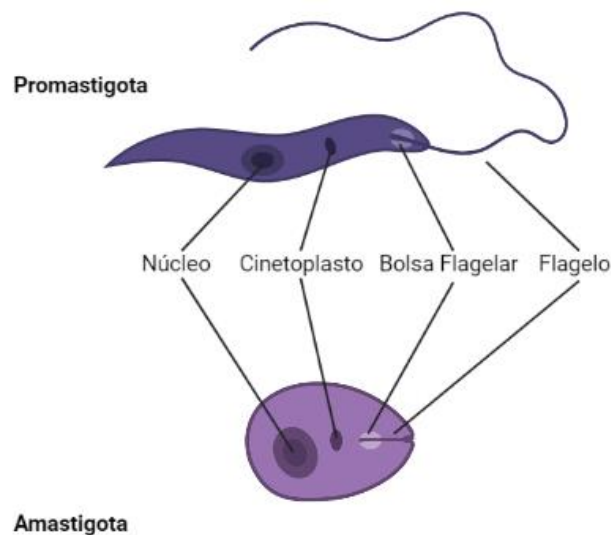
Figura 5. Série histórica do número de casos reportados versus taxa de prevalência da leishmaniose cutânea no Brasil. Dados obtidos no (Datasus, 2022).

### 2.3 Morfologia

As diferentes espécies de *Leishmania* são morfologicamente similares, entretanto elas possuem duas importantes morfologias, no mosquito como promastigota e no

mamífero como amastigota (**Figura 6**). A arquitetura celular é conservada entre essas duas morfologias que são bem características e possuem estruturas em comum, como a presença de um núcleo central, localizado anteriormente a ele se encontra o cinetoplasto, que é uma região onde se concentram as mitocôndrias e que está diretamente conectada ao corpúsculo basal (que se localiza na bolsa flagelar) de onde se origina o flagelo (**Figura 6**).

A morfologia da amastigota é caracterizada por uma forma esférica com um pequeno flagelo imóvel que emerge da bolsa flagelar de forma bem discreta, possuindo uma função sensorial (Gluezn *et al.*, 2010; Wheeler *et al.*, 2015). A morfologia da promastigota é definida por uma forma mais alongada e ovoide, com um longo flagelo móvel, que se estende para fora da bolsa flagelar e que é responsável em promover uma força propulsiva para a movimentação da *Leishmania*.



**Figura 6: Esquema indicando as principais estruturas de promastigotas e amastigotas da *Leishmania* (Criado com Biorender).**

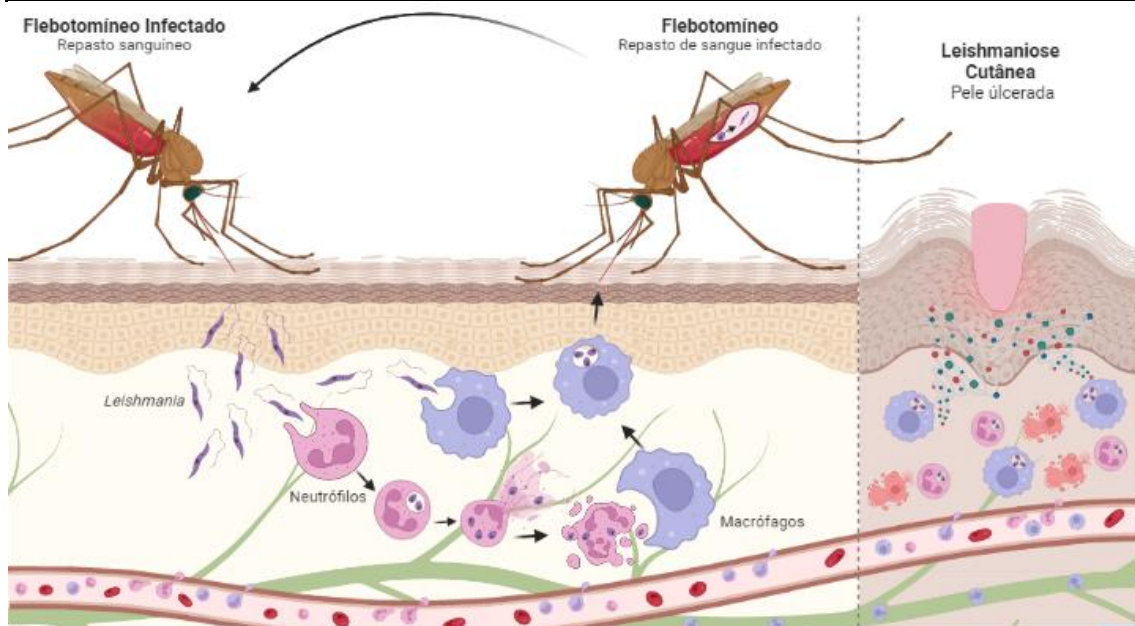
#### 2.4 Ciclo Biológico

A *Leishmania* possui um ciclo de vida digenético, ou seja, seu ciclo de vida envolve um hospedeiro mamífero e um inseto vetor, sendo capaz de infectar dois hospedeiros. Quando um mosquito infectado pela *Leishmania* se alimenta de sangue, promastigotas metacíclicas são depositadas no lugar onde o mosquito se alimentou (**Figura 7**). As formas promastigotas metacíclicas são altamente móveis e capazes de induzir ao remodelamento do colágeno, possivelmente pela secreção de

metaloproteinases e cisteínoproteinases, o que permite a migração delas através da matriz extracelular, composta principalmente por colágeno (Lira *et al.*, 1997; Fatoux-Ardore *et al.*, 2014; Petropolis *et al.*, 2014; Findlay *et al.*, 2021). O dano gerado na pele do hospedeiro pelo mosquito atrai macrófagos e neutrófilos para o local da lesão, essas células são, então, infectadas pela *Leishmania* (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Chaves *et al.*, 2020).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o sítio de infecção e fagocitar os parasitas, induzindo a liberação de espécies reativas de oxigênio e peptídeos antibacterianos no vacúolo parasitóforo, bem como a liberação de NETS (Rochael *et al.*, 2015), entretanto *in vivo* este processo não é capaz de diminuir a viabilidade dos parasitas (Hurrell *et al.*, 2015). Macrófagos dermais e macrófagos que migraram para o sítio de infecção são então infectados por meio da eferocitose de neutrófilos parasitados (Van Zandbergen *et al.*, 2004; Chaves *et al.*, 2020).

Ao serem fagocitadas pelos macrófagos, as leishmanias se diferenciam em amastigotas, e os macrófagos migram para o linfonodo drenante (Moll *et al.*, 1993; Muraille *et al.*, 2003; Ritter *et al.*, 2004). Acredita-se que esse processo pode ser modulado pelo parasita e possui um importante papel na disseminação da doença. Na fase crônica da doença, o colágeno da pele é substituído pelo colágeno III, essa mudança pode induzir à presença de uma matriz extracelular mais macia, pela qual os parasitas conseguiriam migrar e invadir o tecido de forma mais fácil (Abreu-Silva *et al.*, 2004). O ciclo se completa quando um flebotômico não infectado realiza o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingerindo macrófagos ou células dendríticas infectadas (e que se localizam no sítio de infecção). Os macrófagos se são destruídos em poucas horas liberando as formas amastigotas da *Leishmania* no aparelho digestivo do flebotômico, em torno de 24-48hs a *Leishmania* se diferencia em promastigota (Sacks and Perkins, 1984; 1985; Killick Kendrick and Rioux, 1991; Bates and Rogers, 2004; Ambit *et al.*, 2011).



**Figura 7: Ciclo de vida da *Leishmania* (Criado com Biorender).**

### 2.5 Apresentação Clínica da Leishmaniose Cutânea

A leishmaniose tegumentar apresenta um espectro de manifestações, podendo se manifestar como uma lesão única, exclusivamente cutânea e que tende à cicatrização ou as lesões podem ser numerosas, sendo denominada de leishmaniose cutânea disseminada. De forma geral, as lesões podem persistir por meses e algumas vezes por anos, e costumam aparecer algumas semanas ou meses após a exposição. As lesões se apresentam tipicamente como pápulas, placas nodulares ou lesões ulcerativas, com borda elevada e uma depressão central, fundo granuloso que pode estar recoberta por uma crosta, algumas lesões persistem como nódulos (**Figura 8**). As lesões geralmente são indolores, mas podem ser dolorosas principalmente se houver infecção bacteriana secundária (Brasil, 2017)



**Figura 8. Lesão de leishmaniose Cutânea. (Brasil, 2017)**



## 2.6 Aspectos Imunológicos

Durante o repasto sanguíneo, o conteúdo das glândulas salivares do flebotômíneo é injetado na pele do hospedeiro mamífero junto com as formas metacíclicas da *Leishmania*. A saliva do flebotômíneo é capaz de promover uma resposta imune inicial que favorece o estabelecimento da doença, entre as funções que a saliva do flebotômíneo exerce podemos destacar a regulação da cascata de coagulação, aumento na migração de neutrófilos, aumento na secreção de IL6, diminuição na secreção de TNF, além de diminuir a síntese de óxido nítrico (Rohousová and Volf, 2006; Menezes *et al.*, 2008). As células da epiderme (como os queratinócitos) respondem ao dano causado secretando moléculas coestimuladoras (como IFN- $\gamma$ ) que, então, atraem e induzem à ativação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos (Mbow *et al.*, 2001).

Macrófagos e neutrófilos, estão presentes nas primeiras horas de infecção e são capazes de fagocitar e induzir à secreção de diversas citocinas iniciando a resposta imune inata e adaptativa. A replicação do parasito no interior de macrófagos induz à produção de NO e ROS após a ativação dos macrófagos com IFN- $\gamma$  (Nacy *et al.*, 1985; Gantt *et al.*, 2001). O balanço entre as respostas Th1 e Th2 é determinante na progressão da leishmaniose. Uma resposta Th1 desbalanceada (excessiva secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) está associada com quadros mais graves de leishmaniose cutânea e mucocutânea (Melby *et al.*, 1994; Bacellar *et al.*, 2002).

As células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) também possuem um papel importante na leishmaniose secretando IL-12, o que favorece um perfil de linfócitos Th1 (León *et al.*, 2007). O receptor de quimiocina CCR2 auxilia na migração das células dendríticas inflamatórias para os linfonodos e na sua ausência há o favorecimento de uma resposta Th2 (Sato *et al.*, 2000; De Trez *et al.*, 2009).

## 2.7 Ativação do inflamassoma na leishmaniose

Para se iniciar a resposta imune e o reconhecimento do patógeno por meio de PRRs (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*). Dentre os principais PRRs envolvidos no reconhecimento de PAMPs (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) durante a infecção por *Leishmania* spp. estão os TLRs (do inglês, *Toll like Receptors*) (Kropf *et al.*, 2004; Liese *et al.*, 2007; Osanya *et al.*, 2011), NLRs (do inglês, *NOD-like receptor*) e CLR (do inglês, *C-type Lectin Receptor*) (Lefèvre *et al.*, 2013; Lima-Junior *et al.*, 2013; Lima-Junior *et al.*, 2017).

Os TLRs são proteínas transmembranas, caracterizados por um ectodomínio reconhecedor dos PAMPs, composto por regiões repetitivas ricas em leucina (LRR) e

uma cauda citoplasmática para a sinalização intracelular, referida como TIR (Toll/IL-1 receptor), e que serve para a ligação de diversas proteínas quinases e proteínas adaptadoras que iniciarão o processo de sinalização intracelular (Akira and Takeda, 2004). Sabe-se que TLR2 (Osanya *et al.*, 2011), TLR3 (Flandin *et al.*, 2006), TLR4 (Kropf *et al.*, 2004) e TLR9 (Liese *et al.*, 2007; Abou Fakher *et al.*, 2009) desempenham uma função importante na leishmaniose. A sinalização via TLRs culmina com a transcrição de genes inflamatórios como pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 e NLRP3 (Zamboni and Lima-Junior, 2015). Os NLR são de grande importância na leishmaniose, um exemplo é o inflamassoma de NLRP3 (Lima-Junior *et al.*, 2013; Gurung *et al.*, 2015; Charmoy *et al.*, 2016; Chaves *et al.*, 2019; De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019). Até o momento são conhecidos dois mecanismos de ativação do inflamassoma de NLRP3 na infecção por *L. amazonensis*, o primeiro mecanismo mostra que a dectina 1 (que é um receptor de lectina do tipo C - CLR) induziu à produção de ROS via proteína quinase Syk, atuando na ativação do inflamassoma NLRP3 durante a infecção por *L. amazonensis* (Lima-Junior *et al.*, 2017). O segundo mecanismo descrito mostra que LPG é capaz de ativar o inflamassoma de NLRP3 de forma não canônica via caspase-11 (De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019). Essas duas vias são capazes de induzir à secreção de IL-1 $\beta$ , que é importante para a restrição da replicação do parasita (Lima-Junior *et al.*, 2013).

A sinalização da IL-1 via IL-1R e Myd88 contribui para a produção de NO que desempenha um papel microbicida (Lima-Junior *et al.*, 2013). Por outro lado, a IL-18 pode agir em sinergismo com IL-12 na indução de um perfil Th1 (Li *et al.*, 2004; Haeberlein *et al.*, 2010) ou em sinergismo com a IL-4, auxiliando para um perfil Th2 (Bryson *et al.*, 2008), que é desfavorável para o controle da infecção. As vias de ativação do inflamassoma estão descritas na **Figura 9**.

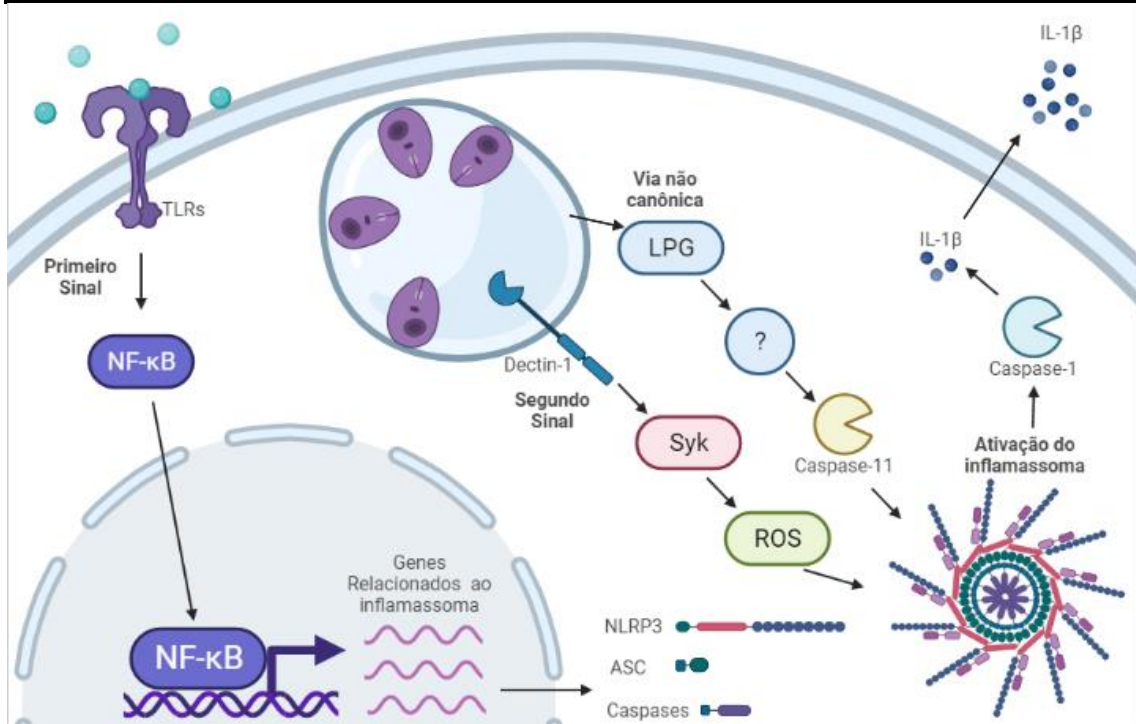


Figura 9. Ativação do inflamassoma na leishmaniose (Criado com Biorender).

### 3. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que afeta principalmente a população em países tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Latina (PAHO/WHO; Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2020a). São conhecidas mais de 20 espécies que podem causar Leishmaniose em humanos e as manifestações clínicas da doença podem ser visceral ou cutâneas, podendo variar de lesões indolores às formas difusas ou mucocutânea (Chappuis *et al.*, 2007; Reithinger *et al.*, 2007; Alvar *et al.*, 2012). Estima-se que cerca de 2 milhões de novos casos aparecem a cada ano e 12 milhões de pacientes têm doença ativa (PAHO/WHO; WHO, 2020a).

No hospedeiro mamífero, a *Leishmania* se replica em fagócitos profissionais e é bem aceito que regulação a das vias de morte celular das células hospedeiras é um mecanismo de evasão da resposta imune. Assim, a inibição da apoptose durante a infecção pela *Leishmania* já foi relatada em uma ampla gama de espécies e em muitos tipos de células (Aga *et al.*, 2002; Akarid *et al.*, 2004; Lisi *et al.*, 2005; Ruhland *et al.*, 2007; Gutiérrez-Kobeh *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2016). Desta forma, logo após a infecção, o parasita manipula a maquinaria de morte celular para prevenir a morte da célula hospedeira e assegura a formação dos vacúolos parasitóforos que suportam a replicação de parasitas.

Independentemente da morte celular, a ativação de receptores imunes inatos representa um mecanismos importante para a restrição da infecção pela *Leishmania* (revisado em Zamboni and Lima-Junior, 2015). Membros dos receptores endossomais do tipo Toll (TLR3, 7 e 9) (Flandin *et al.*, 2006; Ives *et al.*, 2011; Schamber-Reis *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2017) e os inflamassomas estão entre os receptores imunes inatos ativados durante a infecção por *Leishmania* (Lima-Junior *et al.*, 2013; Gurung *et al.*, 2015; Charmoy *et al.*, 2016; Lima-Junior *et al.*, 2017; Chaves *et al.*, 2019; De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019; De Carvalho, Lima-Junior, *et al.*, 2019). O inflamassoma é um complexo proteico composto por uma proteína sensora (como NLRP3), uma proteína adaptadora (como a proteína ASC) e uma caspase inflamatória, como a caspase-1 e caspase-4 (humano)/caspase-11 (camundongos) (revisado em Broz and Dixit, 2016).

A ativação de caspases inflamatórias pelo inflamassoma pode levar à morte celular inflamatória, conhecida como piroptose, processo importante para a eliminação de patógenos intracelulares (revisado em Jorgensen *et al.*, 2017). Mecanicamente, a morte

celular piroptótica ocorre após a clivagem da Gasdermin-D (GSDMD), uma proteína efetora formadora de poros que é clivada por caspase-1 e caspase-4/11 (Kayagaki *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). A GSDMD é composta por uma região efetora N-terminal e uma região C-terminal inibitória (Liu *et al.*, 2018; Ruan *et al.*, 2018; Wang, K. *et al.*, 2020). Após a ativação do inflamassoma, caspase-1 e/ou caspase-11 clivam GSDMD, liberando o fragmento N-terminal que é o domínio efetor. A porção N-terminal da proteína oligomeriza na membrana plasmática, formando poros em forma de anel que causam a morte celular devido à liberação de conteúdo intracelular e desequilíbrio osmótico (Fink and Cookson, 2006; Aglietti *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Sborgi *et al.*, 2016). Além disso, os poros formados pela GSDMD funcionam como canais para a liberação de IL-1 $\beta$ , que pode ocorrer mesmo em células viáveis (Evavold *et al.*, 2018). Tais características tornam a GSDMD uma molécula de grande importância na indução de respostas imunes protetoras contra patógenos intracelulares (Orning *et al.*, 2019).

Embora um número significativo de estudos, realizados por diferentes grupos, tenha demonstraram o papel fundamental dos inflamassomas na resposta do hospedeiro à *Leishmania*, os mecanismos moleculares que levam à ativação do inflamassoma permanecem obscuros. Foi demonstrado anteriormente que as vias de sinalização do hospedeiro, como Dectin-1/Syk Kinase e a produção de ROS gerada durante a fagocitose do parasita é responsável pela ativação de NLRP3 (Lima-Junior *et al.*, 2017). Além disso, o efluxo de K<sup>+</sup>, que é bem relatado como essencial para a ativação do NLRP3 em resposta a muitos estímulos é realmente necessária para a ativação do inflamassoma em resposta a *Leishmania* em células de camundongos e humanos (Lima-Junior *et al.*, 2013; De Carvalho, Lima-Junior, *et al.*, 2019; Cardoso *et al.*, 2021). Nesse contexto, a necessidade do efluxo de K<sup>+</sup> para ativação de NLRP3 em células infectadas por *Leishmania* é paradoxal porque os parasitas de *Leishmania* previnem ativamente os danos da membrana plasmática evitam a morte da célula hospedeira, conforme amplamente relatado (Handman and Bullen, 2002; Denkers and Butcher, 2005; Gregory and Olivier, 2005; Podinovskaia and Descoteaux, 2015). Além de não existirem trabalhos publicados que demonstrem a importância da GSDMD na infecção por *Leishmania* spp. Para responder a essas questões-chave, avaliamos o papel do GSDMD na infecção por *Leishmania*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da Gasdermina-D na ativação do inflamassoma durante infecção por *Leishmania spp.*

### 4.2 Objetivos Específicos

#### **i) Avaliar a ativação de GSDMD em resposta à infecção por *Leishmania***

Racional: A GSDMD é a principal molécula na formação de poro via ativação de caspases inflamatórias (caspase-1 e caspase-11) e desempenha importante papel na indução do processo de piroptose, sendo uma molécula efetora importante da via do inflamassoma (Shi *et al.*, 2015). Assim, hipotetizamos que a ativação do inflamassoma induz à formação de poro pela GSDMD. Dados já publicados e os resultados recentemente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstram que o tratamento com potássio extracelular inibe a ativação de NLRP3, levando à falha no controle replicativo de *L. amazonensis* (Lima-Junior *et al.*, 2013). Dessa forma, estabelecer a correlação entre a formação de poros pela GSDMD e o efluxo de potássio para ativação do inflamassoma de NLRP3 em resposta à infecção por *L. amazonensis* contribuiria para o conhecimento das vias intracelulares para o controle do patógeno.

#### **ii) Avaliar as vias do inflamassoma responsáveis pela clivagem da GSDMD *in vitro* e *in vivo*.**

Racional: Em modelos experimentais bacterianos já foi descrito que a ativação dos inflamassomas de NLRP3 e AIM2 leva a clivagem de GSDMD pelas caspase-1 ou caspase 11 (Hornung *et al.*, 2009; Kayagaki *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015), ocorrendo a associação da região N-terminal da GSDMD e a formação do poro (He *et al.*, 2015). Entretanto, ainda não são conhecidas as vias de ativação da GSDMD durante a infecção pela *Leishmania*, sendo de extrema importância a caracterização desses processos em doenças infecciosas inflamatórias, pois o entendimento dessas vias pode futuramente ser utilizado com propósitos terapêuticos. Assim, temos como objetivo investigar quais dos inflamassomas são responsáveis pela clivagem de GSDMD e a formação de poro.

**iii) Avaliar a localização intracelular de GSDMD em resposta à infecção por *L. amazonensis*.**

Racional: A GSDMD possui uma estrutura composta por duas regiões, uma N-terminal efetora e uma região C-terminal auto inibitória (Liu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018) Após a ativação do inflamassoma, as caspases-1 e a caspase-11 clivam a GSDMD (Kayagaki *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015), dessa forma a região N-terminal da proteína se oligomeriza em estruturas em forma de anel, formando poros na membrana (Aglietti *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). Recentemente foi descrito que mesmo em células viáveis esses poros são canais para a liberação de IL-1 $\beta$  (Evavold *et al.*, 2018). Para compreender melhor esse mecanismo na infecção pela *L. amazonensis*, pretendemos identificar a localização intracelular e a formação do poro de GSDMD em resposta à infecção.

**iv) Avaliar a importância de GSDMD no controle da replicação em macrófagos e *in vivo*.**

Racional: Resultados já publicados pelo nosso grupo de pesquisa mostram que o inflamassoma de NLRP3 é importante para o controle da replicação da *Leishmania* (Lima-Junior *et al.*, 2013). A ativação do NLRP3 pode ocorrer por uma via não canônica, em que a formação do poro em resposta a diferentes inflamassomas é responsável pelo efluxo de potássio que ativa o NLRP3 (Cunha *et al.*, 2017). Assim, acreditamos que o reconhecimento da *L. amazonensis* pelo inflamassoma leva a formação de poro pela GSDMD e que o efluxo de K<sup>+</sup> resultante desse processo é responsável por ativar o NLRP3, resultando no controle da replicação do parasita. Dessa maneira, pretendemos avaliar se a GSDMD é importante para a replicação da *Leishmania* em infecções de macrófagos *in vitro* e *in vivo* de camundongo deficientes para GSDMD.

**v) Avaliar a ativação da GSDMD nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea.**

Racional: Afim de avaliar se os nossos achados *in vitro* e *in vivo* em camundongos são aplicáveis na fisiopatologia da leishmaniose cutânea em humanos, vamos avaliar a ativação do inflamassoma e clivagem da GSDMD em biopsias de pele de pacientes com leishmaniose.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais e infecção

Camundongos fêmeas C57BL/6 (WT – Jackson Laboratório, número de estoque 000664) com idade entre seis e oito semanas e deficiente em caspase-11 (Casp11<sup>-/-</sup>) (Kayagaki *et al.*, 2011), caspase-1/11 (Casp1/11<sup>-/-</sup>) (Kuida *et al.*, 1995), NLRP3 (Nlrp3<sup>-/-</sup>) (Mariathasan *et al.*, 2006) e Gasdermin-D (Gsdmd<sup>-/-</sup>) (Chen *et al.*, 2019) com *background* de C57BL/6 foram mantidos sob condições livres de patógenos no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética para uso animal, CETEA/FMRP (Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Protocolo aprovado 018/2019).

### 5.2 Cepas de parasitas e cultivo de parasitas

Os parasitas utilizados neste estudo são *Leishmania (L.) amazonensis* PH8 (IFLA/BR/67/PH8) e esta cepa expressando constitutivamente a proteína fluorescente vermelha (RFP) (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. David L. Sacks, Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID504 NIH, EUA), cepa *Leishmania (V.) braziliensis* M2903 (MHOM/BR/75/M2903), cepa *Leishmania (L.) major* LV39 (MRHO/SU/59/P) e cepa *Leishmania (L.) mexicana* M379 (MNYC/BZ/62/M379). As cepas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* expressando constitutivamente EGFP foram construídas amplificando EGFP de pEGFP-C1 usando os primers NotI\_FP\_C1\_F (GCGGCCGCATGGTGAGCAAGGGCGA) e BamHI\_FP\_C1\_R (TGGATCCTTATCCCGGGCCCGCGGTACC). O EGFP foi clonado no plasmídeo pSSU-tdTomato-Neo (Beattie *et al.*, 2010) originando pSSU-EGFP-C1-Neo. O pSSU-EGFP512 C1-Neo foi duplamente digerido com PacI e PmeI, e o fragmento de DNA linear foi usado no processo de transfecção das leishmanias. Após seleção positiva com G418, os clones transfectados foram selecionados por PCR com os seguintes primers: Neo\_end\_F (CTATCGCCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG) e Down\_SSU\_R (AGGAAGCCAAGTCATCCATC). A expressão de EGFP em promastigotas foi confirmada por microscopia de fluorescência. *Leishmania (L.) major* LV39 (MRHO/SU/59/P) expressando constitutivamente DSRred foram gentilmente cedidos pela profa. Dra. Ângela Cruz (FMRP/USP, Brasil).



Os parasitas foram cultivados a 26 °C em meio Schneider (Invitrogen, Carlsbad, CA), pH 6,5, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL), 100 U/ml de penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), 2 mM de L-glutamina e 1 mg/ml de biotina (Sigma). Após seis passagens em cultura, os parasitas foram passados em camundongo C57BL/6 para garantir que a virulência da cepa fosse mantida. As formas infecciosas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* foram isoladas da fase estacionária da cultura, por meio de centrifugações seriadas a 800 rpm e depois a 4000 rpm. A *Leishmania* em fase metacíclica foi isolada por gradiente de densidade usando ficol 40% e 10% de acordo com o protocolo descrito (Späth and Beverley, 2001).

### 5.3 Preparação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongo e infecção *in vitro*

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) foram diferenciados da medula óssea extraída de fêmures de camundongos C57BL/6 (WT), *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Casp11*<sup>-/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup>. As células da medula óssea foram diferenciadas em meio R10/20 compreendendo RPMI 1640 contendo 20% de SFB, 20% de meio condicionado de células S3T3, 15 mM de HEPES, 2g NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. O as células foram mantidas em placas de Petri de dimensões 90 x 15 mm (Becton Dive - BD, EUA), a 37° C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 dias, mais 10 ml do respectivo meio foi adicionado. Após sete dias de incubação, os macrófagos foram coletados lavando as monocamadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelada.

As células foram colocadas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, em meio R10 (RPMI contendo 10% SFB) e deixadas para aderir por 24 horas antes de serem usadas nos experimentos. Após 24 horas, os BMDMs foram infectados com formas promastigotas do parasita na fase estacionária, com MOI 10. Após 1, 2 ou 4 horas de infecção (conforme indicado nas legendas), as culturas infectadas foram lavadas com PBS a 37°C e 10% de cultura RPMI médio (10% de SFB).

### 5.4 Transdução retroviral de GSDMD-mNeon

O vetor lentiviral que codifica GSDMD-mNeon-tagged (Rathkey *et al.*, 2017) foi usado para expressar GSDMD-mNeon em macrófagos. Os vetores psPAX2 e PMDG foram usados para a montagem dos retrovírus em monocamadas de células HEK Peak (ATTC CRL-2828) transfectadas com os três plasmídeos. O sobrenadante de células Peak foi coletado 3 dias após a transfecção, filtrado por um filtro de 0,45µm e adicionado às

culturas de BMDMs após 3 dias de diferenciação. BMDMs foram obtidos do fêmur de camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com 20% SFB e 20% sobrenadante de células S3T3. Após 3 dias de diferenciação, os BMDMs foram coletados e colocados em cultura contendo sobrenadante de células Peak e suplementado com RPMI contendo 20% de SFB e 20% de S3T3. Os BMDMs foram novamente alimentados no 5º dia de cultivo, com meio RPMI 1640 contendo 20% de S3T3 e 20% de SFB e as células que expressam os plasmídeos foram selecionados usando 1mg/ml de G418 por 3 dias. Após 7 dias de cultura, a monocamada de macrófagos expressando GSDMD-mNeon foram descoladas com PBS gelado e colocados em placas de 24 poços, contendo lamínulas de 13 mm. A cultura de macrófagos expressando GSDMD-mNeon foi infectada com *L. amazonensis* que expressa constitutivamente RFP em um MOI 5.

### 5.5 Imunofluorescência

Para experimentos *in vitro*, BMDMs foram plaqueados em lamínulas de 13 mm na confluência de  $2 \times 10^5$  células/poço, em placas de 24 poços. As células foram infectadas com *L. amazonensis* expressando RFP. As placas foram centrifugadas a 200 x g por 5 minutos em temperatura ambiente e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A membrana plasmática foi corada com Aglutinina de Germe de Trigo (*Wheat Germ Agglutinin* - WGA) conjugado com Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 (Invitrogen; W32466) seguindo as instruções de fabricação. As células foram então fixadas com paraformaldeído a 4% e permeabilizadas com saponina a 0,1%. As lamínulas foram lavadas com PBS e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com PBS contendo 10% de soro de cabra. Os puncta de ASC foram marcados com anticorpo anti-ASC (1:2000; Adipogen AL177) ou anti-GSDMD C-terminal clivado (1:1000; Abcam; ab255603), seguido de coloração com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 ou 594 (diluição 1: 3000, Invitrogen, Molecular Probes). Todas as lavagens foram feitas em PBS e todas as diluições foram em PBS-Soro de Cabra. As lamínulas foram invertidas em meio de montagem contendo DAPI (DAPI ProLong<sup>™</sup> Gold Antifade Reagent, Invitrogen) em lâminas para microscopia de fluorescência. A avaliação da formação de poros de GSDMD-mNeon e puncta de ASC foi realizada observando 100 células em ampliação de 63x, no microscópio Multifoton Zeiss LSM 780 microscópio. A porcentagem de células apresentando puncta de ASC ou GSDMD clivada foi obtida e foram calculados os desvios padrão a partir de três lamínulas.

Para imunofluorescência de biópsia de pele humana e orelhas infectadas de camundongos, amostras de tecido com 3 µm de espessura foram corados com

hematoxilina e eosina (H&E) e analisados por patologistas. Os cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espessura foram incubados com anticorpo primário *overnight* a 4°C e com os anticorpos secundários anti-cabra, anti-camundongo ou anti-coelho Alexa fluor-647, 594 ou 488 (Invitrogen). Para contagens de puncta, os cortes teciduais foram visualizados em uma objetiva de 63x e imagens aleatória foram adquiridas usando o sistema Axio Observer combinado com o dispositivo confocal LSM 780 com ampliação de 63x (Carl Zeiss), foi analisada uma área de  $\sim 1,7 \text{ mm}^2$  por caso. A contagem manual dos puncta e das células foram normalizadas pela área do tecido analisado e as análises morfométricas foram realizadas conforme descrito (Weibel, 1963).

### 5.6 Ensaio ELISA

Para a quantificação de citocinas por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), BMDMs foram plaqueados em placas de 24 poços ( $5 \times 10^5$  células/poço) e pré-tratados com 100ng/ml LPS (*Escherichia coli* 055: B5 LPS, Sigma) ou Pam3Cys por 4 horas e depois infectado com *L. amazonensis* (MOI 10). A citocina IL-1 $\beta$  presente no sobrenadante foi medido por ELISA usando o kit BD OptEIA (BD Biosciences), de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante.

### 5.7 Ensaio de permeabilização de membrana

Para avaliar o influxo de iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo, BMDMs na confluência de  $5 \times 10^5$  células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços. As células foram infectadas com *L. amazonensis* com MOI 10 e centrifugado a 200 x g por 5 min, 25 °C. Após 4h e 24h as células foram tratadas com meio R10 contendo PI (5 $\mu\text{g/ml}$ ) por 30 min, após as placas foram lavadas com PBS e as células foram soltas com tripsina. A fluorescência das células marcadas com PI foi detectada em citômetro de fluxo no canal FL3. Para avaliar o influxo de iodeto de propídio (PI) por imunofluorescência, BMDMs plaqueados em lâminas de vidro de 13 mm em placas de cultura de 24 poços na confluência de  $5 \times 10^5$  células/poço foram infectadas com *Leishmania* (MOI 10) a  $5 \times 10^5$ . Antes da infecção as células foram tratadas com 100 ng/ml de LPS ou Pam3Cys por 4 horas. Após a infecção as placas foram centrifugadas por 200xg por 5 min em temperatura ambiente e incubadas por 2h ou 24h a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. As lamínulas foram então invertidas em uma gota de 5  $\mu\text{L}$  de PBS contendo 25  $\mu\text{g/ml}$  de PI e 5  $\mu\text{g/ml}$  de Hoechst. Todas as células foram coradas com Hoechst, enquanto que apenas células com poros de membrana permitiram a difusão do PI na célula. As imagens foram adquiridas usando

microscópio Leica (DMI4000B) com objetivas de 100x e analisados usando o software ImageJ.

### 5.8 Quantificação do $K^+$ intracelular

As concentrações intracelulares de potássio foram determinadas por emissão de fluorescência da sonda Assante Potassium Green-2 (APG-2 AM, TEFlabs) conforme descrito anteriormente (Cunha *et al.*, 2017). BMDMs de camundongos C57BL/6 (WT), *Nlrp3<sup>-/-</sup>*, *Casp11<sup>-/-</sup>* e *Gsdmd<sup>-/-</sup>* foram plaqueados em placas de 96 poços (Corning® 96 Well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-Treated Microplates) e infectadas com *L. amazonensis* por 2 ou 24 horas. Após a infecção, o sobrenadante foi removido, foi adicionado a cultura meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol e sem SFB, contendo 5µM APG-2 AM por 30 minutos. Após a incubação com a sonda, os poços foram lavados 3 vezes com PBS em temperatura ambiente e adicionado ao final das lavagens meio RPMI sem vermelho de fenol e sem SFB. A fluorescência foi lida no Fluorômetro FlexStation 3 (Molecular Devices). Os parâmetros de análise do *Relative Fluorescence Units* (RFU), foram padronizados para ler a emissão no comprimento de onda determinado pelo fabricante.

### 5.9 Quantificação de parasitas em células e tecidos

A atividade leishmanicida de macrófagos *in vitro* foi determinada por citometria de fluxo usando o citômetro de fluxo FACS ACCURI C6 (BD Biosciences) ou contados em lâminas coradas com Giemsa em microscópio de luz com aumento de 40x, 1, 24, 48 e 72 horas após a infecção. Os dados de citometria foram analisados usando o software FlowJo (Tree Star), foram considerados dois parâmetros: a porcentagem de células infectadas e a Média da Intensidade de Fluorescência (MFI), que reflete a média de amastigotas por célula. No Giemsa a taxa de infecção foi determinada pela proporção de células infectadas e células não infectadas (foram contados 100-200 BMDMs por lâmina analisada) e o número de amastigotas intracelulares por BMDM infectados.

Para infecções *in vivo*, os camundongos foram infectados com  $10^6$  parasitas em fase estacionária ou  $10^3$  parasitos na fase metacíclica como descrito anteriormente. A lesão da orelha foi medida semanalmente com paquímetro digital e comparada com a espessura da orelha direita não infectada. Diluições limitantes foram usadas para avaliar as cargas de parasitas nos tecidos infectados conforme relatado (Lima-Junior *et al.*, 2013). Resumidamente, na semana indicada, os camundongos foram sacrificados e a orelha infectada e o linfonodo drenante foram removidos, macerados e plaqueados em uma placa

de cultura de 96 poços com meio Schneider em uma diluição seriada de 1:20 para a orelha e 1:5 para o linfonodo. Após 7 dias de cultura a 26°C, o número de parasitas no respectivo órgão foi contado de acordo com a crescimento observado na diluição seriada.

#### 5.10 Quantificação de parasitas e expressão de mRNA na orelha e linfonodos de camundongos infectados

Os camundongos foram infectados com  $10^3$  parasitos de *Leishmania amazonensis* na fase metacíclica como previamente descritos (Lima-Junior *et al.*, 2013), após 15 semanas a orelha e os linfonodos drenantes foram coletados. DNA e RNA foram obtidos por extração com 1 mL de reagente Trizol (ThermoFisher) e a purificação foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O RNA e o DNA foram quantificados por espectrofotometria no NanoDrop 2000c. A concentração do RNA foi ajustada para 1 ug/ $\mu$ L. O RNA foi armazenado a -70 °C até a transcrição reversa e usado para a quantificação da expressão de mRNA de citocinas. DNA foi usado para a quantificação dos parasitas por PCR em tempo real, utilizando primers específicos para o gene kDNA do parasita como descritos anteriormente (Jara *et al.*, 2013). Para transcrição reversa, o RNA total foi transcrito em DNA complementar (cDNA) usando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (sem inibidor) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi preparada em um volume final de 20,0  $\mu$ L contendo 4,2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 2,0  $\mu$ L de tampão, 2,0  $\mu$ L de primers aleatórios, 0,8  $\mu$ L de dNTP Mix (100 mM), 1,0  $\mu$ L de enzima transcriptase reversa (RT) e 1  $\mu$ L de RNA (1 ug/ $\mu$ L). A solução foi então colocada em um termociclador com o seguinte programa: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. A PCR em tempo real foi realizada em placas de 96 poços usando reagentes Sybr Green (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) e um sistema de PCR em tempo real de estúdio Quant (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O RT-PCR foi realizado em um volume total de 20  $\mu$ L em um 96-Placa MicroAmp Fast Optical de poços (Applied Biosystems). Cada poço continha 10  $\mu$ L SYBR Green qPCR Master Mix (Thermofisher), 1  $\mu$ L de cada primer, 2  $\mu$ L cDNA (20 ng) e 7  $\mu$ L de água livre de RNase usando o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s seguido de anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. As sequências de primers estão na **Tabela 1**. Cada PCR foi seguido por uma análise da curva de dissociação entre 60-95 °C. Os valores de Ct foram analisados pelo método comparativo Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) e normalizado para o controle endógeno GAPDH. As diferenças de expressão gênicas foram normalizadas pela expressão  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

### 5.11 Quantificação de citocinas *ex vivo*

Os camundongos foram infectados com  $10^3$  de parasitos de *Leishmania amazonensis* na fase metacíclica como previamente descritos (Lima-Junior *et al.*, 2013), após 15 semanas as orelhas foram coletadas e maceradas em PBS. níveis de IL-1 $\beta$  foram avaliados por ensaio ELISA (R&D Systems) no macerado de orelha de camundongos infectados seguindo as instruções do fabricante. TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, IFN-  $\gamma$  e IL-17 foram quantificados no macerado da orelha usando o kit CBA de citocinas (Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit; BD Biosciences) seguindo as instruções do fabricante.

### 5.12 Western Blot

Um total de  $10^7$  BMDMs foram plaqueados em placa de 6 poços, primados com 100 ng/ml de LPS ultrapuro (InvivoGen, tlr1-peklps) por 4h e depois infectado com *L. amazonensis* por 24h. O sobrenadante foi coletado e concentrados por ultrafiltração (Amicon Ultra 0,5 mL). As células remanescentes nos poços foram lisadas com tampão RIPA (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, 1% desoxicolato e 0,1% SDS) na presença de um coquetel de inibidores de protease (Roche). O lisado e sobrenadante foram ressuspensos em tampão Laemmli (50mM Tris pH6,8; 2% de SDS; 0,1% de azul de bromofenol; 10% de glicerol; 2,5% de  $\beta$ -mercaptoetanol). As proteínas foram fervidas a 100°C por 5 min. A eletroforese das proteínas foi realizada em gel de acrilamida 12% (SDS PAGE), onde foi adicionado o lisado celular. A corrida ocorreu com tampão de corrida Tris/Glycine/SDS (25 mM Tris, 190 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3) inicialmente a 80 V por e posteriormente a 100 V. As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,22  $\mu$ m (GE Healthcare, USA) utilizando o sistema de transferência *Semidry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, USA) a 15 volts por 30 min. Nesse sistema foi utilizado tampão de transferência (50mM Tris, 40mM glicina e 10% metanol). A membrana foi bloqueada com solução salina tamponada com Tris (TBS) com 0,01% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado por 1h. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos monoclonais para IL-1 $\beta$  (1: 1000, Sigma, I3767) e GSDMD (1: 1000, Abcam, Ab209845) overnight a 4°C, as membranas foram lavadas em TBS-Tween e incubadas por 1h a temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos (1:3000). A detecção de anticorpos secundários infravermelhos foi visualizada pelo sistema de imagem LI-COR Odyssey CLx. O reagente ECL luminol (GE Healthcare) foi usado para a detecção de anticorpo secundários HRP para visualização por quimioluminescência convencional.

### 5.13 Avaliação de Citotoxicidade por Liberação de Lactato Desidrogenase (LDH)

BMDMs foram plaqueados em placas de 24 poços com uma confluência de  $5 \times 10^5$  células/poço. Foi coletado o sobrenadante para avaliação da liberação da LDH por ensaios colorimétricos utilizando o kit CytoTox 96® (Promega) de acordo com instruções do fabricante. A porcentagem de liberação de LDH foi calculada como a razão da amostra pelo LDH máximo obtido a partir de BMDMs lisados com Triton X-100. A leitura foi realizada no FlexStation 3 (Molecular Devices) com uma OD 490 nm.

### 5.14 Aquisição de Vídeo

Para avaliar o influxo de iodeto de propídio (PI) por microscopia de lapso de tempo, BMDMs em uma confluência de  $25 \times 10^4$  células/poço foram cultivados em placas de 30 mm. Antes da infecção, as células foram tratadas com 100 ng/ml de LPS ou Pam3Cys por 4h. As células foram infectadas com *L. amazonensis* com MOI 10 e centrifugado a 200 x g por 5 min, 25°C com meio R10 contendo iodeto de propídio (5µg/ml), após centrifugação as placas foram incubadas no microscópio BioStation IM-Q (Nikon) e as imagens foram adquiridas a cada 10 min por 20 horas em contraste de fase e no canal 594. As imagens foram analisadas usando o software ImageJ.

### 5.15 Ensaio de oligomerização ASC

Um total de  $10^7$  BMDMs foram usados por poço em placas de 6 poços, primados com 100 ng/ml de LPS ultrapuro (InvivoGen, tlr1-pek1ps) por 4h e depois infectados com *L. amazonensis* por 24h. Os BMDMs foram ressuspensos em uma solução hipotônica (10 mM Hepes - pH 7,9, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,2 mM 734 PMSF, 0,5 mM DTT, coquetel de inibidor de protease Roche), incubado em gelo por 15 minutos, homogeneizado (Kontes 22 mm) e centrifugado por 8 minutos a 10.000 g. Os pellets foram ressuspensos em 500 µL de tampão CHAPs (20 mM HEPES-KOH - pH 7,5, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de EGTA, 0,1% de CHAPs, 0,1 mM de PMSF e inibidor de protease da Roche) e centrifugado por 8 minutos a 10.000 g. Finalmente, os pellets foram ressuspensos em 200 µL de tampão CHAPs, 4 µL de DSS 100 mM e incubada por 30 min no escuro. Os oligômeros foram resolvidos em 12% SDS-PAGE e visualizados por immunoblotting com um anticorpo anti-ASC (Adipogen AL177).

### 5.16 Amostras de biópsia de pele

Biopsias de pele de pacientes infectados com *L. braziliensis*, foram obtidos no Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil, sete amostras de tecido incluídas em parafina e fixado em formalina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) de biópsias de pele de lesão de pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea, que foram coletados entre 2010 e 2019. O grupo controle consistiu em seis amostras de tecido incluídas em parafina e fixados em formalina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) de biópsias de pele de pacientes submetidas a mastectomia redutora. As análises realizadas com amostras humanas foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa humana da Universidade de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob o protocolo número 5.117.488. Como as amostras humanas já estavam disponíveis no SERPAT-HC/FMRP, o consentimento livre esclarecido por escrito não foi necessário para a aprovação deste do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da USP-HC FMRP.

### 5.17 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real das amostras embebidas em parafina

As amostras foram cortadas em 3 cortes de 10 µm e colocadas em tubos Eppendorf de 2,0 ml sem RNase. Os cortes foram desparafinizados por incubação em 0,8 ml de xileno a 37 °C durante 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas, o sobrenadante foi removido e xileno fresco foi adicionado por 5 minutos. Após a desparafinização e centrifugação, os cortes foram lavados com 0,8 ml de etanol, seco ao ar por 10 minutos e ressuspensos em 25 µL de Proteinase K (20 mg/ml; Gibco BRL, Gaithersburg, MD) mais 720 µL de um tampão de digestão com as seguintes concentrações finais: 20mM TRIS-HCl pH8, 10mM EDTA pH8, 1% de SDS. As amostras foram vortexadas e incubadas durante a noite a 55 °C a 400 rpm. Foi adicionado mais 25 µL de Proteinase K (20 mg/ml), seguidas de homogeneização e incubação por 2h a 55 °C. O RNA foi obtido por extração com 1 mL de reagente Trizol e a purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria no NanoDrop 2000c. A concentração do RNA foi ajustada para 1 µg/µL, e o RNA foi armazenado a -70°C até a transcrição reversa.

Para a transcrição reversa, o RNA total foi transcrito em DNA complementar (cDNA) usando High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (sem inibidor) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA). A



reação foi preparada em um volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 4,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão, 2,0  $\mu\text{L}$  de primers aleatórios, 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTP Mix (100 mM), 1,0  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptase reversa (RT) e 1  $\mu\text{L}$  de RNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). A solução foi então colocada em um termociclador com o seguinte programa: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. A PCR em tempo real foi realizada em placas de 96 poços usando reagentes Sybr Green<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) no termociclador QuantStudio (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A RT-PCR foi realizada em um volume total de 20  $\mu\text{L}$  em uma placa MicroAmp Fast Optical de 96 poços (Applied Biosystems). Cada poço continha 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher), 1  $\mu\text{L}$  de cada primer, 2  $\mu\text{L}$  de cDNA (20 ng) e 7  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase usando o seguinte protocolo: inicial desnaturação a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s seguido de anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. As sequências de primers estão na **Tabela 1**. Cada PCR foi seguido por uma análise da curva de dissociação entre 60-95 °C. Os valores de Ct foram analisados pelo método comparativo Ct ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) e normalizado para o controle endógeno GAPDH. As diferenças de expressão gênicas foram normalizadas pela expressão  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

#### 5.18 Análise estatística

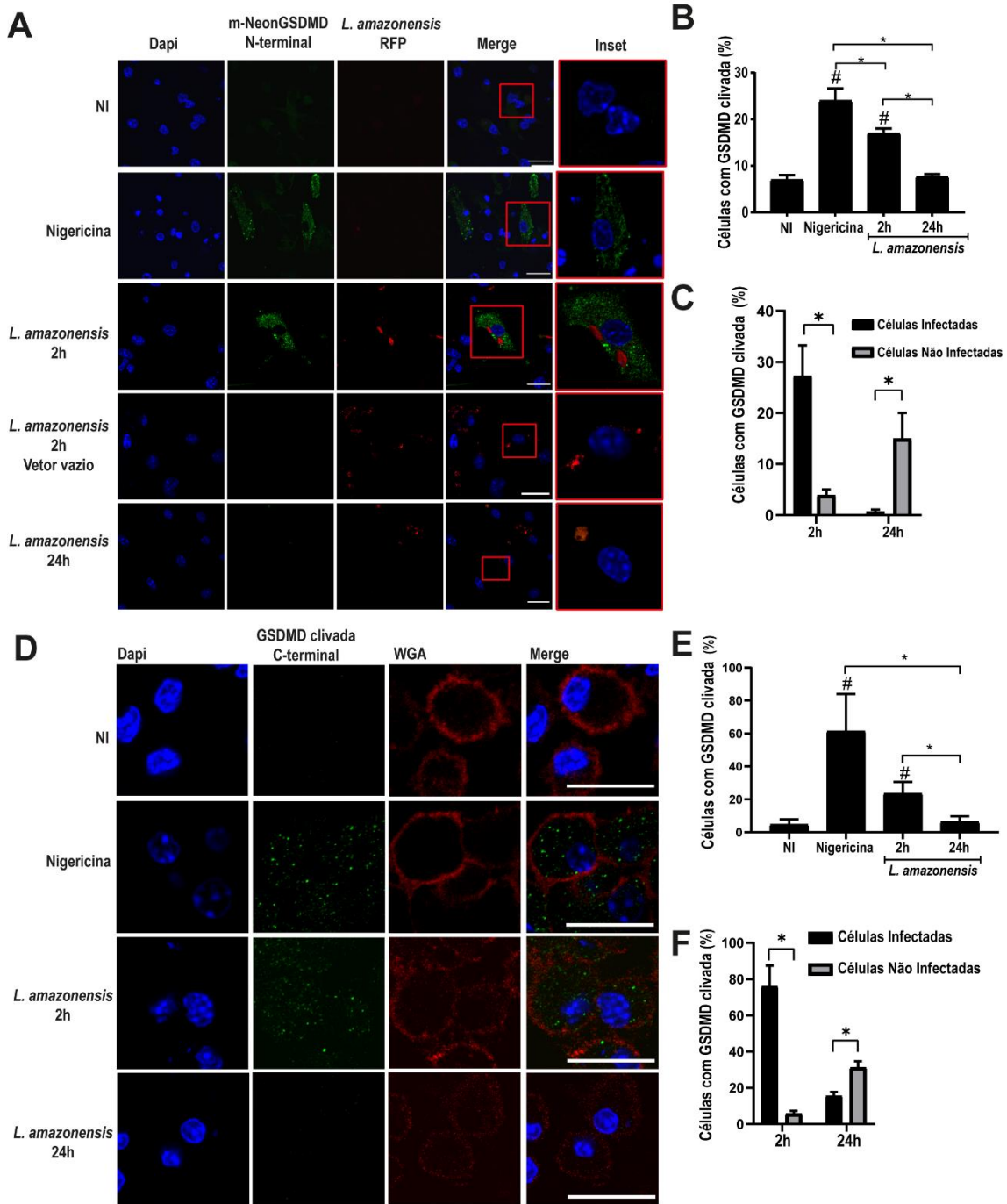
Os resultados estão representados como média e desvio padrão (SD). Para comparação entre múltiplos grupos, foi utilizada a análise de variância (two-way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças nos valores obtidos entre dois grupos diferentes foram determinadas usando o teste T de Student não pareado. As análises foram realizadas com o auxílio do software GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad, San Diego, CA).

O heatmap foi construído usando a função heatmap.2 no programa R (Project for Statistical Computing, versão 3.4.1).

## 7. RESULTADOS

### *7.1A infecção por Leishmania em macrófagos induz a ativação transiente de GSDMD, mas não a morte celular*

Para investigar a ativação de GSDMD e a formação de poros em macrófagos infectados com *Leishmania*, realizamos um protocolo previamente descrito usando o plasmídeo GSDMD-mNeon marcado em sua região N-terminal que permite a visualização do GSDMD clivado por meio da fluorescência do mNeon (Rathkey *et al.*, 2017). Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) transduzidos com retrovírus GSDMD-mNeon foram infectados com fase estacionária de *L. amazonensis* expressando constitutivamente RFP por 2 e 24h, a clivagem de GSDMD foi acessada por imunofluorescência. Detectamos clivagem de GSDMD após 2h de infecção, mas após 24h infecção, encontramos uma redução significativa na clivagem de GSDMD (**Figura 10A, B**). Nigericina, que é uma toxina bacteriana conhecida por desencadear a ativação do inflamassoma, foi usada como controle (**Figura 10A, B**). Avaliamos a clivagem GSDMD em células infectadas versus não infectadas e observamos que a maioria das células com GSDMD clivada com 2h de infecção estão infectadas (**Figura 10C**). Em contraste, 24h após a infecção apenas as células não infectadas contêm GSDMD, sugerindo que a *Leishmania* inibe a clivagem canônica de GSDMD após a infecção (**Figura 10C**). Em seguida, testamos a clivagem GSDMD endógena por coloração do fragmento C-terminal clivado de GSDMD. Descobrimos que a GSDMD endógena é clivada em resposta a *Leishmania amazonensis* após 2h de infecção, mas não após 24h (**Figura 10D, E**). Análise da GSDMD C-terminal em células infectadas versus não infectadas indicam que a maioria das células com GSDMD C-terminal clivada em 2h estão infectadas, o contrário foi observado no tempo de 24h após a infecção (**Figura 10F**).

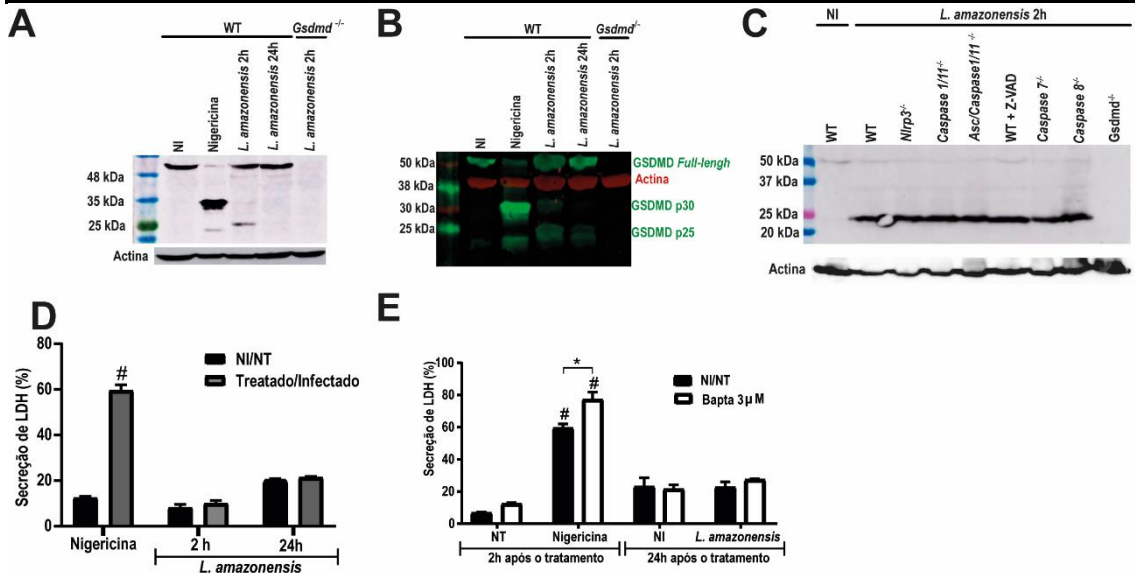


**Figura 10. Infecção por *Leishmania* induz clivagem de GSDMD em macrófagos.** (A-C) Macrófagos primários derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram transduzido com um lentivírus que codifica GSDMD-mNeon e selecionado por 72h com G418. (A) Imagens representativas de BMDMs expressando GSDMD-mNeon, pré-tratadas por 4h com LPS (100 ng/mL) e infectado com *L. amazonensis* expressando RFP; MOI 3. O núcleo das células foi marcado com Dapi (azul). As imagens mostram GSDMD clivada em BMDMs infectados. As imagens foram adquiridas por microscopia multi-foton usando uma objetiva de 63x com óleo de imersão e analisadas usando o software ImageJ. Barra de escala 20  $\mu$ m. (B-C) A porcentagem de BMDMs transduzidos com GSDMD clivada após 4 e 24h de infecção com *L. amazonensis*. Nigericina foi usada como controle positivo. (C) A porcentagem de BMDMs infectados versus não infectados com GSDMD clivado após 2 e 24hs de infecção. Foi analisado um total de 100 células em cada poço da triplicata. (D-F) BMDMs de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e infectados com *L. amazonensis* com um MOI 5. (D) Imagens representativas de BMDMs coradas com GSDMD anti-C-terminal mostrando clivagem de

GSDMD endógena (verde). A membrana plasmática foi marcada com WGA (vermelho). As imagens foram adquiridas por microscopia multi-foton usando uma objetiva de 63x com óleo de imersão e analisadas usando o software ImageJ. Barra de escala 20µm. (E) A porcentagem de BMDMs com clivagem de GSDMD endógena (C-terminal) após 2 e 24hs infecção. (F) A porcentagem de BMDMs infectados e não infectados com clivagem de GSDMD endógena (C-terminal) após 2 e 24hs de infecção. Um total de 100 células foram analisadas por poço em triplicata. As barras de erro representam  $\pm$  SD. #,  $P < 0,05$  em comparação com células NI/NT; \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado por Two-way ANOVA. Mostrado é um experimento representativo de cinco experimentos independentes realizados.

Para avaliar melhor a GSDMD em resposta à infecção por *Leishmania*, infectamos BMDMs por 2 e 24h e avaliaram o processamento da GSDMD por Western Blot. Curiosamente, descobrimos que diferente do produto canônico de 35 kDa induzido pela Nigericina, a infecção por *Leishmania* induz a produção de um fragmento não canônico de 25 kDa (**Figura 11A, B**). Nós ainda investigamos a participação de caspases na produção deste fragmento não canônico de GSDMD e observamos que a produção do fragmento de 25 kDa ocorre em BMDMs Casp1/11<sup>-/-</sup>, Asc/Casp1/11<sup>-/-</sup>, Casp7<sup>-/-</sup>, Casp8/Rip3<sup>-/-</sup> e também em BMDMs WT tratados com o inibidor de pan-caspase Z-VAD (**Figura 11C**). Esses dados sugerem que pode haver uma redundância de proteases envolvidas nessa clivagem alternativa de GSDMD, ou uma protease ainda não identificada está envolvida nessa clivagem não canônico de GSDMD em resposta à infecção por *Leishmania*. Por fim, avaliamos o LDH em resposta à infecção por *Leishmania* como medida da lise da célula hospedeira e piroptose e não encontraram liberação de LDH em BMDMs infectados com *Leishmania* por 2 ou 24h (**Figura 11E**).

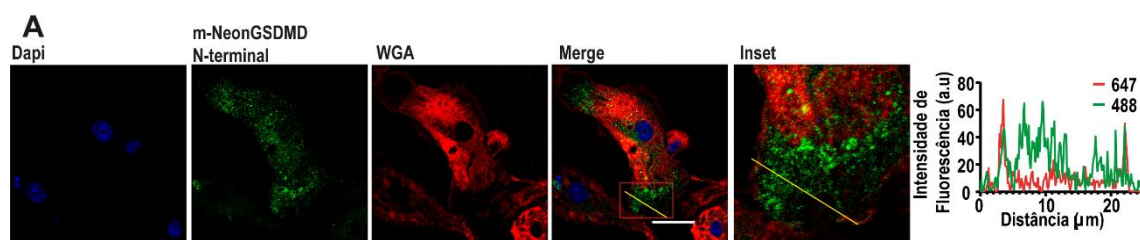
Foi descrito anteriormente que a maquinaria de reparo de membrana dependente de ESCRT é capaz de inibir a piroptose mesmo na presença de ativação de GSDMD (Jimenez *et al.*, 2014; Rühl *et al.*, 2018). Assim, para avaliar se a infecção por *Leishmania* é capaz de induzir à maquinaria ESCRT para inibir a piroptose, tratamos BMDMs com um quelante de cálcio BAPTA, que é conhecido por inibir a ativação de ESCRT (Rühl *et al.*, 2018). Caso essa hipótese estivesse correta, esperávamos que a inibição de ESCRT resultaria em um aumento da morte celular e liberação de LDH, mas isso não foi observado. Nenhum LDH foi detectado em macrófagos infectados com *Leishmania* na presença de BAPTA, enquanto BAPTA foi eficiente para aumentar a liberação de LDH em resposta à nigericina (**Figura 11F**). Esses resultados não suportam um papel da maquinaria ESCRT na inibição da morte celular lítica induzida por *Leishmania* e confirmam que a infecção por *Leishmania* inibe a piroptose apesar da ativação transitória de GSDMD nos macrófagos infectados.



**Figura 11.** A atividade de caspases é dispensável para clivagem GSDMD em resposta à infecção por *Leishmania* e ESCRT não está envolvido na inibição de piroptose em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs). (A-B) Lisados de BMDMs de C57BL/6 e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e infectados com *L. amazonensis* por 2 ou 24h foram avaliados quanto à clivagem de GSDMD por western blot usando anticorpo anti-GSDMD. Está representado o mesmo experimento revelado por quimioluminescência convencional (A) ou fluorescência near-infrared (B). (C) Lisados de BMDMs de C57BL/6 (WT), *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Asc/Casp1/11*<sup>-/-</sup>, WT tratado com Z-VAD, *Casp7*<sup>-/-</sup>, *Casp8*<sup>-/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> pré-tratados por 4h com PAM3cys (100 ng/mL) foram avaliados para clivagem de GSDMD por western blot usando anticorpo anti-GSDMD 2h após infecção com *L. amazonensis*. (D) A liberação de LDH foi avaliada 2h e 24h após Infecção por *Leishmania* ou 2h após tratamento com Nigericina. NI, não infectado, NT, não tratado. (E) BMDMs de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e BAPTA (3 μM) e infectado com *L. amazonensis* com um MOI 10 ou tratado com nigericina. A liberação de LDH foi avaliada 24h após a infecção com *Leishmania* e 2h após tratamento com Nigericina usando CytoTox 96 NonRadioactive Ensaio de Citotoxicidade. As barras de erro representam ± SD. #, P < 0,05 em comparação com células NI ou NT; \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste Two-way ANOVA. Mostra-se um experimento representativo de três experimentos independentes realizados.

### 7.2 *Leishmania* induz a formação de poros transientes dependente de GSDMD em macrófagos membranas.

Embora os níveis de LDH não tenham aumentado com a ativação de GSDMD em resposta à infecção por *Leishmania*, avaliamos se a GSDMD clivada estava localizada na membrana plasmática. Realizamos ensaios de imunofluorescência usando GSDMD-mNeon e coramos as membranas de macrófagos WGA. Um *Z-stack* foi realizado com fatias de 0,32 μm e uma única fatia localizada no meio da célula foi utilizada para avaliar a co-localização da GSDMD com a membrana plasmática 2h p.i. Encontramos GSDMD ativo difusamente distribuído pela da célula e também na membrana plasmática, o que foi confirmado pela análise de distribuição de intensidade de fluorescência (Figura 12).



**Figura 12. GSDMD colocaliza com a membrana plasmática.** Macrófagos primários derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram transduzidos com lentivírus que codifica GSDMD-mNeon e selecionados por 96h com G418. Imagens representativas de BMDMs expressando GSDMD mNeon (verde), pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e infectados com *L. amazonensis*; MOI 3. O núcleo das células foi marcado com Dapi (azul) e a membrana plasmática foi marcada com WGA (vermelho). As imagens mostram a co-localização da GSDMD N-terminal com a membrana plasmática e a linha amarela indica a análise de distribuição de intensidade de fluorescência no gráfico. As imagens foram adquiridas por microscopia multifotão usando uma objetiva de imersão em óleo de 63x e analisadas usando o software ImageJ. Barra de escala 20µm.

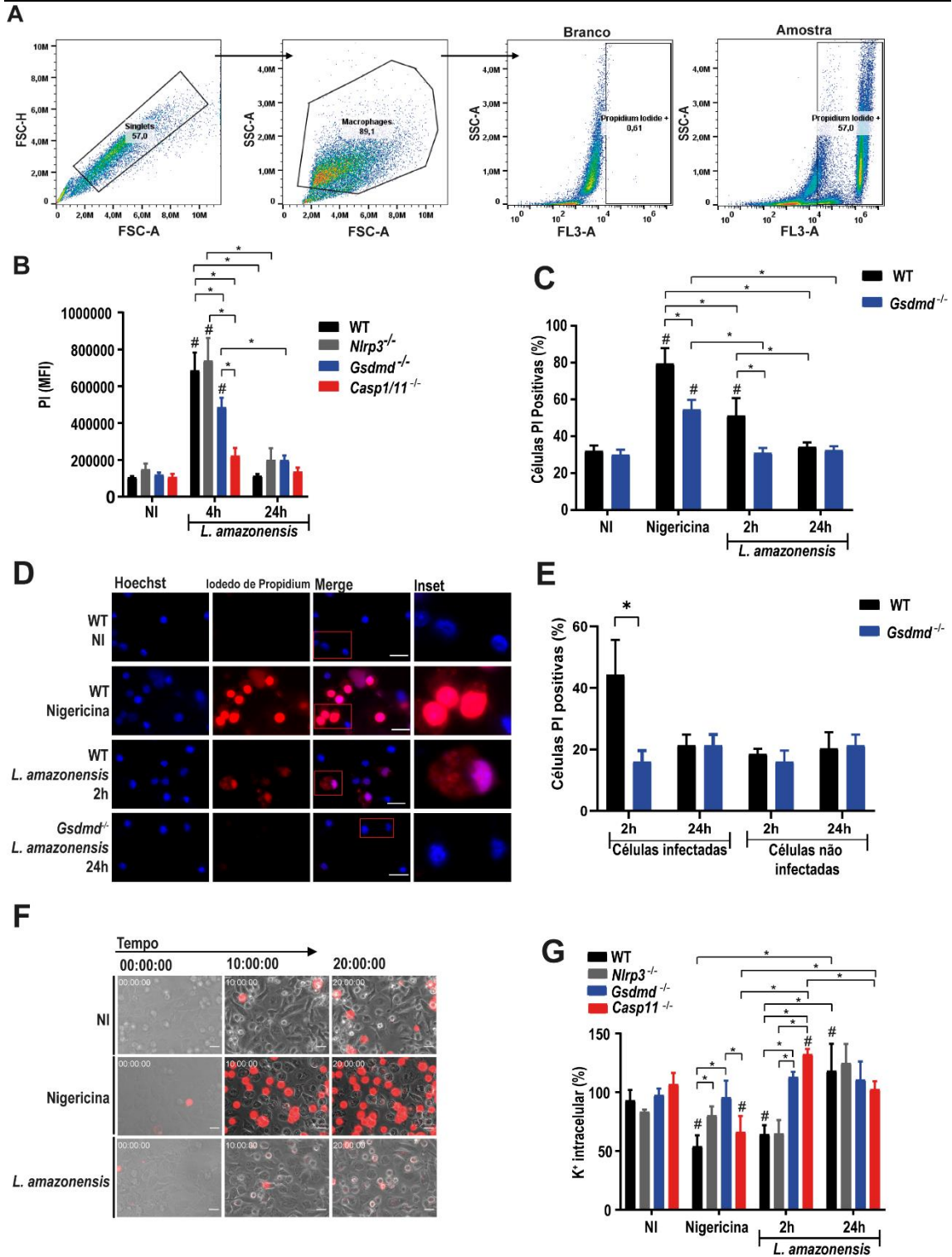
Para investigar se uma permeabilização celular transitória estava ocorrendo, infectamos BMDMs de camundongos do tipo selvagem (WT), *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> com *L. amazonensis* e medimos a absorção de iodeto de propídio (PI) por citômetro de fluxo (a estratégia de *gate* está representada na **Figura 13A**). Em macrófagos WT, nós observamos a incorporação de PI após 4h de infecção e essa permeabilização celular precoce foi dependente de *GSDMD* e *caspase-1/11* e independente de NLRP3, sugerindo que a clivagem de GSDMD ocorre *upstream* a ativação do inflamassoma de NLRP3 (**Figura 13B**).

Esses dados são consistentes com o papel previamente relatado de Caspase-11 na ativação não canônica do NLRP3 durante a infecção por *Leishmania* (Chaves *et al.*, 2019; De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019; De Carvalho *et al.*, 2021). Vale a pena ressaltar que a incorporação de PI 24h após a infecção é semelhante à observada em células não infectadas (NI), sugerindo uma permeabilização transitória das células (**Figura 13B**). Nós também avaliamos a formação de poros por microscopia marcando as células com PI conforme descrito previamente (Silveira and Zamboni, 2010). Os BMDMs foram corados com Hoechst e a incorporação de PI foi avaliada com um microscópio de fluorescência em BMDMs WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> infectados com *L. amazonensis* por 2h e 24h. Após 2h de infecção, observamos uma coloração de PI fraca em BMDMs WT, mas não em BMDMs *Gsdmd*<sup>-/-</sup>. No entanto, nenhuma incorporação de PI foi detectada após 24h de infecção (**Figura 13C-D**). A nigericina foi usada como controle positivo para ativação do inflamassoma e formação de poros. Curiosamente, apenas as células infectadas eram PI<sup>+</sup>

após 2h de infecção, sugerindo que a internalização da *Leishmania* nos macrófagos é necessária para a ativação do inflamassoma e a formação de poros transitória mediada por GSDMD (**Figura 13E**). Também realizamos esses experimentos usando promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e primados com PAM3Cys (pois o LPS pode ativar diretamente a Caspase-11) e obtivemos resultados semelhantes (**Figura 15A-C**)

Para descartar a possibilidade de que a falta de captação de PI após 24h tenha sido devido à morte celular nas primeiras horas de infecção, realizamos um vídeo de células vivas por 20h com células primadas com LPS sem infecção (NI), estimulados com LPS + nigericina ou primadas com LPS e infectados com *L. amazonensis*. Após 20h, uma coloração mais forte de PI foi observada nas células estimuladas com nigericina, quando em comparação com células infectadas com *L. amazonensis*. Nas células infectadas com *L. amazonensis*, não observamos morte celular significativa, quando comparados com culturas não infectadas. No entanto, detectamos uma coloração PI fraca nas células infectadas com *Leishmania* (**Figura 13F e Vídeos suplementares 1-3**), esses dados são consistentes com os observados por FACS e microscopia.

O desequilíbrio da homeostase das células ocorre quando os poros induzidos por GSDMD são formados, permitindo que íons, como potássio, escapem e sódio e água entrem, isso leva ao inchaço das células e ruptura da membrana plasmática (Kovacs and Miao, 2017). O efluxo de potássio é um importante ativador do inflamassoma NLRP3 e foi demonstrado anteriormente que é importante para a ativação do inflamassoma NLRP3 na infecção por *L. amazonensis*. Para avaliar se o efluxo de potássio é dependente de GSDMD, BMDMs de camundongos WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp11*<sup>-/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram infectados com *L. amazonensis* e o potássio intracelular foi corado com a sonda APG-2 2h e 24h após a infecção. Nas células WT, observamos um efluxo significativo de potássio logo após a infecção (2h p.i.), mas não após 24h de infecção (**Figura 13G**). Confirmando os dados de entrada de PI, o efluxo de potássio ocorreu em BMDMs WT e *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, mas não em BMDMs *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e *Casp11*<sup>-/-</sup>. Nossos resultados sugerem que a infecção por *L. amazonensis* desencadeia a ativação de GSDMD, levando a um poro transitório e efluxo de potássio, mas não leva à morte celular.



**Figura 13. GSDMD induz uma permeabilização transitória em macrófagos infectados por *Leishmania*.** (A) Estratégia de gating utilizada na citometria de fluxo para analisar a entrada de PI em células infectadas por *Leishmania*. (B) BMDMs de camundongos C57BL/6 (WT), *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> foram pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e deixados não infectados (NI) ou infectados com *L. amazonensis* com MOI 10 por 4h ou 24h, após esses tempos as células foram coradas com iodeto de propídio (PI), a fluorescência média das amostras foi determinada por citometria de fluxo. (C-E) BMDMs aderidos a lamínulas de vidro foram pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e infectados com *L. amazonensis* com MOI 10 por 2h ou 24h; as culturas foram processadas para ensaio de formação de poros por dupla coloração com PI



e Hoechst. Imagens representativas da formação de poros, BMDMs marcados com Hoechst (azul) e com PI (vermelho). As imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência com objetiva de imersão em óleo de 100x e analisadas usando o software ImageJ. Um total de 100 células em cada poço em triplicata foi analisado. Barra de escala 20µm. (F) Visualização de células vivas de BMDMs de camundongos WT pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e com PI no meio de cultura celular. As imagens foram capturadas a cada 10 minutos no microscópio BioStation IM-Q com uma objetiva de 40x e analisadas usando o software ImageJ. Barra de escala 20µm. (G) Avaliação dos níveis intracelulares de K<sup>+</sup>, medidos pela sonda de K<sup>+</sup> fluorescente APG-2. BMDMs foram pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e deixados não infectados (NI), tratados com nigericina (10µM) ou foram infectados por 2h e 24h com *L. amazonensis* (MOI 10). Cada barra representa a porcentagem da intensidade de fluorescência de APG-2 em relação à fluorescência média de células não infectadas. As barras de erro representam ± SD. #, P < 0,05 em comparação com células NI (não infectadas); \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado por Two-way ANOVA. É mostrado um experimento representativo de cinco experimentos independentes realizados.

### 7.3 GSDMD é importante para a formação de puncta de ASC e secreção de IL-1β em resposta à infecção por *Leishmania*.

Nossos dados indicam que NLRP3, mas não Caspase-11, é dispensável para o efluxo de K<sup>+</sup> mediado pela GSDMD, o que sugere que GSDMD está *upstream* da ativação de NLRP3. Para avaliar melhor essa hipótese, verificamos a formação de puncta de ASC que havia sido anteriormente demonstrado ocorrer em BMDMs em resposta à infecção por *L. amazonensis* (Lima-Junior *et al.*, 2013; De Carvalho, Lima-Junior, *et al.*, 2019; De Carvalho, Silva, *et al.*, 2019). Para testar o efeito de GSDMD na formação de puncta de ASC, infectamos BMDMs WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> com *L. amazonensis* e avaliamos a formação de puncta por imunofluorescência após 24h de infecção. Descobrimos que os puncta de ASC eram mais frequentes em BMDMs WT, quando comparado com *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (**Figura 14A-B**). Também avaliamos a secreção de IL-1β pós a infecção por *Leishmania*, uma vez que esse processo foi previamente demonstrado ser dependente no inflamassoma NLRP3 (Lima-Junior *et al.*, 2013; Gurung *et al.*, 2015; Charmoy *et al.*, 2016). Em seguida, testamos a formação de oligômeros de ASC por western blot. Descobrimos que após 2h de infecção a *Leishmania* induz a oligomerização de ASC e este processo é dependente de GSDMD (**Figura 14C**). Para determinar se a GSDMD é importante para a liberação de IL-1β, infectamos BMDMs WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> com *L. amazonensis* e medimos IL-1β no sobrenadantes de cultura por ELISA. Nossos dados mostram que a produção eficiente de IL-1β em resposta a *L. amazonensis* requer GSDMD, bem como NLRP3 e caspase-1/11 (**Figura 14D**). Este resultado é consistente com os dados descritos anteriormente, indicando um papel o não canônico da GSDMD na ativação de NLRP3 na infecção por *Leishmania* (Chaves *et al.*, 2019; De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019). Análise de Western Blot do sobrenadante e lisado de BMDMs WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> infectados com *L. amazonensis*

confirma o papel da GSDMD na maturação e secreção de IL-1 $\beta$  (Figura 14E). Juntos, esses resultados mostram que a GSDMD é importante para a oligomerização/puncta de ASC e liberação de IL-1 $\beta$  após infecção por *L. amazonensis*.

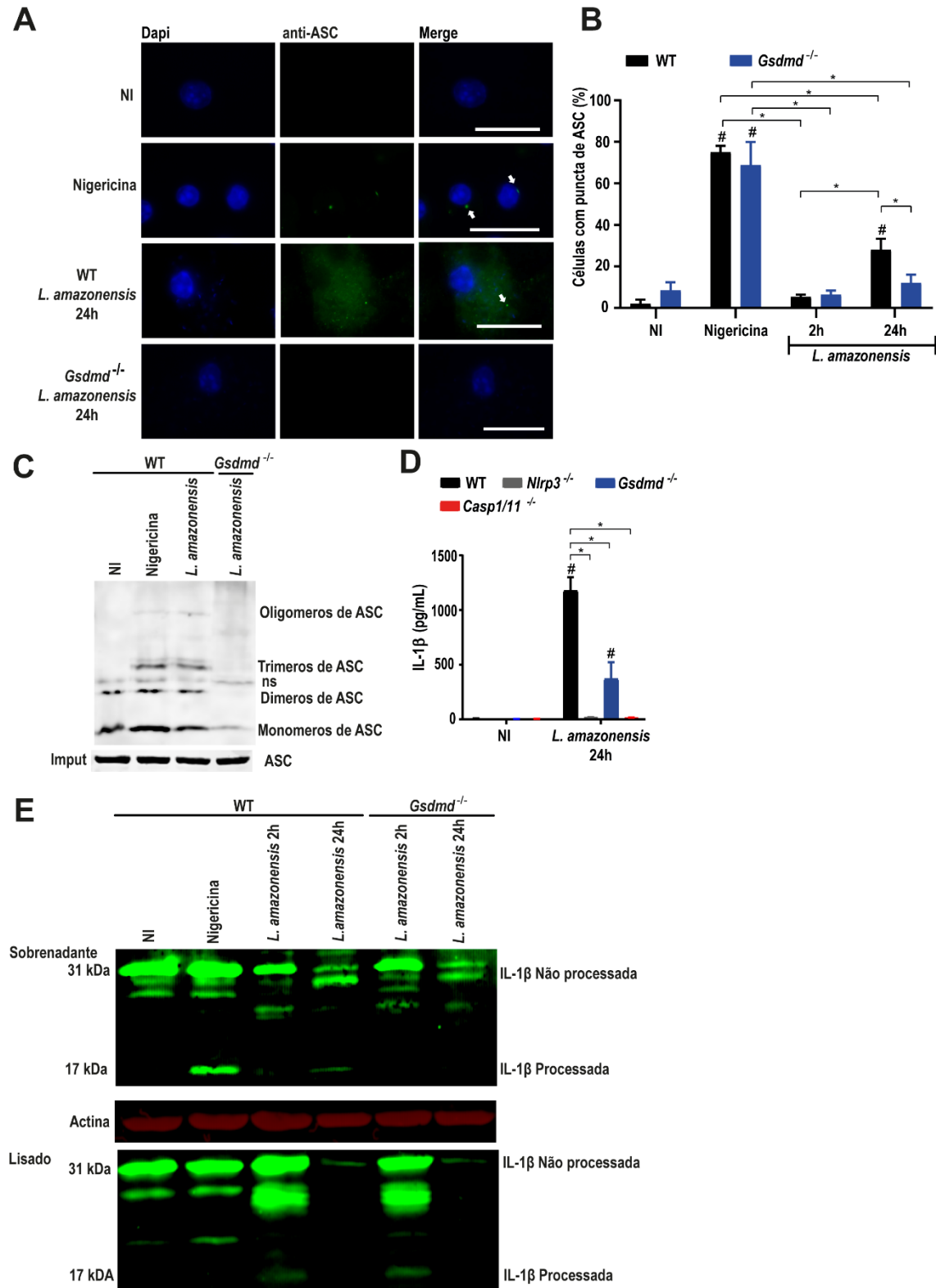
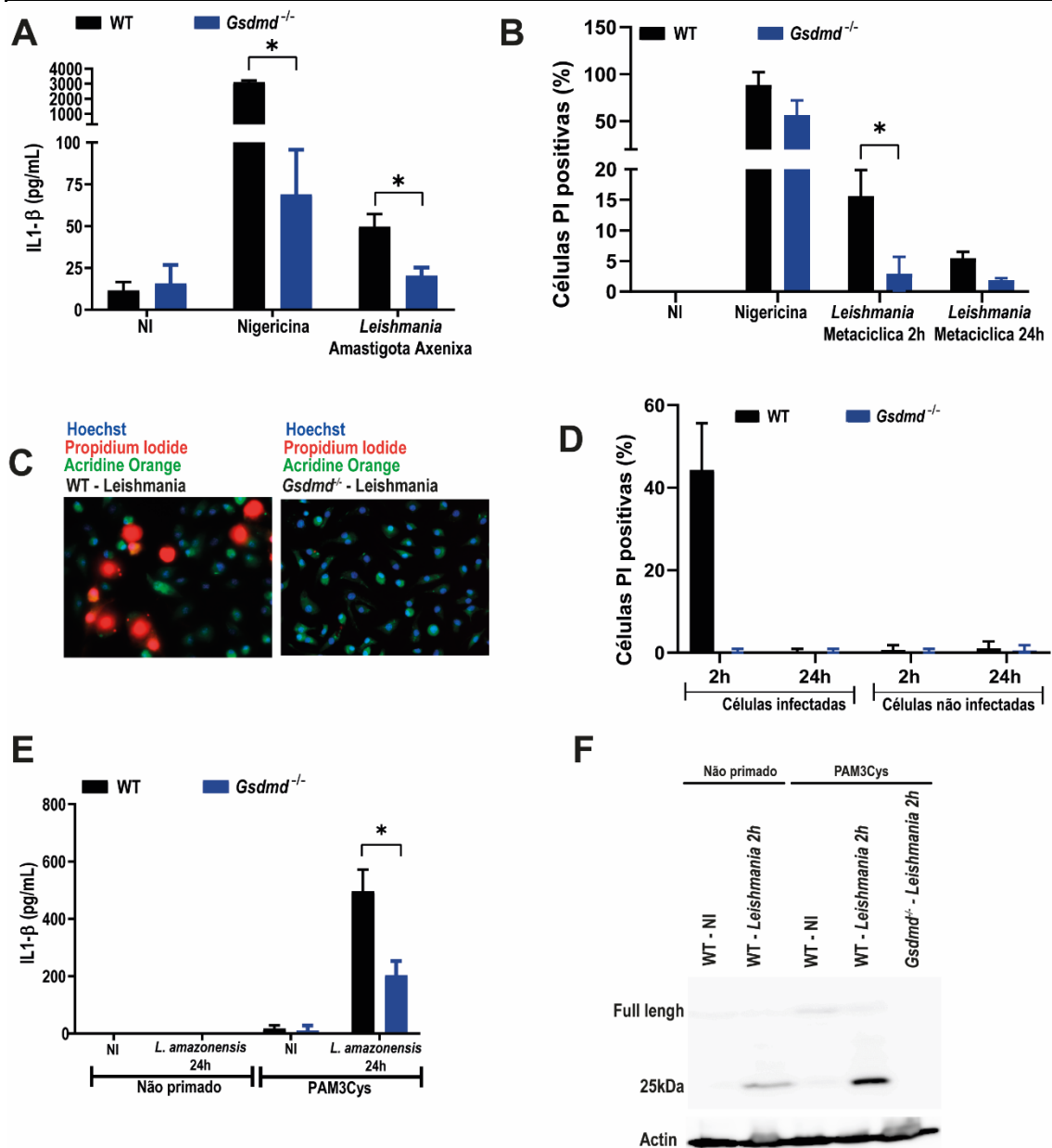


Figura 14. GSDMD é importante para a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com *Leishmania* (A-B) BMDMs de camundongos C57BL/6 (WT) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e infectados com *L. amazonensis* com MOI 10 por 2h

ou 24h. Os macrófagos foram, então, marcados com anti-ASC (verde, indicado por setas) e os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). **(A)** Imagens representativas da formação de puncta de ASC em resposta a Infecção por *L. amazonensis*. As imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência com 100x objetiva de imersão em óleo e analisadas usando o software ImageJ. Barra de escala 20µm. **(B)** Porcentagem de puncta de ASC em BMDMs infectados por *L. amazonensis* por 2 ou 24hs. Nigericina foi usada como controle positivo. Um total de 100 células em cada poço em triplicata foi analisado. **(C)** Lisados de macrófagos C57BL/6 (WT) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e infectados com *L. amazonensis* por 24h foram avaliados para oligomerização de ASC por western blot. Monômeros, dímeros, trímeros e oligômeros ASC estão indicados na figura. ns, banda não específica. **(D)** BMDMs de WT, *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> foram tratados com LPS (100 ng/mL) por 4h e infectados com *L. amazonensis* com um MOI de 10 por 24 h. A produção de IL-1β foi medida por ELISA. **(E)** Análises de Western Blot de lisado e sobrenadante de BMDMs WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e mantidos não infectados (NI) ou infectados por *Leishmania* com MOI 10 por 2h ou 24h. IL-1β não processada (31 kDa) e processados (17 kDa) está indicado na figura. As barras de erro representam ± SD. #, P < 0,05 comparado com células NI; \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado por Two-way ANOVA. É mostrado um experimento representativo de cinco experimentos independentes realizado.

Em seguida, nós avaliamos a ativação da GSDMD usando formas metacíclicas de *Leishmania* e primando com PAM3Cys, pois o LPS citoplasmático ativa a caspase-11 e desencadeia a ativação não canônica do inflamassoma NLRP3. Usando formas metacíclica amastigotas do parasita, que expressam significativamente menor LPG do que promastigotas e, conseqüentemente, induz menos ativação do inflamassoma em comparação com promastigotas (De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019), descobrimos que GSDMD também é importante para ativação do inflamassoma induzida por amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, medida por IL-1β (**Figura 15A**). Também observamos que a GSDMD é importante para ativação do inflamassoma em resposta a promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (**Figura 15B-D**). Por fim, testamos o efeito do *priming* para a clivagem não canônica da GSDMD induzida por *L. amazonensis*. Observamos que primer é necessário para a secreção de IL-1β (**Figura 15E**), embora o *priming* não seja necessário para a produção de fragmento de 25kDa de GSDMD, o pré-tratamento das células com PAM3Cys aumentou significativamente a clivagem de GSDMD (**Figura 15F**).

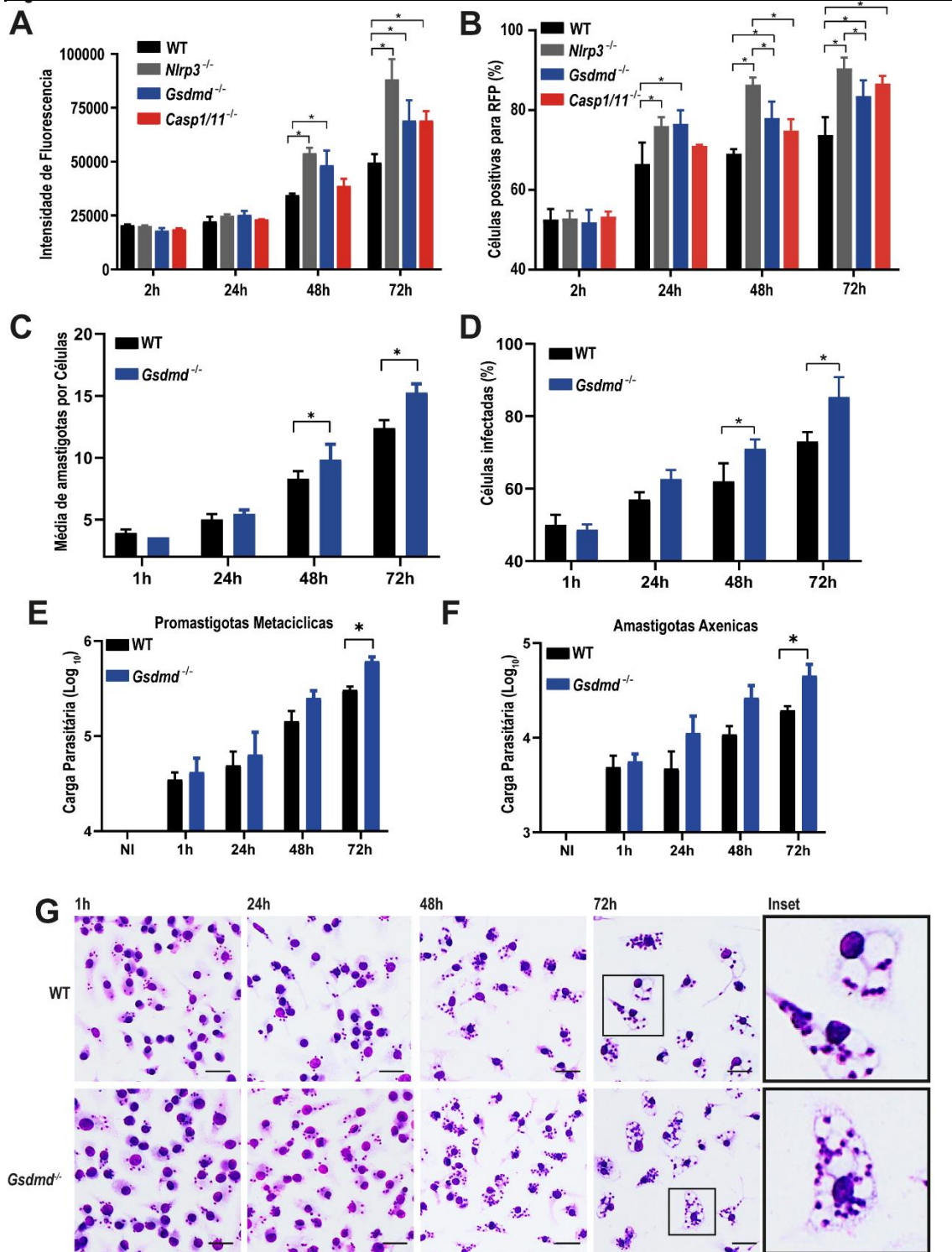


**Figura 15. Promastigotas metacíclicas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* induzem à formação de poros dependente de GSDMD em macrófagos, priming não é necessário para clivagem não canônica de GSDMD.** (A) BMDMs de camundongos C57BL/6 (WT) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram tratados com Pam3Cys (100 ng/mL) por 4h e infectados com formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* com MOI 1. A produção de IL-1 $\beta$  foi medida por ELISA. (B-D) BMDMs aderentes a lamínulas de vidro foram pré-tratados por 4h com Pam3Cys (100 ng/mL) e infectados com *L. amazonensis* metacíclica com um MOI 1 por 2h ou 24h; as culturas foram processadas para ensaio de formação de poros por coloração com iodeto de propídio (PI), Hoechst e Acridina Orange. (B) Porcentagem de BMDMs com incorporação de PI após 2 e 24hs de infecção com *L. amazonensis*. (C) Imagens representativas de células PI<sup>+</sup> (vermelho), núcleo marcado com Hoechst (azul), BMDMS marcado com Acridina Orange (verde). (D) Porcentagem de BMDMs com incorporação de PI em células infectadas e não infectadas. Um total de 100 células em cada poço em triplicata foi analisado. As imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência com óleo de imersão 100x e analisadas usando o software ImageJ. Barra de escala 20 $\mu$ m. Barras de erro representam  $\pm$  SD. #, P < 0,05 em comparação com células NI; \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado por Two-way ANOVA. É mostrado um experimento representativo de cinco experimentos independentes realizados. (E) BMDMs de camundongos C57BL/6 (WT) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram tratados ou não com Pam3Cys (100 ng/mL) por 4h e infectados com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* em um MOI de 10 por 24 h. A

produção de IL-1 $\beta$  foi medida por ELISA. (F) Lisados de BMDMs WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> pré-tratados ou não com Pam3Cys (100 ng/mL) por 4h, não infectado (NI) ou infectado por 2h com *L. amazonensis* (promastigotas de fase estacionária, MOI 10) foram avaliados quanto à clivagem de GSDMD por western blot usando anticorpo anti-GSDMD. GSDMD *full-length* (55 kDa) e clivada (25 kDa) estão indicados na figura.

#### 7.4 GSDMD contribui para o controle da infecção por *Leishmania* em macrófagos de camundongos.

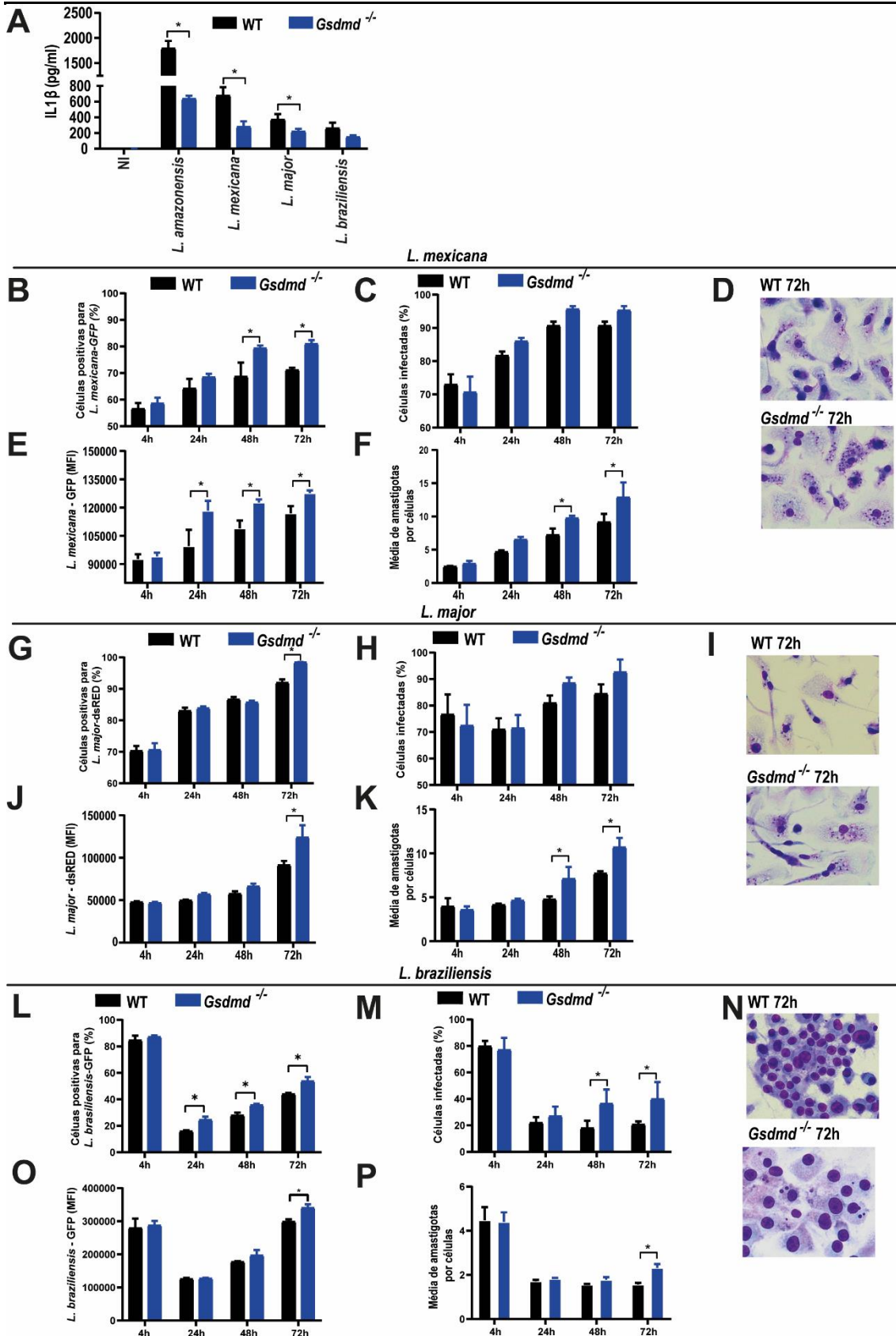
Para avaliar se GSDMD influencia na replicação da *Leishmania*, BMDMs WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* expressando RFP e a replicação do parasita foi medida por citometria de fluxo. A internalização dos parasitas após 2h de infecção não foi afetada pela deficiência de GSDMD, NLRP3 ou Caspase-1/11, mas os macrófagos deficientes para qualquer um desses genes foram mais suscetíveis à replicação intracelular do parasita como observado após 48h e 72h de infecção (**Figura 16A, B**). Para confirmar esses dados, também infectamos BMDMs WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> com formas metacíclicas de *L. amazonensis* e a carga parasitária foi avaliada por Giemsa. Os BMDMs *Gsdmd*<sup>-/-</sup> possuíam uma carga parasitária maior quando comparando com os BMDMs WT (**Figura 16C**). Os macrófagos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> também apresentavam suscetibilidade aumentada quando avaliadas a porcentagem de células infectadas nos tempos de 48 e 72h (**Figura 16D**). Podemos observar que após uma hora de infecção, a internalização dos parasitas foi semelhante para ambos os grupos (**Figura 16D**). Também medimos a carga parasitária nas culturas usando qPCR e também encontramos um aumento do número de parasitas em BMDMs de *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (**Figura 16E**). Isso foi observado tanto em infecções com promastigotas metacíclicas e amastigotas axênicos (**Figura 16E, F**). Imagens representativas dos experimentos de Giemsa, mostrando BMDMs infectados com formas metacíclica de *Leishmania amazonensis* para 1, 24, 48 e 72h após a infecção são mostrados na **Figura 16**.



**Figura 16. GSDMD é responsável pela restrição da infecção por *L. amazonensis* em BMDMs.** (A-B) Análise de citometria de fluxo de BMDMs C57BL/6 (WT), *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> infectados com fase estacionária de *L. amazonensis* expressando constitutivamente RFP. As células foram infectadas com um MOI 5 por 2h, lavadas e incubadas por 24, 48 e 72h. (A) A média de fluorescência do RFP. (B) A porcentagem de BMDMs positivos para RFP. (C-E) Coloração de Giemsa de BMDMs C57BL/6 (WT) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* com um MOI 5. As culturas foram infectadas por 1h, lavadas e incubadas por 24, 48 e 72h. (C) O número médio de amastigotas por células. (D) A porcentagem de BMDMs infectados. Foi analisado um total de 100 células em cada poço em triplicado. (E-F) Quantificação dos parasitas por PCR em tempo real em BMDMs C57BL/6 (WT) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> infectados com promastigotas metacíclicas (E) e amastigotas axênicos (F). (G) Imagens

representativas de culturas coradas com Giemsa mostrando amastigotas intracelulares em BMDMs, barra de escala 50µm. As barras de erro representam ± SD. \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado por two-way ANOVA. É mostrado um experimento representativo de cinco experimentos independentes realizados.

Em seguida, investigamos se a ativação do inflamassoma mediado por GSDMD e se a restrição da replicação de *L. amazonensis* também ocorre para outras espécies de *Leishmania*. Para testar isso BMDMs WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram infectados com *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. major* e *L. braziliensis* por 24h e os níveis de IL-1β foram medidos no sobrenadantes da cultura para avaliar a ativação do inflamassoma. Nossos dados mostram que a GSDMD é necessária para a secreção eficiente de IL-1β em resposta a todas as espécies testadas, indicando que a ativação do inflamassoma mediado por GSDMD é um mecanismo geral operado em resposta à infecção por *Leishmania* spp. (**Figura 17A**). Para testar se o GSDMD foi importante para restringir a replicação intracelular das diferentes espécies de *Leishmania*, infectamos BMDMs de camundongos WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> com promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* expressando RFP, *L. mexicana* expressando GFP, *L. major* expressando dsRED e *L. braziliensis* expressando GFP e avaliamos a replicação parasitária por citometria de fluxo. A internalização dos parasitas após 4h de infecção não foi afetada pela deficiência de GSDMD, mas esses BMDMs foram mais suscetíveis à replicação intracelular do parasita como observado após 48h e 72h de infecção (**Figura 17B, E, G, J, L, O**). A avaliação das cargas parasitárias intracelulares também indica um papel importante do GSDMD para a restrição de replicação intracelular de diferentes espécies de *Leishmania* em macrófagos. Isso ficou evidente tanto medindo cargas de parasitas por FACS (**Figura 17C, F, H, K, M, O**) e por Giemsa (**Figura 17D, I, J**).



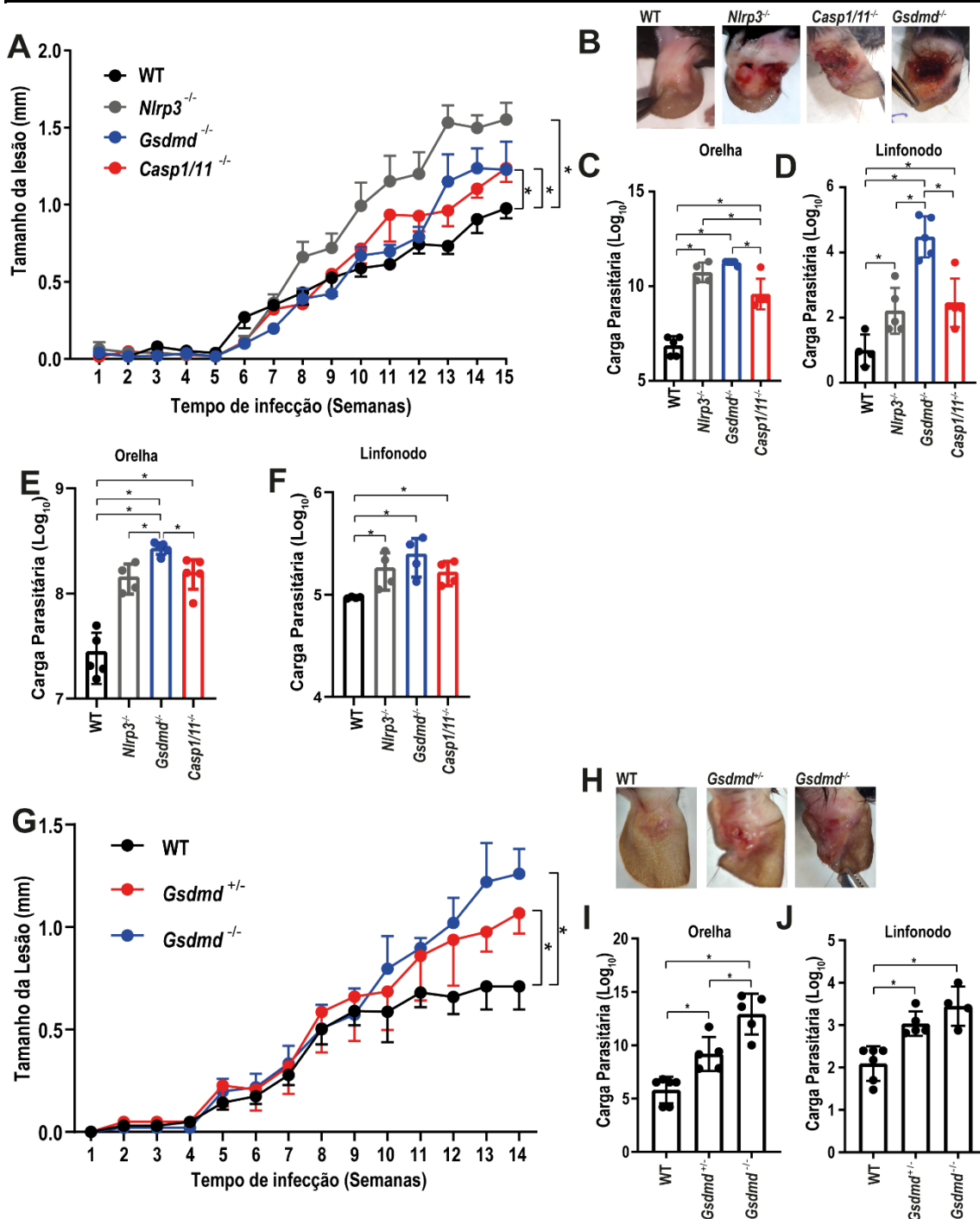
**Figura 17. A GSDMD é importante para a restrição de *Leishmania spp.* em macrófagos. (A)** BMDMs de C57BL/6 (WT) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram pré-tratados por 4h com LPS (100 ng/mL) e infectados com parasitas na fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. major* e *L. braziliensis* com MOI 10 por 24h. A IL-1 $\beta$  liberada no sobrenadante da cultura dos BMDMs foi dosada por ELISA. **(B-O)** BMDMs de camundongos WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> foram infectados com parasitas na fase estacionária com um MOI 5 por 2h, lavado e incubado por 4, 24, 48 e 72h. Os



parasitas utilizados foram: *L. mexicana* expressando constitutivamente GFP (**B-F**), *L. major* expressando constitutivamente dsRED (**G-K**), *L. braziliensis* expressando constitutivamente GFP (**L-P**). (**B, G, L**) A porcentagem de células infectadas foi estimada por citometria de fluxo. (**E, J, O**) A média de fluorescência de parasitas intracelulares foi estimada por citometria de fluxo. (**C, H, M**) A porcentagem de células infectadas foi quantificada em 100 células coradas por Giemsa. (**F, K, P**) O número médio de amastigotas por célula foram quantificados em 100 células coradas por Giemsa. Um total de 100 células em cada poço da triplicata foi analisado. (**D, I, N**) Imagens representativas da coloração por Giemsa mostrando amastigotas intracelulares. As barras de erro representam  $\pm$  SD. \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado por two-way ANOVA. Está representado um experimento representativo de três experimentos independentes realizados.

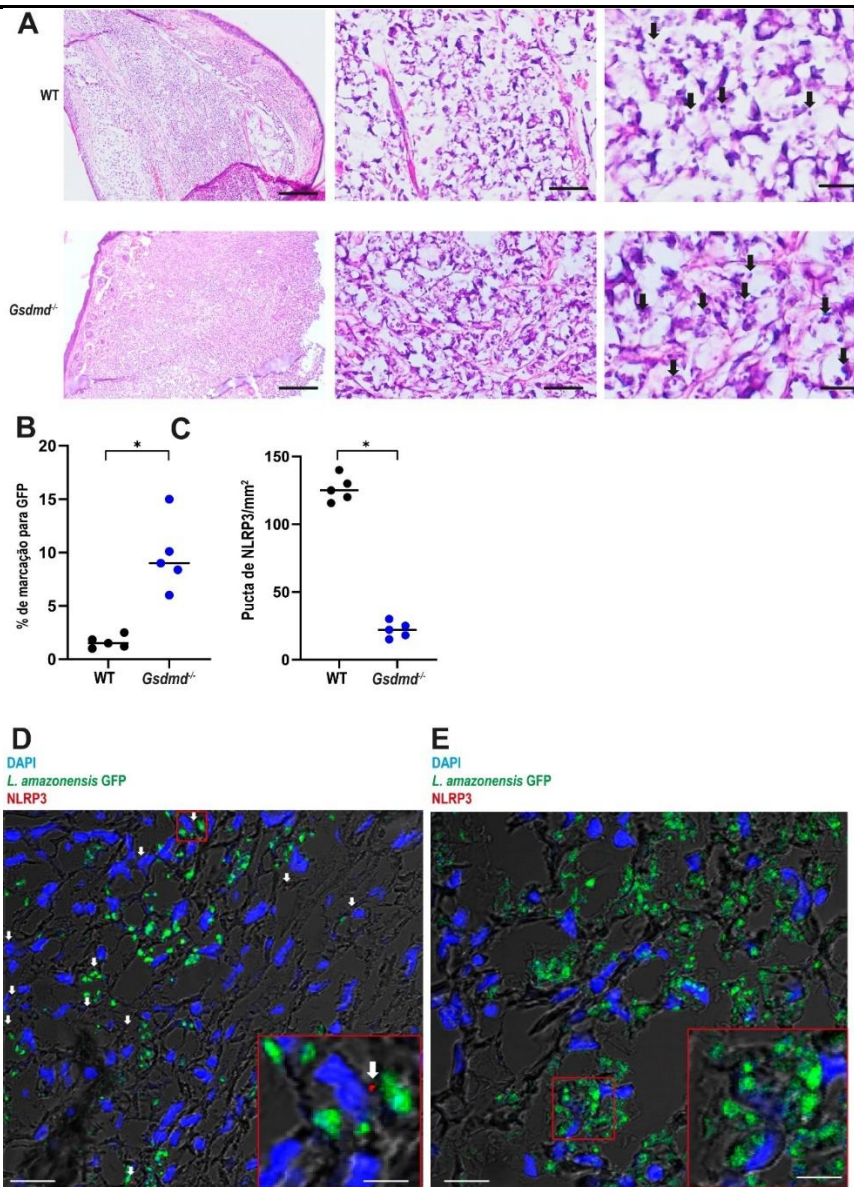
### 7.5 *GSDMD* contribui para a restrição da infecção por *Leishmania* e ativação do inflamassoma ativação *in vivo*.

Para avaliar a relevância fisiológica do *GSDMD* *in vivo*, realizamos infecções na orelha de camundongos conforme descrito anteriormente (Lima-Junior *et al.*, 2013). Inicialmente usamos camundongos WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup>, que foram infectados na orelha com 10<sup>3</sup> formas metacíclicas de *L. amazonensis* e o tamanho das lesões foram medidos durante 15 semanas. Encontramos um aumento significativo do tamanho da lesão e necrose da pele nas orelhas de camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> (**Figura 18A, B**). Os camundongos foram eutanasiados na 15<sup>a</sup> semana e as cargas parasitárias foram medidas nas orelhas e linfonodos drenantes. 15 semanas após a infecção, detectamos um aumento das cargas parasitárias nas orelhas dos camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> em comparação com camundongos WT (**Figura 18C, D**). Também quantificamos as cargas parasitárias nas orelhas de camundongos por PCR em tempo real. Confirmamos um aumento das cargas parasitárias nas orelhas dos camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> em comparação com camundongos WT (**Figura 18E, F**). Também realizamos experimentos usando camundongos controles da mesma ninhada e encontraram um aumento no tamanho da lesão e nas cargas parasitárias nas orelhas e nos linfonodos de camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> em comparação com *Gsdmd*<sup>+/-</sup> e camundongos WT (**Figura 18G-J**).



**Figura 18.** A GSDMD é importante para a restrição da infecção por *L. amazonensis* *in vivo*. Camundongos C57BL/6 (WT), *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp1/11*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>+/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (n = 5 camundongos por grupo) foram infectados com 10<sup>3</sup> promastigotas metacíclica de *L. amazonensis* na orelha, e as espessuras das orelhas foram acompanhadas por 14 ou 15 semanas. Tamanho da lesão da orelha dos camundongos WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> (A), imagens das orelhas infectadas (B), análise por diluição limitante da carga parasitária na orelha infectada (C) e linfonodo de drenagem (D) na 15<sup>a</sup> semana de infecção. (E-F) Quantificação dos parasitas por PCR em tempo real na orelha dos camundongos C57BL/6 (WT), *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e *Casp1/11*<sup>-/-</sup> infectados por 15 semanas. Carga parasitária da orelha infectado (E) e linfonodo drenante (F). Tamanho da lesão nos camundongos WT, *Gsdmd*<sup>+/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (G), imagens representativas das orelhas infectadas (H) e análise da carga parasitária por diluição limitante da orelha infectada (I) e linfonodo drenante (J) na 14<sup>a</sup> semana de infecção. As barras de erro representam  $\pm$  SD. \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado por two-way ANOVA. É mostrado um experimento representativo de cinco experimentos independentes realizados.

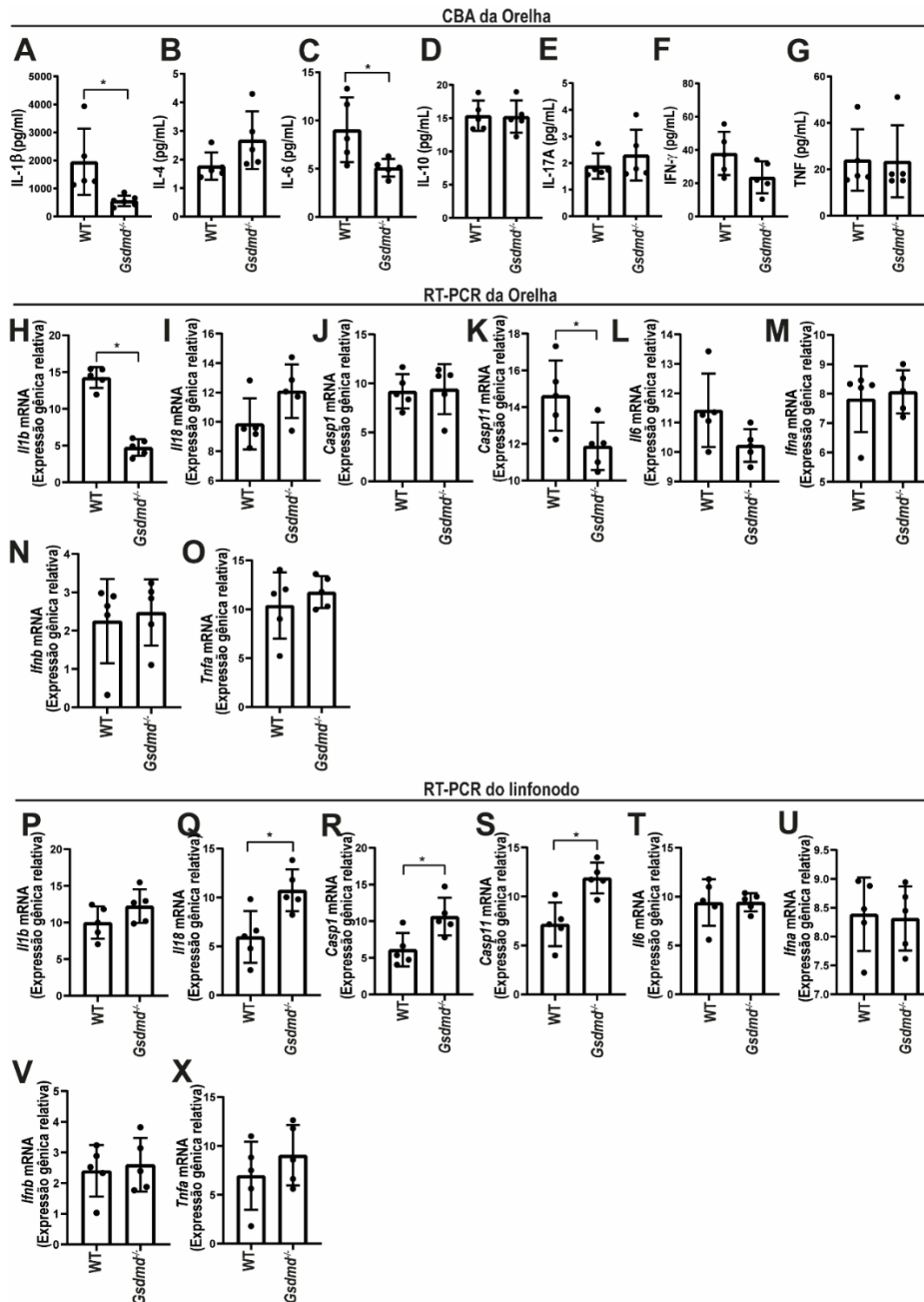
A maior suscetibilidade dos camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> à infecção por *L. amazonensis* nos levou a avaliar melhor as cargas parasitárias e ativação do inflamassoma nos tecidos de camundongos infectados. Inicialmente, realizamos a coloração H&E de cortes histológicos das orelhas de camundongos infectados com *L. amazonensis* expressando GFP por 15 semanas e observamos um maior número de parasitas no *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (**Figura 19A**). Avaliamos a ativação do inflamassoma por imunofluorescência na orelha dos camundongos infectados, fizemos marcação para NLRP3 afim de avaliar a formação de puncta (indicando ativação do inflamassoma) nos tecidos infectados. Encontramos uma redução significativa na ativação do inflamassoma nas orelhas de camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (**Figura 19B**). Também avaliamos a quantificação do GFP nos cortes de tecidos, para avaliar a carga parasitária. Encontramos uma maior carga de parasitas nas orelhas de camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (**Figura 19C**), consistente com os dados gerado por diluição limitante e PCR em tempo real (**Figura 18**). Imagens representativas de tecidos infectados com inflamassomas ativos e amastigotas de *Leishmania* (**Figura 19D-E**). Esses dados confirmam o aumento da suscetibilidade de camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e destacam o importante papel da GSDMD na ativação do inflamassoma. Importante, esses dados mostram pela primeira vez a ativação do inflamassoma em tecidos de camundongos *in vivo*.



**Figura 19. GSDMD é importante para a restrição da infecção por *L. amazonensis* e ativação do inflamassoma de NLRP3 *in vivo*.** Camundongos C57BL/6 (WT) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (n = 5 camundongos por grupo) foram infectados com 10<sup>6</sup> promastigotas na fase estacionária de *L. amazonensis* expressando GFP. (A) Imagem representativa de H&E da orelha infectada, amastigotas estão indicados (setas). Barras de escala, 500, 50 e 20 µm (da esquerda para a direita). (B-E) Microscopia multi-foton da orelha infectada marcada com anti-NLRP3 para quantificação de puncta de NLRP3 (B) e porcentagem de área GFP (C). Imagens representativas da orelha de camundongos WT (D) e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (E) mostrando puncta NLRP3 (em vermelho, indicado por setas brancas). Leishmania expressando GFP são mostrados em verde e DAPI cora os núcleos das células (azul). Barra de escala 40 µm. Inserções indicam uma ampliação maior de uma região indicada (retângulo vermelho, barra de escala 20µm). Cada ponto na figura representa o valor obtido de cada camundongo. \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste T de Student.

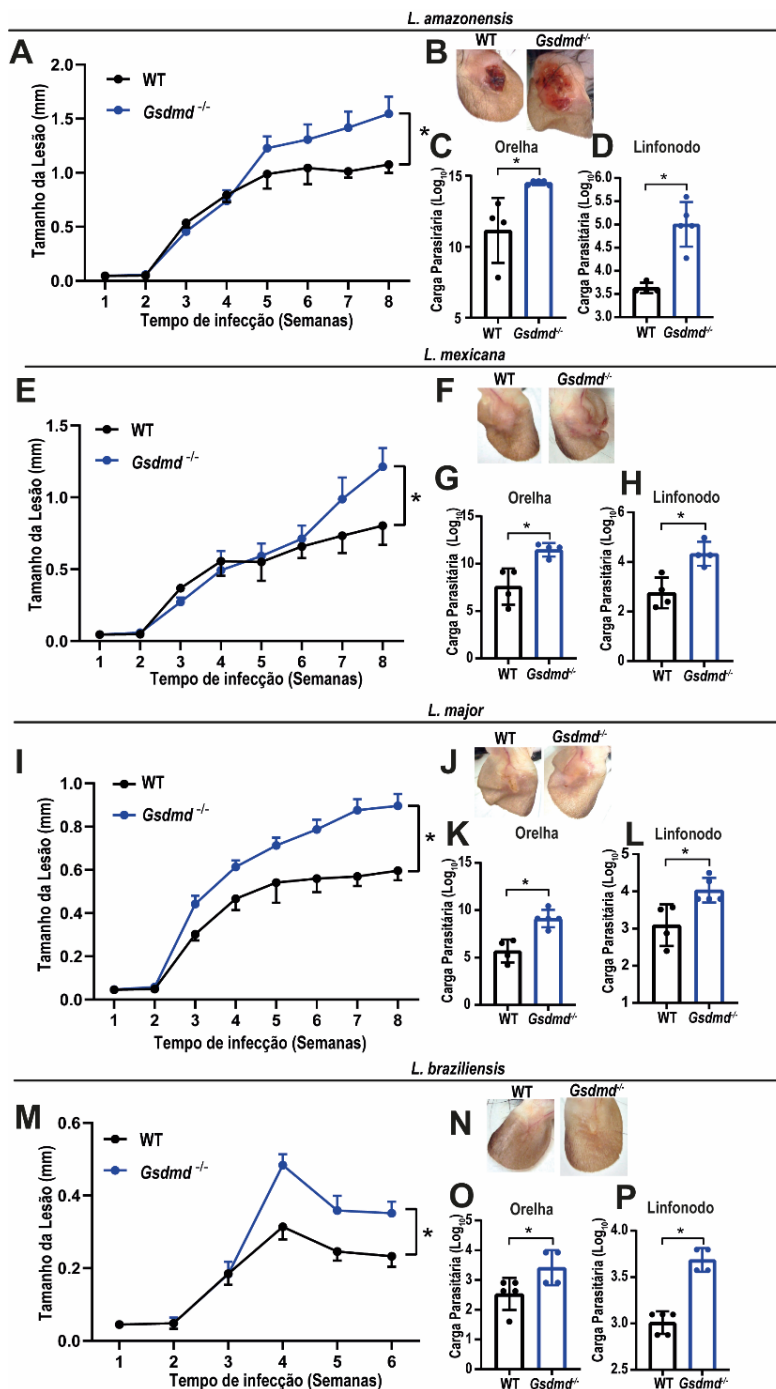
A fim de obter informações sobre o perfil de resposta imune que pode conferir maior suscetibilidade à infecção por *Leishmania in vivo* nos camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, medimos citocinas inflamatórias por ELISA ou CBA (Figura 20A-G) e qPCR (Figura 20H-X) na orelha e linfonodo de camundongo infectado por via intradérmica no ouvido

com  $10^3$  parasitas metacíclica, 15 semanas após a infecção. Exceto para as dosagens de IL-1 $\beta$ , que foi reduzida em *Gsdmd*<sup>-/-</sup>, não detectamos diferenças que suportam um papel fundamental das citocinas no aumento da suscetibilidade de camundongos deficientes em GSDMD.



**Figura 20. Expressão de citocinas inflamatórias na orelha e linfonodo drenante dos camundongos WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> infectados com *L. amazonensis*.** (A-G) Níveis de citocinas (quantificadas por CBA) nas orelhas de camundongos infectados com  $10^3$  formas metacíclicas de *L. amazonensis* por 15 semanas. As citocinas selecionadas foram IL-1 $\beta$  (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-17A (E), IFN $\gamma$  (F) e TNF $\alpha$  (G). Expressão gênica de citocinas na orelha e linfonodo drenante de camundongos WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> infectados com  $10^3$  formas metacíclicas de *L. amazonensis* por 15 semanas. Os genes selecionados foram *Il1b* (H, P), *Il18* (I, Q), *Casp1* (J, R), *Casp11* (K, S), *Il6* (L, T), *Ifna* (M, U), *Ifnb* (N, V), *Tnfa* (O, X).

Em seguida, avaliamos o papel da GSDMD na resistência do hospedeiro a outras espécies de *Leishmania in vivo*. Nesses experimentos, camundongos foram infectados por via intradérmica na orelha com  $10^6$  promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. major* e *L. braziliensis*, e as lesões foram medidas até 8 semanas após a infecção (6 semanas foram usados para *L. braziliensis* porque camundongos no fundo genético C57BL/6 são muito resistentes a esta espécie). Nossos resultados mostram um aumento significativo no tamanho da lesão e carga parasitária nas orelhas e linfonodos drenantes em camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> em comparação a camundongos WT (**Figura 21**), indicando um papel importante da GSDMD na resposta do hospedeiro contra diferentes espécies de *Leishmania*.



**Figura 21. A GSDMD é importante para a restrição de *Leishmania spp. in vivo.*** Camundongos WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (n = 5 camundongos por grupo) foram infectados com 10<sup>6</sup> parasitas em fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. braziliensis* na orelha, a espessura das orelhas foram seguidas durante 8 ou 6 semanas. Tamanho da lesão nos camundongos WT e *Gsdmd*<sup>-/-</sup> (A, E, I, M). Imagens representativas das orelhas infectadas (B, F, J, N) e análise de diluição limitante da carga parasitária nas orelhas infectadas (C, G, K, O) e linfonodos drenantes (D, H, L, P) com 8 ou 6 semanas de infecção. As barras de erro representam  $\pm$  SD. #, P < 0,05 em comparação com camundongos WT; \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste Two-way ANOVA. Está representado um experimento representativo de dois experimentos independentes realizados.

### 7.6 Os inflamassomas e a GSDMD são ativados na pele de pacientes com Leishmaniose.

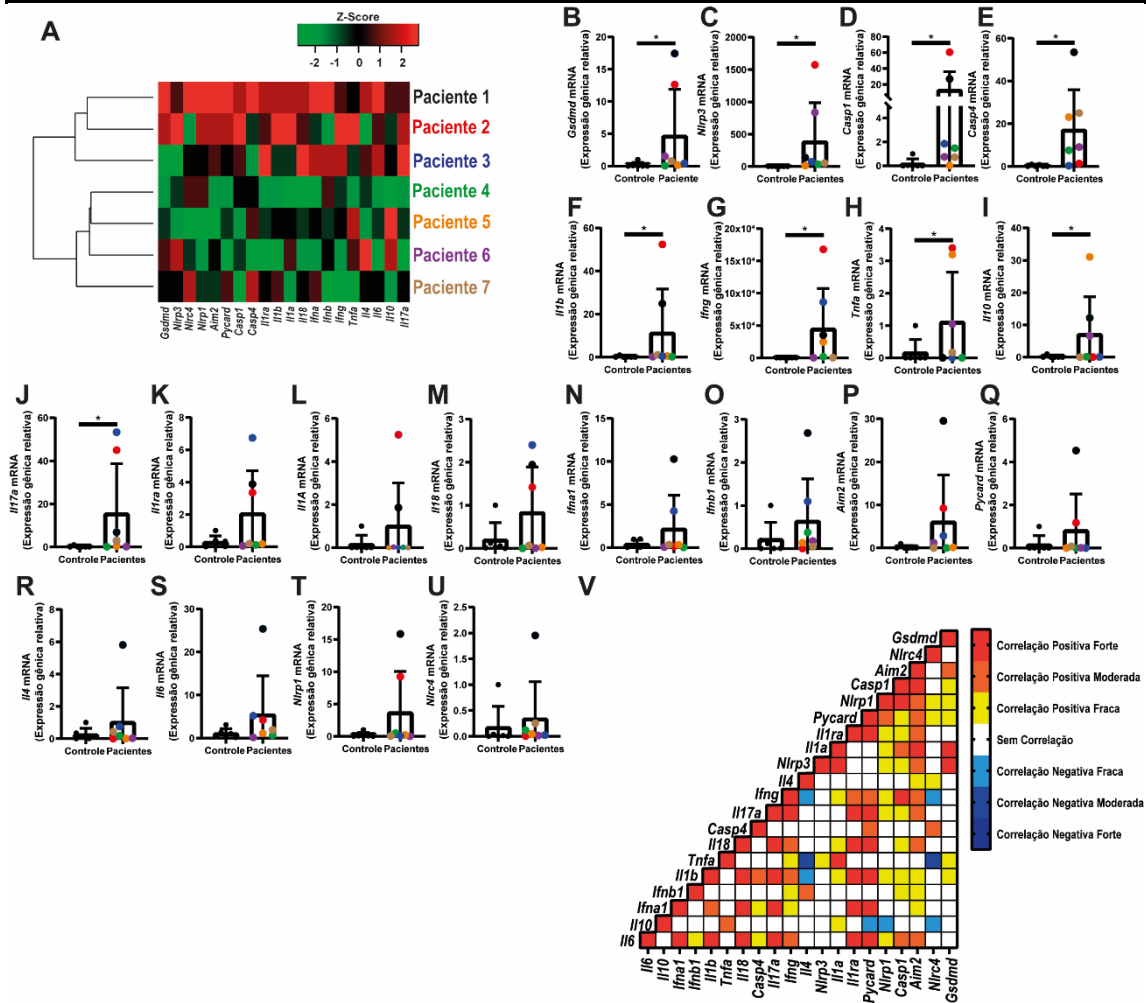
A seguir, avaliamos a ativação da GSDMD na pele de pacientes com Leishmaniose tegumentar. Primeiro, avaliamos a expressão gênica em biópsias de pele de 7 pacientes infectados com *Leishmania braziliensis* e comparamos com 5 pacientes submetidos à mastectomia redutora (grupo controle). A caracterização demográfica dos pacientes está contida na **Tabela 1**.

A expressão de genes do inflamassoma e de citocinas inflamatórias na pele dos pacientes foi heterogênea (**Figura 22A**), mas nossos dados demonstraram um aumento geral da expressão de genes relacionados ao inflamassoma, como *Gsdmd*, *Nlrp3*, *Casp1*, *Casp4*, *Il1b*, *Ifng*, *Tnfa*, *Il10* e *Il17a* (Fig. 6B-J) quando comparamos pacientes com *Leishmaniose* com o grupo controle. Não detectamos diferenças estatisticamente significativas na expressão de *Il1ra*, *Il1a*, *Il18*, *Ifna1*, *Ifnb1*, *Aim2*, *Pycard*, *Il4*, *Il6*, *Nlrp1*, *Nlrc4* (**Figura 22K-U**). A matriz de correlação indicou que a expressão de GSDMD se correlaciona positivamente com os genes do inflamassoma e de citocinas inflamatórias incluindo *Il1b*, *Tnfa*, *Nlrp3*, *Il1a*, *Pycard*, *Nlrp1*, *Casp1* e *Aim2* (**Figura 22V**).

**Tabela 1.** Características dos pacientes com leishmaniose

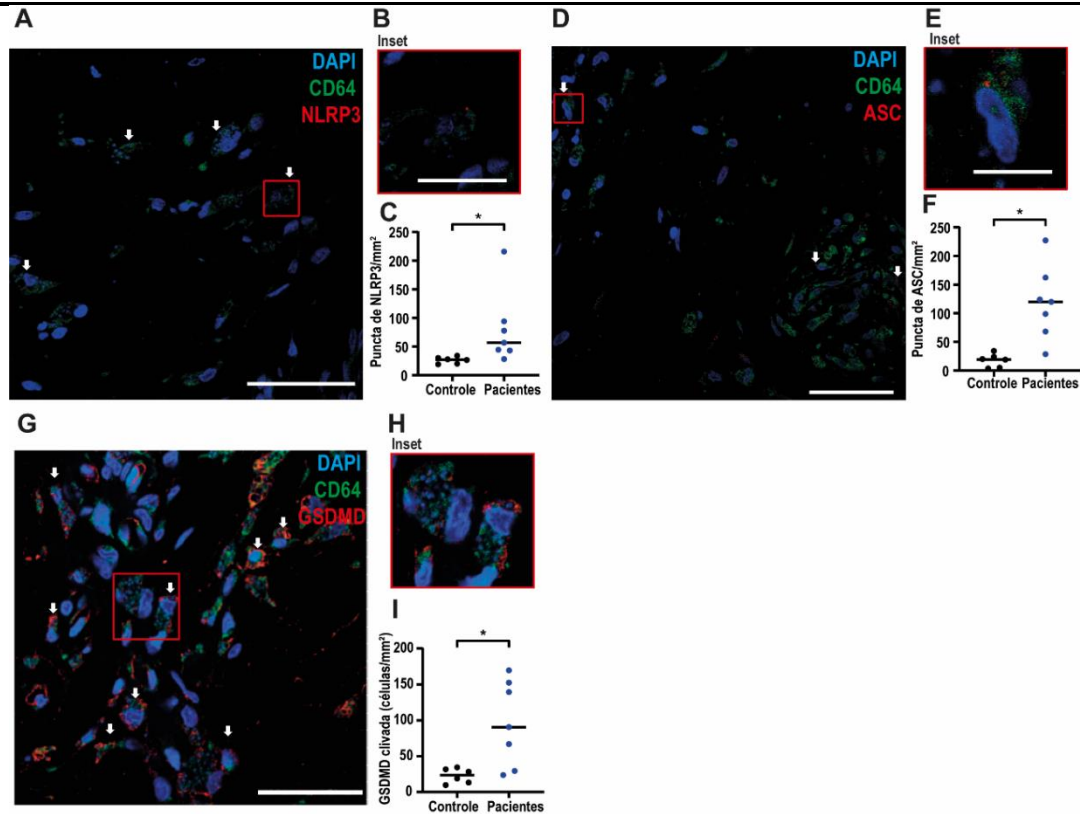
<b>Características Demográficas</b>	<b>Pacientes com Leishmaniose</b> Média ( $\pm$ SD) ou n(%)
N	7
Idade (anos)	52.75 ( $\pm$ 12.45)
Gênero	
Masculino	6 (85.71%)
Feminino	1 (14.28%)
Espécie <i>L. brasiliensis</i>	7 (100.00%)
<b>Tratamento</b>	
Glucantine	4 (57.14%)
Pentamidina	1 (14.28%)
Amphotericin B Lipossomal + Glucantine	1 (14.28%)
Miltefosine + Amphotericin B Convencional + Glucantine	1 (14.28%)
<b>Achados Laboratoriais</b>	
Teste de Montenegro	
Positivo	2 (28.57%)
Negativo	2 (28.57%)
Não realizado	3 (42.85%)
HIV positivo	1 (14.28%)
HIV negativo	6 (85.71%)
Hemoglobina (g/dL)	13.05 ( $\pm$ 2.56)
Glóbulos Brancos ( $10^3/\mu$ l)	5.76 ( $\pm$ 2.57)
Neutrófilos (%)	49.35 ( $\pm$ 7.97)
Linfócitos (%)	37.73 ( $\pm$ 6.96)
Monócitos (%)	7.58 ( $\pm$ 1.84)
ALT (IU/L)	32.51 ( $\pm$ 17.42)
AST (IU/L)	34.16 ( $\pm$ 9.71)
Fosfatase Alcalina (U/L)	232.09 ( $\pm$ 126.18)
Colesterol (mg/dL)	170.23 ( $\pm$ 43.96)
Glicemia (mg/dL)	122.46 ( $\pm$ 34.64)
Creatinina (mg/dL)	1.04 ( $\pm$ 0.32)
Ureia (mg/dL)	26.88 ( $\pm$ 17.43)
<b>Achados Histopatológicos</b>	
Tamanho da Lesão (cm)	6 ( $\pm$ 2.94)
Infiltrado Inflamatório	7 (100.00%)
Acantose	5 (71.42%)
Hiperqueratose Compacta	2 (28.57%)
Espongiose	2 (28.57%)
Epiderme ulcerada	4 (57.14%)
Amastigotas	5 (71.42%)





**Figura 22. Expressão de genes do inflamassoma e citocinas inflamatórias em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea.** (A) *Heatmap* da expressão do mRNA de genes do inflamassoma e citocinas inflamatórias em biópsias de pele de 7 pacientes com leishmaniose cutânea. (B-U) Expressão gênica em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea e pele de pacientes saudáveis submetidos à mastectomia redutiva (Controle). Os genes selecionados foram *Gsdmd* (B), *Nlrp3* (C), *Casp1* (D), *Casp4* (E), *Il1b* (F), *Ifng* (G), *Tnfa* (H), *Il10* (I), *Il17a* (J), *Il1ra* (K), *Il1a* (L), *Il18* (M), *Ifna1* (N), *Ifnb1* (O), *Aim2* (P), *Pycard* (Q), *Il4* (R), *Il6* (S), *Nlrp1* (T), *Nlr4* (U). Matriz de correlação da expressão gênica dos genes do inflamassoma em biópsias de lesões de pele de pacientes com leishmaniose cutânea (V).

Para avaliar a ativação do inflamassoma em biópsias de pele dos pacientes com Leishmaniose, marcamos por imunofluorescência as biópsias de pele dos pacientes com anti-ASC, anti-NLRP3 e anti-GSDMD clivado (N-terminal). Detectamos uma robusta ativação do inflamassoma pela formação de puncta de NLRP3 (Figura 23A-C), puncta de ASC (Figura 23D-F) e a presença de N-terminal GSDMD em células CD64+ (Figura 23F). Esses dados demonstram inequivocamente que inflamassoma e GSDMD são ativados nas lesões cutâneas de pacientes com Leishmaniose cutânea, apoiando nossos dados indicando o papel crítico do GSDMD na Leishmaniose.



**Figura 23. O inflamassoma NLRP3/ASC e a GSDMD estão ativos em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea.** Microscopia multi-foton da biópsia de pele de 7 pacientes com *Leishmaniose* e pele de 5 pacientes saudáveis submetidos à mastectomia redutiva (controles). Os tecidos foram marcados com anti-NLRP3 (A-C), anti-ASC (D-F) e anti-GSDMD clivada (fragmento N-terminal) (G-I). Imagens representativas mostrando puncta de NLRP3 (A) ou puncta de ASC (D) em vermelho (indicado por uma seta branca) ou GSDMD clivado (G) em vermelho. DAPI cora os núcleos das células (azul) e as células CD64+ são coradas em verde. Barra de escala 40  $\mu\text{m}$ . (B, E, H) Insets indicam uma maior ampliação da região indicada (quadrado vermelho). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ . (C, F, I) Quantificação de células com puncta de NLRP3 (C) ou ASC (F) e células com GSDMD clivada (I) em biópsias de pele. Cada ponto na figura representa o valor obtido de cada indivíduo. \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste T de Student.

## 8. DISCUSSÃO

Neste estudo, revelamos que GSDMD é ativada em BMDMs e em lesões de pacientes com Leishmaniose e que esta proteína é importante para restringir a infecção em macrófagos e *in vivo*. Curiosamente, nossos dados mostram que após a infecção por *Leishmania* em BMDMs há uma ativação transitória e fraca de GSDMD, que pode não ser robusta suficiente para promover a morte celular, mas é suficiente para permitir o efluxo de potássio e ativação não canônica de NLRP3 (**Figura 24**). Esses dados contribuem efetivamente para a nossa compreensão sobre como o inflamassoma é ativado em resposta à *Leishmania*, um processo que é fundamental para o desfecho da leishmaniose, mas mecanicamente ainda é incerto. É importante ressaltar que esta ativação transitória da GSDMD não leva à morte celular e esse processo pode ser ativamente manipulada pelo parasita, que permite baixos níveis de ativação do inflamassoma, sem matar os macrófagos, o principal nicho replicativo dos parasitas. Os baixos níveis de ativação do inflamassoma, podem garantir um processo inflamatório contínuo na pele infectada, processo que pode ser suficiente para manter as células inflamatórias nos sítios de infecção, contribuindo para a natureza crônica e inflamatória das lesões que são a marca registrada da Leishmaniose tegumentar.

A ativação do inflamassoma em resposta à infecção por *Leishmania* foi relatado por muitos grupos (Lima-Junior *et al.*, 2013; Gurung *et al.*, 2015; Charmoy *et al.*, 2016; Chaves *et al.*, 2019; De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019). Em resposta a outros patógenos, esse processo normalmente leva a uma morte celular inflamatória, conhecida como piroptose. A principal molécula efetora do processo de piroptose é a GSDMD (Kayagaki *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015). Aqui, mostramos pela primeira vez que a GSDMD é ativada nas primeiras horas de infecção pela *Leishmania* em BMDMs, embora não haja diferença significativa nas taxas de morte celular 24 horas após a infecção. Esses achados nos levaram a investigar melhor o mecanismo de inibição da morte celular em células infectadas com *Leishmania*. Já se sabe que uma maquinaria de transporte de membranas como ESCRT pode reparar a membrana plasmática em situações de dano (Jimenez *et al.*, 2014) e que este reparo também ocorre quando há a formação de poros de GSDMD (Rühl *et al.*, 2018), inibindo a ativação de GSDMD e a morte celular. Nossos resultados sugerem que a inibição da morte celular, observada em nosso estudo, não é associada a um mecanismo de reparo de membrana mediado por ESCRT (**Figura 11**). Portanto, outro

mecanismo ainda não identificado, deve estar envolvido na prevenção da morte celular durante a infecção por *Leishmania*. Estudos futuros podem abordar a possível interferência da *Leishmania* no complexo *Ragulator-Rag*, uma via que já foi descrita como necessário para a indução da formação de poros de GSDMD (Evavold *et al.*, 2021). Independentemente desses mecanismos inibitórios ainda não identificados, espera-se que em seu processo evolutivo a *Leishmania* possa ter desenvolvido mecanismos para inibir a morte celular, como um mecanismo para evadir a resposta imune e manter o seu nicho replicativo (Ruhland *et al.*, 2007; Gutiérrez-Kobeh *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2016). Nós mostramos que a GSDMD promove uma permeabilização transitória da membrana em células infectadas pela *L. amazonensis* sem causar morte celular. Ainda não se sabe como essa permeabilização falha em promover a morte celular.

A *Leishmania* possui várias enzimas semelhantes às caspases e que são chamadas de metacaspases, embora tenham um sítio catalítico diferente das caspases tradicionais. A metacaspase LmjMCA é um exemplo de caspase em *L. major* que tem um papel importante na apoptose do parasita (González *et al.*, 2007; Zalila *et al.*, 2011). Do ponto de vista evolutivo, não deve haver pressão seletiva para o desenvolvimento de morte celular programada em organismos unicelulares, como *Leishmania*. Dessa forma, é possível que proteases como LmjMCA tenham um papel no desenvolvimento do parasita ou subversão das funções da célula hospedeira. Interessantemente, LmjMCA tem uma sequência de localização mitocondrial; clivagem nas porções N- e C-terminais são importantes para a maturação do domínio catalítico, mostrando que esta proteína tem atividade enzimática tanto no citoplasma quanto na mitocôndria (Zalila *et al.*, 2011). Essa clivagem e localização dupla é semelhante para caspases de mamíferos. Por exemplo, a caspase-3 é encontrada no citosol e na membrana mitocondrial interna, que está relacionada com a sinalização apoptótica (Mancini *et al.*, 1998; Samali *et al.*, 1998).

Assim, especulamos que metacaspase da *Leishmania* e/ou outras proteínas podem estar envolvidas na modulação das funções da GSDMD em células infectadas, essa pode ser uma estratégia de inibir a morte celular como mecanismo de evasão do sistema imunológico. Essa resposta é compartilhada por muitos outros microrganismos, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* (Danelishvili *et al.*, 2011), *Shigella flexneri* (Kobayashi *et al.*, 2013), *Francisella tularensis* (Dotson *et al.*, 2013), *Chlamydia trachomatis* (Jorgensen *et al.*, 2011), *Yersinia pseudotuberculosis* (Brodsky *et al.*, 2010) e *Coxiella burnetii* (Cunha *et al.*, 2015), que inibem componentes do inflamassoma logo após a infecção, favorecendo o estabelecimento do nicho intracelular que suportam a replicação do patógeno. Existem poucos estudos mostrando que os protozoários podem inibir a

morte da célula hospedeira. Um estudo mostra que o *Plasmodium berghei* inibe a apoptose de hepatócitos no início da infecção (Rennenberg *et al.*, 2010). Como parasita intracelular obrigatório, a *Leishmania* deve ter coevoluído com o hospedeiro para desenvolver mecanismos robustos de evasão da resposta imune e inibição da morte celular, podendo assim inibir a apoptose (Lisi *et al.*, 2005; Gutiérrez-Kobeh *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2016) e, muito provavelmente, a piroptose também, como nossos resultados indicam.

A *Leishmania* possui várias vias de inibição do apoptose em macrófagos. A infecção por *L. major* pode suprimir a liberação de citocromo c pelas mitocôndrias (Akarid *et al.*, 2004) e, com isso, inibir a via intrínseca da apoptose. Ruhland *et al.* (2007) mostrou que a *L. major*, *L. amazonensis* e *L. pifanoi* induzem a fosforilação de PI3K/Akt. Esta via suprime a retirada de  $\beta$ -catenina, um regulador transcricional anti-apoptótico, pela GSK-3 $\beta$ , e induz a fosforilação de Bad, um fator anti-apoptótico que suprime a liberação de citocromo c (Ruhland *et al.*, 2007). Gupta *et al.* (2016) mostram que *L. donovani* também pode usar a mesma via para inibir a apoptose (Gupta *et al.*, 2016). Outros mecanismos descritos para inibir a apoptose em macrófagos mostram que *L. donovani* pode induzir proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) 1 e 3 (Srivastav *et al.*, 2014). Pouco se sabe sobre como a *Leishmania* é capaz de induzir essas vias para inibir a apoptose, porém alguns estudos mostram que os fosfolipídios da *Leishmania*, como o LPG, podem contribuir para a inibição da apoptose de macrófagos durante infecção (Lisi *et al.*, 2005; Donovan *et al.*, 2009); ainda não se sabe por qual via o LPG pode inibir a apoptose.

Apesar da conhecida importância do inflamassoma no controle de infecções, ainda existem algumas dúvidas sobre o mecanismo de ativação do inflamassoma de NLRP3 na infecção por *Leishmania*. A produção de ROS via Dectin-1 e efluxo de potássio pode estar envolvido na ativação do inflamassoma de NLRP3 (Lefèvre *et al.*, 2013; Lima-Junior *et al.*, 2013; Lima-Junior *et al.*, 2017). Além desses mecanismos, Carvalho *et al.* (2019) demonstrou que a via não canônica do inflamassoma tem um papel importante na ativação do NLRP3 via reconhecimento de LPG (De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019). Embora não haja morte celular mediada por *Leishmania*, demonstramos que a formação de puncta de ASC, entrada de PI, efluxo de potássio, síntese e secreção de IL-1 $\beta$  são menores em BMDMs *Gsdmd*<sup>-/-</sup> sugerindo que a GSDMD pode contribuir para a ativação do inflamassoma de NLRP3. Esse papel da GSDMD na ativação não canônica do inflamassoma já foi descrita para bactérias gram-negativas (Kayagaki *et al.*, 2015). Mais estudos devem investigar como essa clivagem diferencial de GSDMD ocorre.

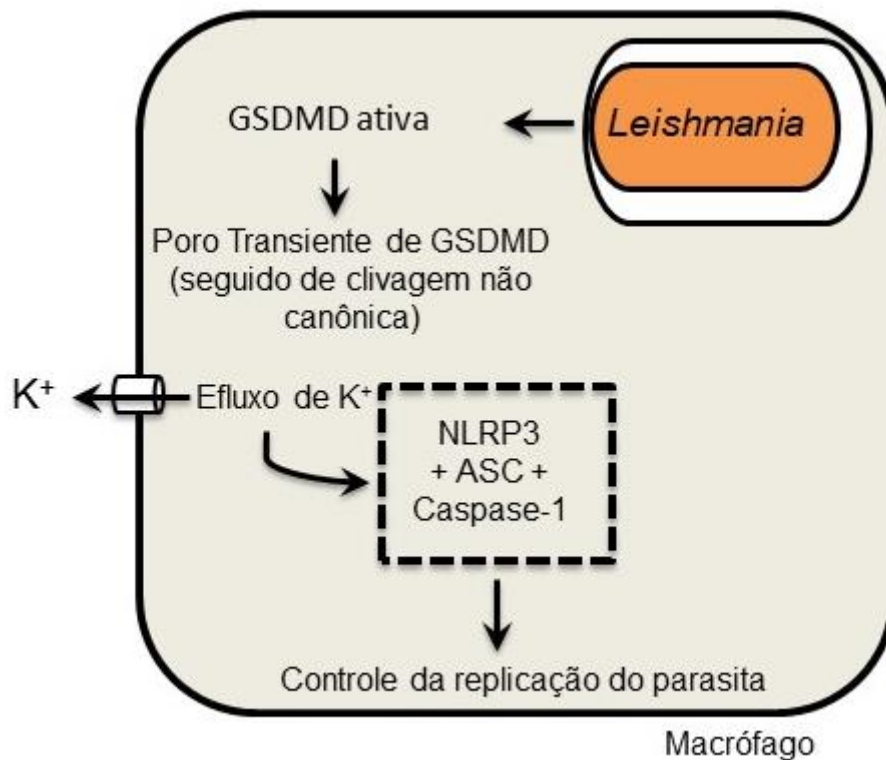
Já foi descrito que o inflamassoma de NLRP3 é importante para controlar a infecção por *Leishmania* e que esse processo ocorre parcialmente por meio da Caspase-11 (Lima-Junior *et al.*, 2013; Chaves *et al.*, 2019; De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019). No entanto, o papel da GSDMD não foi avaliado na infecção por *Leishmania in vivo*. Mostramos pela primeira vez que a ausência da GSDMD leva a um aumento da suscetibilidade à infecção por *Leishmania* em camundongos e em macrófagos. Esses dados destacam o papel central da GSDMD na resposta à infecção por *Leishmania* e fornece um mecanismo para explicar a ativação não canônica do NLRP3 induzida pela *Leishmania*.

A forma mais importante da *Leishmania* para infecção *in vivo* é a amastigota, que apesar de ter pouca expressão de LPG também é capaz de induzir a ativação do inflamassoma em macrófagos (De Carvalho, Andrade, *et al.*, 2019), em um processo parcialmente dependente de GSDMD. Além disso, pode haver outros inflamassomas envolvidos neste processo (AIM2, NLRP1, etc.), que poderiam ativar caspase-1 e GSDMD independentemente do LPG. Importante, a GSDMD também pode ser ativada independentemente dos inflamassomas. Foi demonstrado que a GSDMD pode ser ativada por Caspase-8 em resposta a bactérias (Orning *et al.*, 2018; Sarhan *et al.*, 2018). Além disso, GSDMD pode ser clivada pela elastase de neutrófilos (Chen *et al.*, 2018; Sollberger *et al.*, 2018), um processo que é independente do inflamassoma e contribui para a liberação de NET, um processo celular que é muito importante na Leishmaniose (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2009; Charmoy *et al.*, 2010; Charmoy *et al.*, 2016). Nesse cenário, é possível que a exclusão da GSDMD também anula as vias independentes do inflamassoma que operam para restrição da infecção por *Leishmania*. Isso pode explicar a suscetibilidade exacerbada dos camundongos *Gsdmd*<sup>-/-</sup> para *L. major* (**Figura 21I-L**), uma espécie que foi previamente demonstrado ser controlada em camundongos C57BL/6 independentemente do inflamassoma (Lima-Junior *et al.*, 2013). Independentemente das vias envolvidas na ativação da GSDMD, mostramos um papel importante para GSDMD na ativação do inflamassoma de NLRP3 e controle da infecção por *Leishmania*. É importante ressaltar que nossos experimentos com amostras clínicas demonstraram claramente a ativação do inflamassoma e da GSDMD nas lesões de pacientes com leishmaniose, corroborando nossa afirmação da importância da GSDMD e do inflamassoma no curso da doença. Apesar de demonstrar o papel fundamental da GSDMD para o desfecho da doença, nossos resultados indicam a existência de uma via desconhecida usada pela *Leishmania* para contornar a piroptose. Esse processo pode envolver o processamento da GSDMD no fragmento de 25kDa, e

pode explicar a formação transitória de poros relatada neste documento. Em resumo, nossos estudos mostram a GSDMD como uma molécula central envolvida na interação da *Leishmania* com macrófagos, e que é fundamental para o desenvolvimento da doença. Uma investigação mais aprofundada deste processo pode revelar alvos medicamentosos relevantes no combate à Leishmaniose.

## 9. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos resultados mostram que ocorre uma clivagem não canônica da GSDMD durante a infecção por *Leishmania*, que leva a formação de um poro transitente e efluxo de  $K^+$  sem que haja morte celular, o efluxo de  $K^+$  leva a ativação do inflamassoma de NLRP3, secreção de  $IL-1\beta$  e o controle da replicação do parasita (**Figura 24**). Nosso estudo mostra a GSDMD como uma molécula central envolvida na interação da *Leishmania* com macrófagos, e que é fundamental para o desenvolvimento da doença. Uma investigação mais aprofundada deste processo pode revelar alvos medicamentosos relevantes no combate à Leishmaniose.



**Figura 24.** Modelo esquemático que ilustra o papel de Gasdermin-D (GSDMD) na ativação do inflamassoma e restrição da infecção por *Leishmania*.



# Capítulo 2:

*A Ativação Do Inflamassoma e a Carga Viral  
Pulmonar Define Dois Perfis Clínicos Distintos na  
COVID-19.*

## RESUMO

A COVID-19 afetou mais de meio bilhão de pessoas em todo o mundo, com mais de 6,3 milhões de mortes, o que torna de extrema importância os estudos que buscam elucidar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos em casos letais e os fatores do hospedeiro que determinam os diferentes desfechos clínicos. Neste estudo, avaliamos autópsias pulmonares de 47 casos fatais de COVID-19 e 12 de influenza e examinamos os perfis inflamatórios, cargas virais e ativação do inflamassoma. Além disso, correlacionamos esses fatores com as condições clínicas e histopatológicas dos pacientes. Observamos uma maior ativação geral do inflamassoma em casos letais de SARS-CoV-2 em comparação com a influenza e encontramos um perfil diferente de células com inflamassoma ativo durante essas doenças. Em pacientes com COVID-19, a ativação do inflamassoma é principalmente mediada por macrófagos e células endoteliais, enquanto na influenza, pneumócito tipo I e tipo II contribuem de forma mais significativa. Uma análise da expressão gênica pulmonar permitiu a classificação dos pacientes com COVID-19 em dois grupos diferentes. O cluster 1 morreu com cargas virais mais altas e exibiu um perfil inflamatório reduzido quando comparado com o cluster 2. Tempo de doença, tempo de ventilação mecânica, fibrose pulmonar, funções respiratórias, estado histopatológico, trombose, carga viral e ativação do inflamassoma diferiram significativamente entre os dois clusters. Nossos dados demonstraram dois perfis distintos em casos letais de COVID-19, indicando assim que o equilíbrio entre replicação viral e inflamação pulmonar mediada pelo inflamassoma levou a diferentes desfechos clínicos. Nossos dados possuem informações importantes para entender as variações clínicas da COVID-19 grave, um processo que é fundamental para decisões entre terapias imunomediadas ou mediadas por antivirais para o tratamento de casos críticos de COVID-19.

**Palavras-chave: COVID-19, Influenza, Inflamassoma**

## ABSTRACT

COVID-19 has affected more than half a billion people worldwide, with more than 6.3 million deaths, but the pathophysiological mechanisms involved in lethal cases and the host determinants that determine the different clinical outcomes are still unclear. In this study, we assessed lung autopsies of 47 COVID-19 and 12 influenza fatal cases and examined the inflammatory profiles, viral loads and inflammasome activation. Additionally, we correlated these factors with clinical and histopathological patient conditions. We observed an overall stronger inflammasome activation in lethal cases of SARS-CoV-2 compared to influenza and found a different profile of inflammasome-activating cells during these diseases. In COVID-19 patients, inflammasome activation is mostly mediated by macrophages and endothelial cells, whereas in influenza, type I and type II pneumocytes contribute more significantly. An analysis of gene expression allowed for the classification of COVID-19 patients into two different clusters. Cluster 1 died with higher viral loads and exhibited a reduced inflammatory profile than Cluster 2. Illness time, mechanical ventilation time, pulmonary fibrosis, respiratory functions, histopathological status, thrombosis, viral load and inflammasome activation significantly differed between the two clusters. Our data demonstrated two distinct profiles in lethal cases of COVID-19, thus indicating that the balance of viral replication and inflammasome mediated pulmonary inflammation led to different clinical outcomes. We provide important information to understand clinical variations in severe COVID-19, a process that is critical for decisions between immune-mediated or antiviral mediated therapies for the treatment of critical cases of COVID-19.

**Keywords: COVID-19, Influenza, Inflammasomes**

## 10. INTRODUÇÃO

### 10.1 Histórico e Classificação do Vírus da Influenza

O vírus influenza é um vírus envelopado pertencente à família *Orthomyxoviridae*, que é classificado em quatro gêneros, que inclui os vírus da influenza A, B, C e D. Os vírus da influenza A e B são os principais causadores da gripe (Ictv, 2021). Os vírus da influenza A são responsáveis pela maioria das epidemias anuais de influenza, ou pandemias. Eles são subtipados de acordo com mutações descritas em duas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum, 1980), atualmente existem 18 HAs e 11 NAs descritas. Os subtipos H1N1 e H3N2 são os que mais causam epidemias em humanos (WHO, 2022b). O vírus da influenza B possui uma estrutura similar ao vírus da influenza A, entretanto possui pouca variabilidade na HA e NA, dessa forma ele é classificado em apenas duas linhagens circulantes (B/Victoria e B/Yamagata) (WHO, 2022b).

### 10.2 Epidemiologia da Influenza

O vírus influenza se mantém em constante pressão de seleção gerada pela resposta imune dos seus hospedeiros (humanos e não humanos), em contrapartida a RNA polimerase, dependente de RNA (RdRp) da influenza, gera altas taxas de mutação por não possuir capacidade de revisão, aumentando probabilidade de o vírus evadir a resposta imune. As mutações que ocorrem na HA e na NA são denominadas *antigenic drift* (mutações randômicas que geram pequenas alterações na estrutura proteica que leva a evasão da resposta imune do hospedeiro) e *antigenic shift* (grandes alterações no genoma viral, que leva ao surgimento de cepas pandêmicas). O acúmulo dessas mutações altera o fitness da infecção em humanos e contribui para o aparecimento das epidemias (Lin *et al.*, 2019). Desde 1889 ocorreu 5 pandemias do influenza A, a mais severa de todas ocorreu em 1918 e a mais recente em 2009 (Saunders-Hastings and Krewski, 2016). Na **Tabela 2** está descrita algumas características das últimas pandemias de influenza.

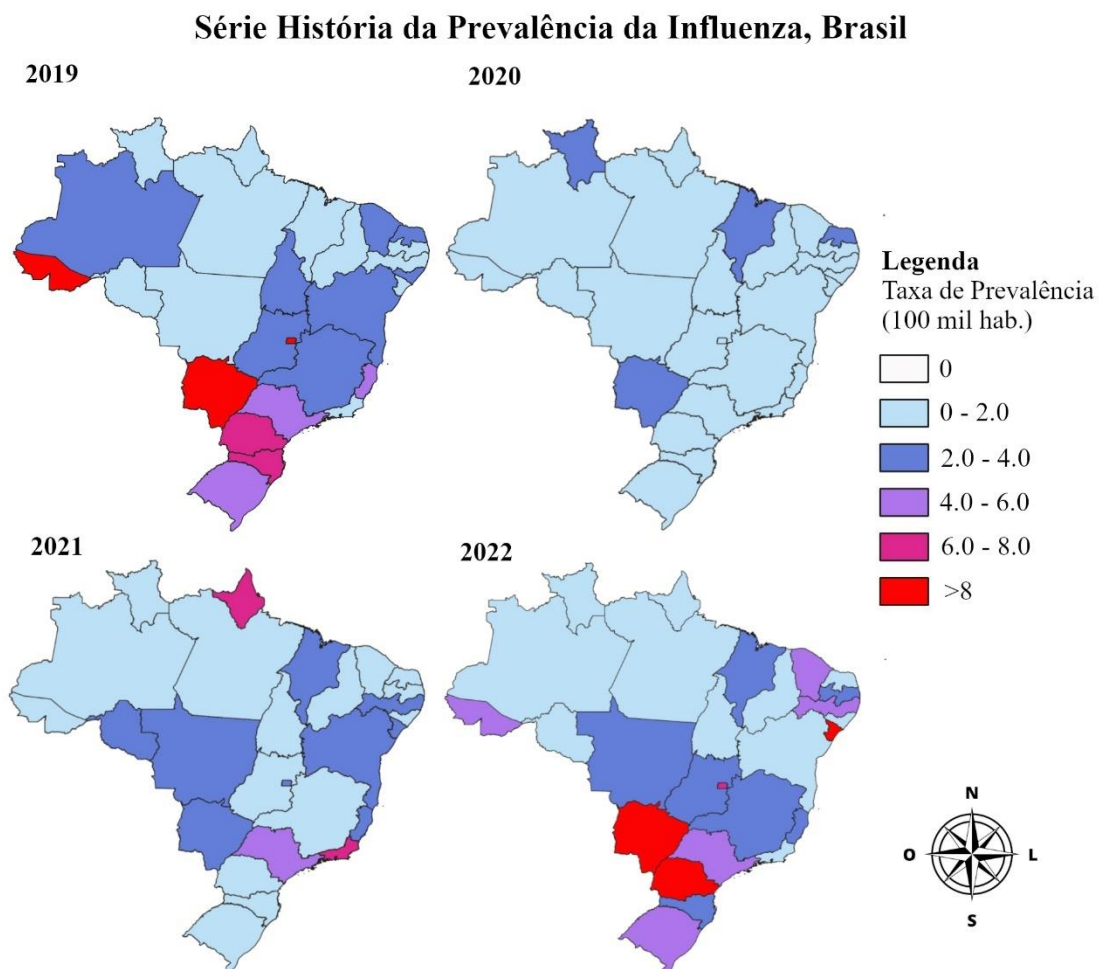
**Tabela 2:** Resumo das principais características das pandemias de gripe dos últimos cem anos.

Nome da Pandemia	Ano	Cepa	Origem do Surto	Número de Mortes
Gripe Espanhola	1918	H1N1	China	40 – 50 milhões

Gripe Asiática	1957	H2N2	China	1 – 2 milhões
Gripe de Hong Kong	1968	H3N2	China	500 mil – 2 milhões
Gripe Suína	2009	H1N1	México	575 mil

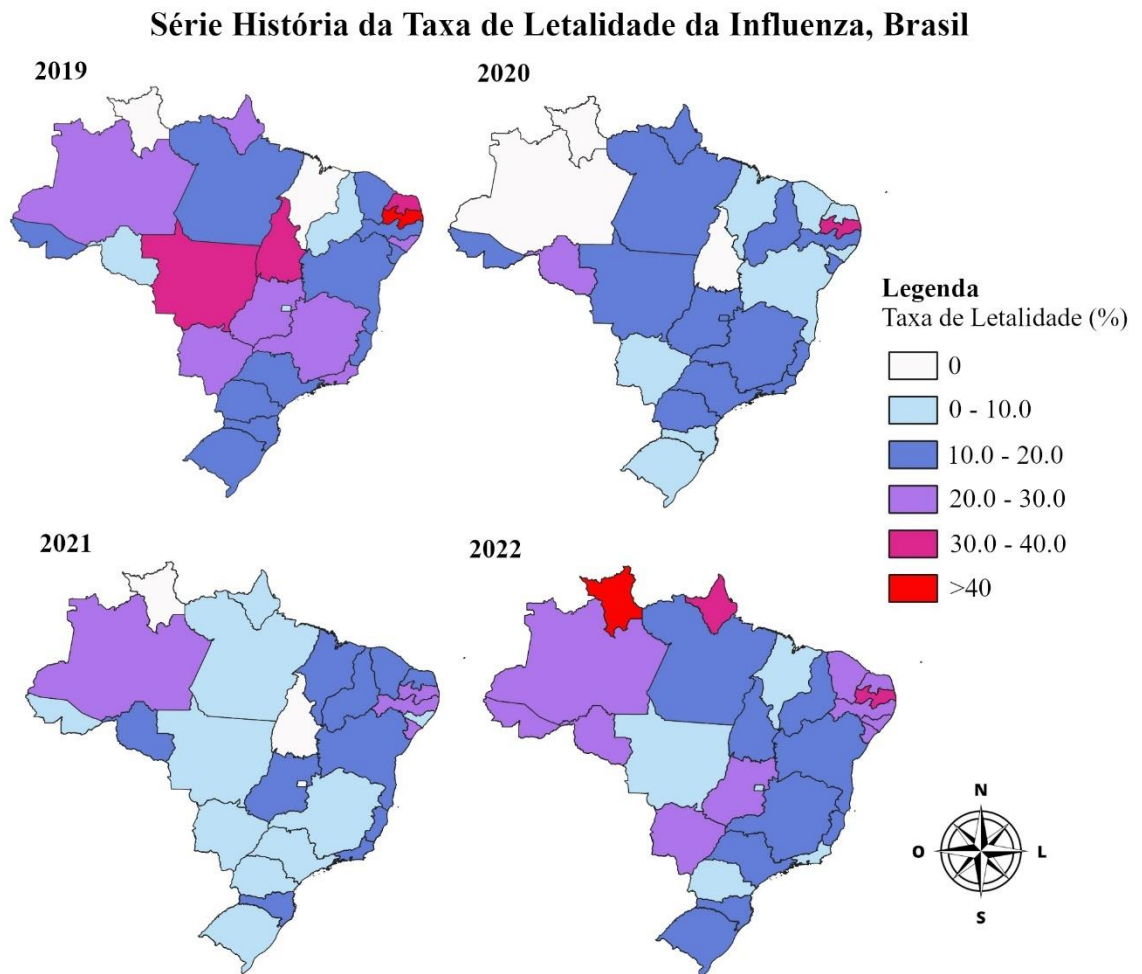
Após a pandemia de 2009, o vírus influenza A/H1N1 tornou-se a cepa sazonal de influenza circulante no mundo, com as epidemias acontecendo nos meses mais frios e secos do ano (Simonsen, 1999), com a umidade e a temperatura influenciando na transmissão e na viabilidade das partículas virais (Shaman and Kohn, 2009).

No Brasil, a sazonalidade da influenza varia de acordo com a latitude, iniciando no Norte, com o maior número de casos acontecendo em maio, e descendo pelo país com um pico de casos no Sul acontecendo em junho (Almeida *et al.*, 2018). Ao analisar a série histórica da prevalência da influenza no Brasil, observamos uma prevalência média variando de 0 a 4 casos a cada 100 mil habitantes (**Figura 25**), com a região Sul, Sudeste e Centro-Oeste sendo as mais afetadas.



**Figura 25.** Série histórica da prevalência da influenza por unidade federativa do Brasil. Dados obtidos no (Datusus, 2022).

A taxa de letalidade da influenza no Brasil possui uma distribuição heterogênea entre as regiões, variando em média de 10 a 30% (**Figura 26**).



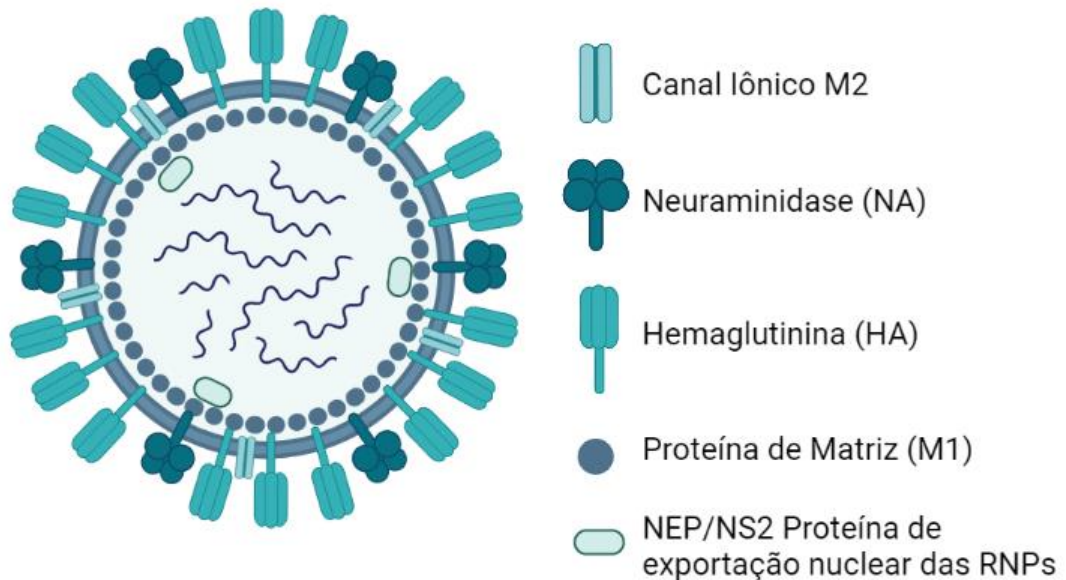
**Figura 26.** Série histórica da taxa de letalidade da influenza por unidade federativa do Brasil. Dados obtidos no (Datusus, 2022).

### 10.3 Estrutura Viral e Ciclo de Replicação da Influenza

A hemaglutinina (HA) se localiza na membrana lipídica do vírus influenza e se liga ao ácido sálico presente na superfície da membrana celular do hospedeiro (Weis *et al.*, 1988; Hanson *et al.*, 1992). Durante o reconhecimento do receptor a Neuraminidase (NA) cliva os resíduos de ácido siálico e libera o vírus de ligações HA-ácido siálico não produtivas, permitindo que o vírus continue “escaneando” a superfície da célula até encontrar o receptor sialilado adequado (Sakai *et al.*, 2017). Ao se ligar nos resíduos de ácido siálico na célula do hospedeiro, ocorre a endocitose da partícula viral, no endossomo o pH baixo (em torno de 5) leva a uma mudança conformacional da HA, que se insere na membrana endossomal e desencadeia fusão da membrana viral com a

membrana endossomal (White *et al.*, 1982; Yoshimura and Ohnishi, 1984; Bullough *et al.*, 1994). O pH ácido do endossomo também gera uma mudança conformacional na proteína M2, que é um canal iônico seletivo para prótons, que acidifica o núcleo viral liberando as ribonucleoproteínas virais (vRNPs) da proteína de matriz (M1), que então acessa o citoplasma da célula (Pinto *et al.*, 1992; Lakadamyali *et al.*, 2003; Rust *et al.*, 2004).

A replicação do genoma viral ocorre no núcleo e o transporte do material genético da influenza para o núcleo é realizado pela NS2, que recruta a proteína adaptadora importin- $\alpha$  (Wang *et al.*, 1997; Cros *et al.*, 2005). Uma vez associada ao vRNP, a importin- $\alpha$  recruta a importin- $\beta$  direciona a vRNP para o núcleo (Martin and Helenius, 1991; O'Neill *et al.*, 1995). A estrutura viral e essas proteínas são representadas na **Figura 27**.



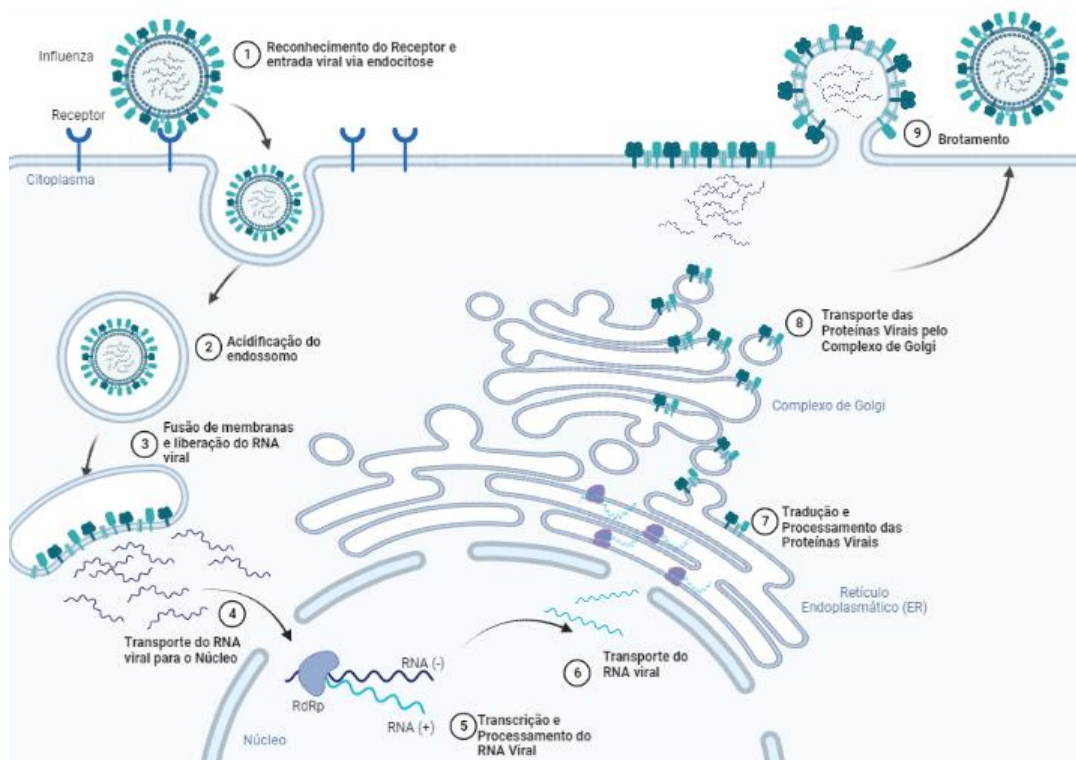
**Figura 27. Estrutura do vírus da influenza (Criado com Biorender).**

O genoma viral da influenza é composto por oito fitas de RNA de polaridade negativa, no núcleo a RNA polimerase viral dependente de RNA (RdRp) inicia a transcrição do RNA de polaridade negativa, para um RNA de polaridade positiva (Newcomb *et al.*, 2009; York *et al.*, 2013). O RNA viral possui a cauda poly(A) (Poon *et al.*, 1999), mas não possui o cap 5', que é adicionado ao RNA viral pela subunidade PB2 da RdRp que cliva mRNA do hospedeiro e adiciona o cap 5' ao RNA viral (Plotch *et al.*, 1981; Guilligay *et al.*, 2008; Reich *et al.*, 2014). Após o processamento do RNA viral, ele pode ser utilizado pela RdRp para gerar novas fitas de polaridade negativa ou ser

transportado para fora do núcleo da célula para ser traduzido pelos ribossomos do hospedeiro (Jorba *et al.*, 2009).

As proteínas de membrana da influenza são sintetizadas e processadas no retículo endoplasmático rugoso (Bos *et al.*, 1984; Daniels *et al.*, 2003) e transportado pelo Golgi para a membrana plasmática em regiões ricas em colesterol denominadas *rafts* (Takeda *et al.*, 2003; Veit and Thaa, 2011). O RNA viral e as proteínas virais citoplasmáticas são transportadas para a membrana plasmática pela proteína RAB-11 (Amorim *et al.*, 2011; Eisfeld *et al.*, 2011; Momose *et al.*, 2011; De Castro Martin *et al.*, 2017). Quando todas as proteínas virais e o RNA viral se encontram na membrana plasmática ocorre o brotamento das partículas virais (Rossman and Lamb, 2011).

No trato respiratório, o epitélio é recoberto por muco que é rico em glicoproteínas sialiladas como a mucina, que pode se associar com a HA e impedir o movimento das novas partículas virais. A NA cliva os resíduos de ácido siálico no muco facilitando o movimento das partículas virais para as células vizinhas (Matrosovich *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). As etapas do ciclo de replicação do vírus influenza estão esquematizadas na **Figura 28**.



**Figura 28.** Ciclo de replicação do vírus influenza (Criado com Biorender).


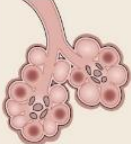



### 10.1 Apresentação Clínica da Influenza



A infecção pelo vírus influenza pode se apresentar desde uma infecção assintomática a quadros graves que podem levar ao óbito do paciente. Crianças não vacinadas para o vírus da influenza apresentam um risco elevado para o desenvolvimento de uma doença grave (Munoz, 2003).

A transmissão do vírus acontece principalmente de pessoa a pessoa por meio de espirros, tosse e contato com objetos contaminados (Cowling *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2021; Zhou and Zou, 2021). Após a inoculação do vírus, o pico de replicação acontece no segundo ao terceiro dia e cai a níveis indetectáveis de 6 a 7 dias, em alguns indivíduos, portanto o vírus continua replicando por vários dias (Carrat *et al.*, 2008).

Os sintomas mais comuns são faringite e traqueobronquite, acompanhado de febre, coriza, tosse, mal-estar e mialgia. Em casos mais graves, podem ocorrer o desenvolvimento de pneumonia, Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e morte com mais frequência nas populações de alto-risco. Fatores de Risco associados à influenza estão descritos na **Figura 29B**.

Fatores de Risco					
Fumantes	Genéticos	Comorbidades	Gravidez ou gênero	Obesidade	Idade
Função de células epiteliais, imunes e fibroblastos prejudicada	Genes associados com reconhecimento viral e sinalização de interferon	Cardiopatas  Doença de Obstrução Pulmonar Crônica 	Estado imunológico de tolerância Hormônios esteroides influenciam na resposta imune  ♂	Menos resposta de anticorpo Disregulação imune devido a obesidade Resposta imune adaptativa deficiente 	Viés para resposta imune tipo 2 Ausência de imunidade prévia imunosenescência 

**Figura 29.** Mortalidade e fatores de risco associados à Influenza (Adaptado de (Flerlage *et al.*, 2021)

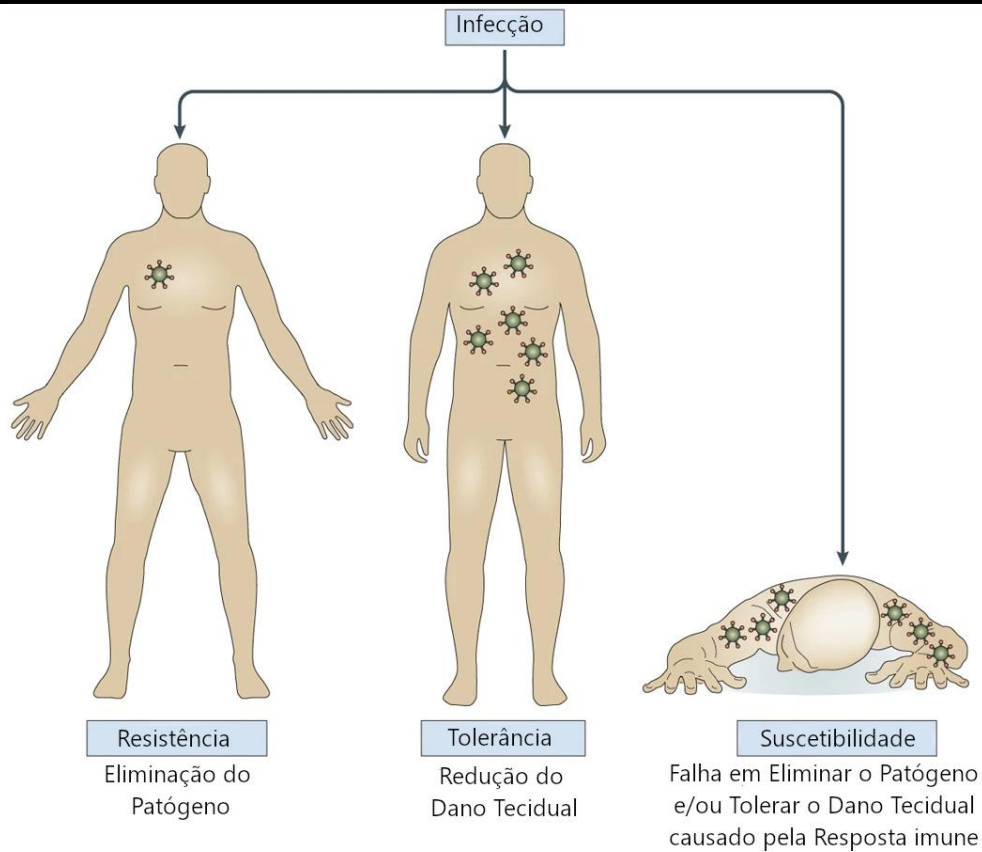
### 10.2 Aspectos gerais da resposta imune inata na Influenza

A resposta imune presente na mucosa é capaz de conter a maioria das partículas virais que tentam invadir o corpo do hospedeiro. Ao entrar no hospedeiro através das mucosas das cavidades nasal e oral, o vírus da influenza encontra primeiro o muco que recobre o epitélio respiratório. A NA viral é responsável por facilitar o acesso do vírus ao

epitélio respiratório através do muco (Matrosovich *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Ao conseguir invadir as células epiteliais, o vírus pode se espalhar e infectar células não imunes e células imunes do trato respiratório (como macrófagos e células dendríticas) (Perrone *et al.*, 2008; Manicassamy *et al.*, 2010).

O RNA viral dentro das células hospedeiras é reconhecido pelos PRRs que levam a secreção de Interferon do tipo I (IFN), citocinas pró-inflamatórias, eicosanoides e quimiocinas. O Interferon do Tipo I é produzido por macrófagos, pneumócitos, células dendríticas e células dendríticas plasmocitóides (Jewell *et al.*, 2007; Högner *et al.*, 2013; Kallfass *et al.*, 2013). A secreção de Interferon do Tipo I estimula a expressão de centenas de genes que são conhecidos como Genes Estimulados por Interferon (do inglês, *IFN-stimulated genes – ISGs*) induzindo um estado antiviral nas células vizinhas. O estado antiviral se caracteriza pela indução de proteínas que vão levar a uma parada na síntese proteica, transcrição de RNA e consequente inibição da replicação viral. As citocinas pró-inflamatórias e eicosanóides causam uma inflamação local e sistêmica, induzindo febre e iniciando a montagem da resposta imune adaptativa. Por sua vez, as quimiocinas recrutam células da resposta imune para o sítio de infecção, como neutrófilos células NK e monócitos. As células epiteliais infectadas são mortas pelas células NK (Gazit *et al.*, 2006). Monócitos e neutrófilos auxiliam na eliminação das células infectadas e na limpeza de células mortas (eferocitose) (Hashimoto *et al.*, 2007).

É importante levar em consideração não apenas a defesa do organismo a nível celular, mas do corpo como um todo, para que após uma infecção a saúde do organismo hospedeiro seja restaurada, reduzindo a replicação do patógeno (resistência antiviral) ou reduzindo o dano gerado ocasionado pela resposta imune (tolerância à doença). Um hospedeiro resistente recupera a saúde reconhecendo, eliminando o patógeno e controlando o dano gerado pelo processo de doença, um hospedeiro tolerante é capaz de controlar os danos ocasionados pela resposta imune à doença convivendo com o patógeno sem o aparecimento da doença, um hospedeiro se torna suscetível quando é incapaz de eliminar o patógeno ou controlar a doença (**Figura 30**).



**Figura 30. Resistência antiviral e tolerância à doença (Adaptado de (Iwasaki and Pillai, 2014)).**

### 10.3 Inflamassoma na Influenza

Durante a infecção pelo vírus influenza, os PAMPs das bactérias comensais presentes na mucosa são importantes para iniciar o primeiro sinal necessário para a ativação do inflamassoma e montagem uma resposta imune eficiente (Ichinohe *et al.*, 2011). Após a infecção pelo vírus influenza, a expressão do canal iônico M2, a perda do potencial de membrana mitocondrial ou o acúmulo do RNA viral no citosol leva à ativação do inflamassoma, secreção de IL-1 $\beta$  e morte das células infectadas (Allen *et al.*, 2009; Ichinohe *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009; Ichinohe *et al.*, 2010; Ichinohe *et al.*, 2013; Mcauley *et al.*, 2013; Pothlichet *et al.*, 2013; Moriyama *et al.*, 2020). Células dendríticas não infectadas são estimuladas pela IL-1 $\beta$  aumentando a expressão do CC-receptor de quimiocina 7 (CCR7) e migram para os linfonodos drenantes para apresentação dos antígenos virais das células mortas infectadas. A ativação do inflamassoma tem sido mostrada como essencial para o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão (Thomas *et al.*, 2009; Guarda *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2013).

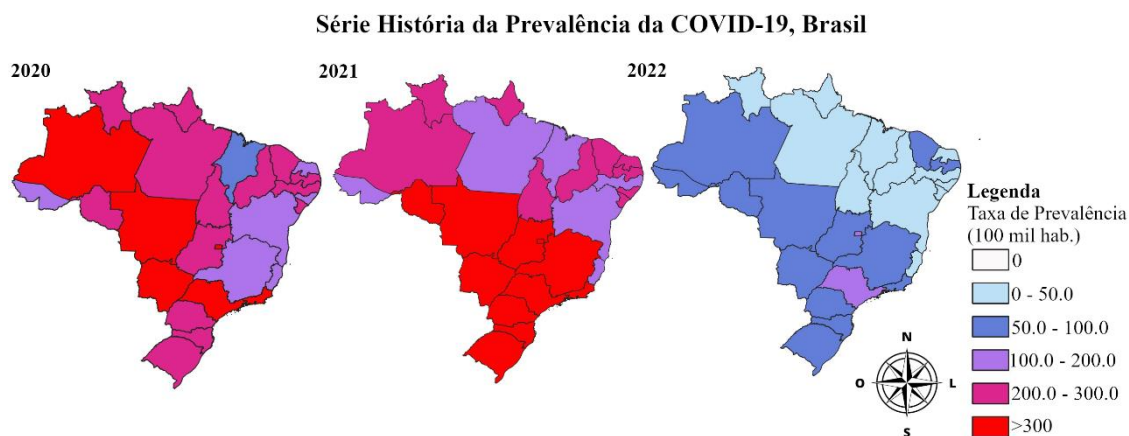
### 10.4 Histórico e Classificação do COVID-19

Os Coronavírus são vírus envelopados que possuem fita simples de RNA e pertencem à família *Coronaviridae* e que são divididos em quatro gêneros: alphacoronaviruses, betacoronaviruses, gammacoronaviruses e deltacoronaviruses (Ictv, 2021). Semelhante ao vírus influenza, os coronavírus também circulam em reservatórios não humanos. Os alphacoronavirus e betacoronavirus circulam em roedores e morcegos, gammacoronavirus e deltacoronavirus circulam em aves (Cui *et al.*, 2019). O contato próximo dos seres humanos com esses animais e a estratégia de replicação viral utilizada pelos coronavírus permitem que ocorram eventos de recombinação que conferem a eles a habilidade de infectar novos hospedeiros (Woo *et al.*, 2006). Dessa forma, tem sido descrito novos coronavírus que possuem a capacidade de infectar humanos e causar a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) (Peiris *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2006; Zaki *et al.*, 2012), entre eles foi identificado o *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (Zhu *et al.*, 2020), que possui 96,2% de similaridade com coronavírus que circulam entre morcegos (Zhou, P. *et al.*, 2020). O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, ao gênero *betacoronaviruses* e a espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (ICTV, 2020).

### 10.5 Epidemiologia da COVID-19

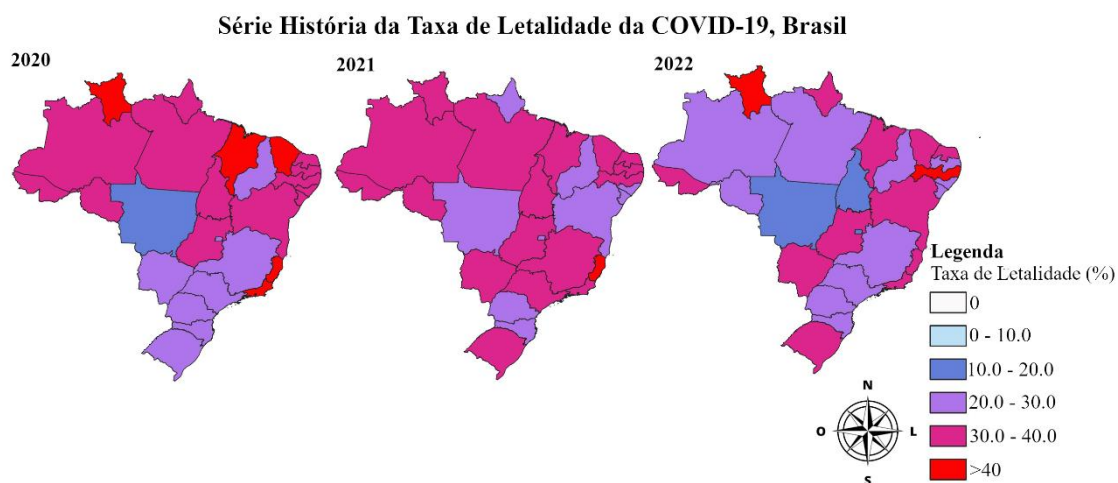
O primeiro caso de COVID-19 foi reportado em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan na China (Chen, N. *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Zhou, P. *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Análises realizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que o início da pandemia se originou de um único evento de contato do vírus com a população humana e que o *spillover* ocorreu provavelmente de uma origem animal (WHO, 2020c). Após esse primeiro surto em 2019, a COVID-19 rapidamente se espalhou pelo mundo alcançando 612 milhões de casos confirmados e totalizando 6 milhões de mortes em setembro de 2022 (WHO, 2022a).

No Brasil, o primeiro caso suspeito da infecção pelo SARS-CoV-2 foi notificado em janeiro de 2020, com os primeiros casos confirmados da doença sendo notificado em março de 2020 em diversos estados brasileiros (Brasil, 2020). A maior taxa de prevalência da doença ocorreu em 2020, com o país alcançando uma taxa de prevalência de 276,36 casos a cada 100 mil habitantes. Os estados com as maiores taxas de prevalência foram Amazonas, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro, caindo em 2022 para 69,56 casos a cada 100 mil habitantes após as campanhas de vacinação em 2021 (**Figura 31**).



**Figura 31. Série histórica da prevalência da COVID-19 por unidade federativa do Brasil. Dados obtidos no (Datusus, 2022).**

A taxa de letalidade da COVID-19 no Brasil se manteve muito alta entre os anos de 2020 e 2021, alcançando um valor máximo de 52,28% no estado do Espírito Santo no ano de 2020. A taxa de letalidade brasileira foi de 31,87% no ano de 2020 e 31,33% no ano de 2021, caindo para 28,23 em 2022 (**Figura 32**), valores muito mais altos que os observados para influenza no mesmo período (**Figura 26**).



**Figura 32. Série histórica da taxa de letalidade da COVID-19 por unidade federativa do Brasil. Dados obtidos no (Datusus, 2022).**

### 10.6 Estrutura Viral e Ciclo de Replicação do COVID-19

A partícula viral do SARS-CoV-2 é formada pelas seguintes proteínas estruturais: Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N) (**Figura 33**). Seu material genético é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva (+ssRNA), que está associado à proteína N.

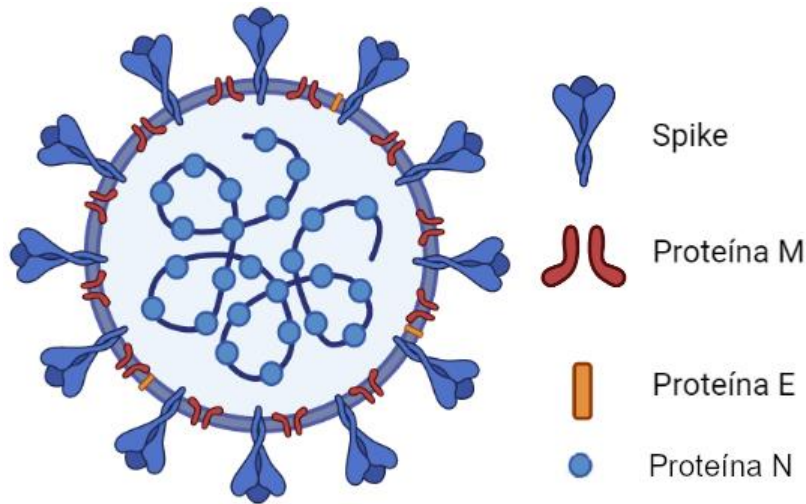
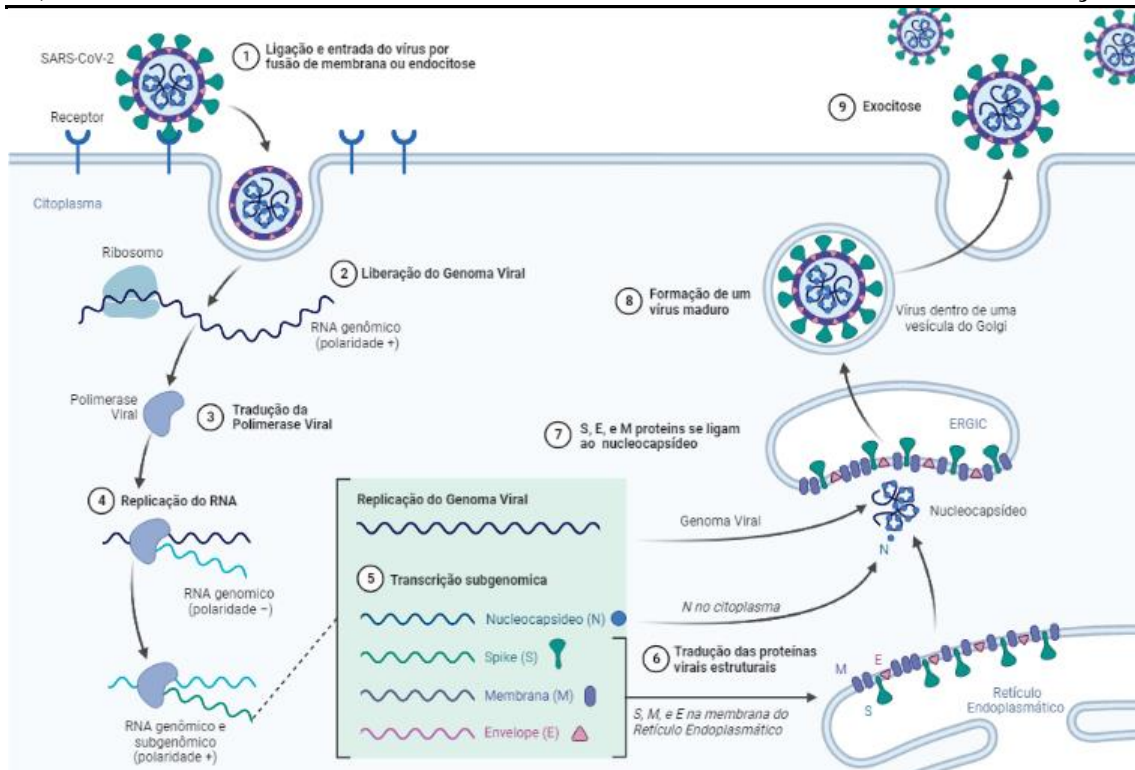


Figura 33. Estrutura do SARS-CoV-2 (Criado com Biorender).

O ciclo de replicação do SARS-CoV-2 se inicia com o reconhecimento da proteína Spike pela serino protease TMPRSS2 que cliva a proteína spike, permitindo seu reconhecimento pela *Angiotensin-Converting Enzyme 2* – ACE2 (seu receptor celular) (Li *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2020; Letko *et al.*, 2020). Esse reconhecimento medeia a fusão da membrana plasmática da célula com a membrana viral e a entrada do vírus na célula. Após a entrada, o RNA é liberado no citoplasma da célula e inicia tradução das ORF1a e ORF1b que são processadas e formam o complexo de replicação e transcrição viral, que é composto por enzimas de transcrição, modificação do RNA e com função de *proofreading*. O processo de replicação viral se inicia com a síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa, que será utilizada como molde para a síntese de fitas de RNA de polaridade positiva. As proteínas estruturais traduzidas, translocam-se para as membranas do retículo endoplasmático (ER) e são transportadas pelo Golgi, onde ocorre a interação com a proteína do capsídeo e com o RNA viral. Após a montagem do vírus ocorre o brotamento por exocitose (**Figura 34**) (V'kovski *et al.*).



**Figura 34. Ciclo de Replicação do SARS-CoV-2 (Criado com Biorender).**

### 10.7 Apresentação Clínica da COVID-19

A COVID-19 possui um grande espectro de severidade, desde infecções assintomáticas até o desenvolvimento de doenças severas e morte. Os sintomas se iniciam em média após um período de 4 dias do contato inicial e 95% dos indivíduos sintomáticos apresentarão sintomas até 14 dias após a exposição (Bi *et al.*, 2020). O RNA viral do SARS-CoV-2 pode se manter detectável por várias semanas (He *et al.*, 2020).

Os sintomas mais comuns são anosmia, hipogeusia, tosse, febre, mialgia, dispneia e dor de cabeça (Brann *et al.*, 2020; Burke *et al.*, 2020; Stokes *et al.*, 2020; Butowt and Von Bartheld, 2021). Complicações extrapulmonares também têm sido descritas para a COVID-19, como dano renal (Robbins-Juarez *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022), trombose (Bohula *et al.*, 2022; Ns *et al.*, 2022; Peacock *et al.*, 2022) e manifestações neurológicas (Chou *et al.*, 2021; Graham *et al.*, 2021; Macintosh *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021; Olivarria *et al.*, 2022).

Entre os fatores de risco associados à severidade da COVID-19 estão as síndromes metabólicas, como obesidade (Cai *et al.*, 2020) e diabetes (Kumar *et al.*, 2020), além de doenças renais (Henry and Lippi, 2020) e cardiopatias (Tan and Aboulhosn, 2020). Pessoas com idade avançada são mais propensas ao desenvolvimento de uma doença mais severa, bem como o desenvolvimento de ARDS (Wu *et al.*, 2020; Zhou, F. *et al.*, 2020).

A COVID-19 é uma doença que não se caracteriza por afetar apenas o trato respiratório, mas diversos estudos têm mostrado que danos renais, neurológicos e metabólicos podem ser associados diretamente à infecção pelo SARS-CoV-2 (Bradley *et al.*, 2020).

### 10.8 Aspectos gerais da resposta imune inata na COVID-19

O pulmão é um órgão vital cuja principal função são as trocas gasosas. Devido à sua função, ele está em constante contato com patógenos transportados pelo ar. Entre as estratégias utilizadas pelo sistema imune para o reconhecimento dos vírus, é o reconhecimento do RNA viral por TLRs endossomais (TLR7, TLR3 e TLR8). Os macrófagos alveolares são células sentinelas presentes no lúmen do trato respiratório e fornecem a primeira linha de defesa. Outra estratégia de defesa é por meio do reconhecimento do RNA viral citosólico por proteínas sensoras como RIG-I e MDA5. Os TLR, TIG-I e MDA induzem a ativação de IRF3/IRF7 e a transcrição de ISGs. O SARS-CoV-2 consegue evadir essa resposta imune inicial pela expressão de algumas proteínas virais que bloqueiam essas vias (Kasuga *et al.*, 2021). Por isso, são descritas baixas quantidades de IFN-I ou IFN-III no pulmão ou no sangue periférico de pacientes infectados com SARS-CoV-2, quando comparado com outras infecções virais (Blanco-Melo *et al.*, 2020; Hadjadj *et al.*, 2020; Galani *et al.*, 2021).

O trato respiratório pode ser dividido em dois componentes: O trato respiratório superior que consiste no nariz externo, cavidade nasal, faringe, laringe e parte superior da traqueia; O trato respiratório inferior que consiste na parte inferior da traqueia, pulmão (brônquio, bronquíolo, alvéolo). No trato respiratório superior prevalece o tecido de mucosa onde a defesa imunológica é realizada principalmente por anticorpos IgA e muco. No trato respiratório superior IFN-III (IFN- $\lambda$ 1 e IFN- $\lambda$ 3) e ISGs estão elevadas nos pacientes com menor risco para o desenvolvimento de uma doença severa e IFN- $\lambda$ 2 e IFN-I (mas não ISGs) estão elevados nos pacientes que evoluem para uma doença severa (Sposito *et al.*, 2021). Durante a fase mais tardia da doença, a secreção prolongada de IFN está associada a um pior prognóstico (Lee *et al.*, 2020; Lucas *et al.*, 2020).

No trato respiratório inferior, não há presença de tecido de mucosa, e a resposta imune é mediada principalmente pelas células residentes nos alvéolos (macrófagos alveolares, células linfoides inatas (ILCs), pneumócitos tipo I, pneumócitos tipo II e células dendríticas (DCs)). Na COVID-19 observamos um grande infiltrado inflamatório no pulmão, possivelmente devido à indução de quimiocinas (Israelow *et al.*, 2020), que é acompanhado por uma redução no número de células dendríticas, células dendríticas



plasmocitóides e células NK no pulmão e no sangue (Lucas *et al.*, 2020; Sanchez-Cerrillo *et al.*, 2020; Witkowski *et al.*, 2021).

### 10.9 Inflamassoma no COVID-19

No pulmão dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 tem sido reportado uma resposta inflamatória descontrolada caracterizada como tempestade de citocinas ou síndrome de liberação de citocinas (Abdin *et al.*, 2020; Polidoro *et al.*, 2020). Essas citocinas são responsáveis por induzir o infiltrado inflamatório pulmonar, intensa inflamação e complicações respiratórias severas como a ARDS (Jiang *et al.*, 2005; Reghunathan *et al.*, 2005; Chen, N. *et al.*, 2020). As citocinas que parecem estar envolvidas com o dano alveolar observado na ARDS são IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Nieto-Torres *et al.*, 2015). Apesar de a tempestade de citocinas observada nos pacientes COVID-19 poder estar relacionada com diversas causas, algumas evidências têm demonstrado que os inflamassomas podem estar envolvidos nesse processo (Abdin *et al.*, 2020; Ratajczak and Kucia, 2020; Sinha *et al.*, 2020; Olajide *et al.*, 2021; Toldo *et al.*, 2021).

No início da pandemia, vários estudos associaram a presença de IL-1 $\beta$ , IL-18 e LDH à COVID-19, entretanto ainda não havia sido demonstrado que o inflamassoma poderia estar de fato envolvido com a doença (Chen, G. *et al.*, 2020; Chi *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Lucas *et al.*, 2020). Em 2021, nosso grupo demonstrou pela primeira vez a ativação do inflamassoma na COVID-19 (Rodrigues *et al.*, 2021). Após este trabalho, vários outros grupos também demonstraram a ativação do inflamassoma na COVID-19 (Ferreira *et al.*, 2021; Toldo *et al.*, 2021; Junqueira *et al.*, 2022; Sefik *et al.*, 2022).

Os mecanismos que levam a ativação do inflamassoma na COVID-19 podem ser vários, entre eles podemos destacar que a proteína Spike (Olajide *et al.*, 2021; Theobald *et al.*, 2021; Olajide *et al.*, 2022), Nucleocapsídeo (Pan *et al.*, 2021), Envelope (Yalcinkaya *et al.*, 2021), ORF3a (Siu *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2022) e ORF8b do SARS-CoV-1 (Shi *et al.*, 2019) ativam o inflamassoma de NLRP3, induzem a secreção de IL-1 $\beta$ , piroptose e danos pulmonares.

## 11. JUSTIFICATIVA

Os vírus influenza e os coronavírus epidêmicos são os agentes virais mais frequentes da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Entre 2019 e 2021, houve 53.000.000 casos sintomáticos de gripe com aproximadamente 20.000 mortes nos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention 2021) e mais de 255.000.000 casos confirmados e 55.127.000 mortes causadas pelo *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) em todo o mundo (WHO, 2020a). A SDRA grave é caracterizada por grande envolvimento pulmonar, desconforto respiratório, trombose sistêmica e óbito (Polak *et al.*, 2020; Batah and Fabro, 2021; Bösmüller *et al.*, 2021).

A ativação do inflamassoma de NLRP3 foi descrita tanto em infecções por influenza (Allen *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009; Ichinohe *et al.*, 2010; Boal-Carvalho *et al.*, 2020; Moriyama *et al.*, 2020) quanto por SARS-CoV-2 (Lucas, 2020; Cama *et al.*, 2021; Einfeld *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021; Junqueira *et al.*, 2022; Sefik *et al.*, 2022), e esse processo contribui para inflamação excessiva e um pior desfecho clínico. O recrutamento de células imunes para os pulmões de indivíduos infectados leva à liberação excessiva de citocinas, que causam danos estruturais aos pulmões (Kommoss *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). Além disso, as principais patologias pulmonares relatadas na COVID-19 grave incluem dano alveolar difuso (DAD), pneumonia em organização fibrinóide aguda (AFOP) e pneumonia intersticial crônica (Polak *et al.*, 2020; Sauter *et al.*, 2020; Batah and Fabro, 2021; Bösmüller *et al.*, 2021). A ativação do inflamassoma de NLRP3 também ocorre no parênquima pulmonar desses pacientes (Rodrigues *et al.*, 2021; Toldo *et al.*, 2021). Para influenza, as principais patologias pulmonares relatadas incluem dano alveolar difuso, além de bronquite necrosante, bronquiolite e fibrose (Taubenberger and Morens, 2008). No entanto, ainda não se sabe como a ativação do inflamassoma está relacionada ao processo inflamatório exacerbado nas células do parênquima pulmonar humano durante infecções virais como influenza e SARS-CoV-2.

## 12. OBJETIVOS

### 12.1 *Objetivo Geral*

Entender qual mecanismo torna a COVID-19 uma doença mais letal que a influenza.

### 12.2 *Objetivos Específicos*

#### **i) Avaliar se a ativação do inflamassoma está associada à severidade da COVID-19 e da Influenza**

**Racional:** O SARS-CoV-2 é similar ao vírus da influenza em vários aspectos, como transmissão, ser um vírus de RNA e sintomas clínicos semelhantes em humanos (Manzanares-Meza and Medina-Contreras, 2020). Apesar disto, o COVID-19 pode ser significativamente mais grave em indivíduos não vacinados (Manzanares-Meza and Medina-Contreras, 2020; Godaert *et al.*, 2021; Fröhlich *et al.*, 2022; Taniguchi *et al.*, 2022) e os mecanismos envolvidos neste processo não são conhecidos. Trabalhos publicados anteriormente mostraram que a ativação exacerbada do inflamassoma medeia a patologia do COVID-19 (Rodrigues *et al.*, 2021; Junqueira *et al.*, 2022; Sefik *et al.*, 2022), isso nos levou a comparar a ativação do inflamassoma em pacientes com COVID-19 com influenza. Avaliamos se a ativação do inflamassoma e o perfil de células que ativam o inflamassoma pode explicar essas diferenças encontradas nas duas doenças.

#### **ii) Avaliar quais características clínicas e laboratoriais estão associadas à evolução clínica e o desfecho final dos pacientes COVID-19 e influenza**

**Racional:** Uma vez caracterizado, o perfil de ativação do inflamassoma entre os pacientes COVID-19 e influenza, pretendemos avaliar se características clínicas, laboratoriais e evolução dos pacientes se correlacionam com o perfil inflamatório e de ativação do inflamassoma.

## 13. MATERIAL E MÉTODOS

### 13.1 Amostras

Autópsias minimamente invasivas foram realizadas em 47 pacientes diagnosticados com SARS-CoV-2 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil (Ribeirão Preto, SP, Brasil) de abril a julho de 2020, pelo Serviço de Patologia (SERPAT). As autópsias minimamente invasivas foram feitas à beira do leito por meio de biópsias pulmonares cirúrgica pós-morte por uma agulha de corte de calibre 14 (Magnum Needles, Bard) e uma pistola de biópsia (Magnum, Bard). Além disso, uma incisão de 3 cm no lado mais afetado do tórax entre a quarta e quinta costelas também foi usada para fornecer tecido pulmonar extra. Todas as amostras de tecido foram incluídas em parafina e fixadas em formalina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). Os tecidos pulmonares de autópsias de pacientes diagnosticados com Influenza (n=12) que faleceram entre os anos de 2012 a 2020 e biópsias de pacientes com Adenocarcinoma de Pulmão (n=5) foram obtidos no SERPAT. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP/USP sob protocolo nº 4.089.567.

### 13.2 Imuno-histoquímica (IHC)

Foi realizado imuno-histoquímica nos tecidos armazenados em parafina, utilizando anticorpos para a detecção de NLRP3 (clone D2P5E; 1:3.000; Cell Signaling), ASC (1:2.000; Adipogen AL177), SFTPC (1:200, ThermoFisher PA5-71680), CD68 (1:200, Dako M0814), CD34 (1:500, Zeta Z2063ML), PDPN (1:200, ThermoFisher 14-9381-82), THY-1 (1:300, Sigma SAB4200497), anti-GSDMD N-terminal clivado (1:200, Abcam ab215203), Caspase-1 (1:200, Abcam ab207802), IL-1 $\beta$  (1:200, Abcam ab2105) para a detecção *in situ* dessas proteínas do inflamassoma. A técnica de *Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing* (SIMPLE) foi utilizada para avaliar todos os marcadores no mesmo tecido, conforme publicado anteriormente (Glass *et al.*, 2009).

Resumidamente, após a incubação com anticorpo primário (durante a noite a 4°C), as lâminas foram incubadas com immune peroxidase polymer anti-mouse (SPD-125, Spring Bioscience, Biogen) e com chromogen-substrate AEC peroxidase system kit (SK-4200, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Após scanear as lâminas com microscopia de alta resolução no microscópio VS120 Olympus, as lamínulas foram removidas em PBS

e as lâminas foram incubadas em uma série de etanol para apagar a marcação AEC. Em seguida, as lâminas foram reidratadas e os anticorpos foram removidos com uma incubação por 2 min em uma solução de 0,15 mM KMnO<sub>4</sub>/0,01 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seguido imediatamente por uma lavagem em água destilada. Os tecidos foram, então, remarcados.

### 13.3 Imunofluorescência

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, anti-NLRP3 humano (clone D2P5E; 1:300; Cell Signaling), anti-ASC humano (1:200; Adipogen AL177), anti-SFTPC (1:200, ThermoFisher PA5-71680), anti-CD64 (1:200, Biolegend 139304), anti-CD34 (1:500, Zeta Z2063ML), anti-PDPN (1:200, ThermoFisher 14-9381-82), overnight a 4°C e com os anticorpos secundários Alexa fluor-647 (Invitrogen) ou Alexa fluor-594 (Invitrogen). As imagens foram adquiridas pelo sistema Axio Observer combinado com o microscópio do dispositivo confocal LSM 780 com ampliação de 63x (Carl Zeiss).

### 13.4 Avaliação Histológica

Cortes de tecidos pulmonares embebidos em parafina (3 µm) foram corados por hematoxilina e eosina (H&E). Os padrões morfológicos de lesão pulmonar foram avaliados por patologista pulmonar especializado (ATF) cegos para a história clínica. Fibrose, Pneumonia em Organização (OP), Pneumonia Aguda Fibrinosa e Organizante (AFOP), Dano Alveolar Difuso (DAD), Pneumonite e formação de trombo foram classificados como ausentes ou presentes e foi analisada a extensão da área da lesão pulmonar, com um ponto de corte de 5%.

### 13.5 Extração de RNA

O RNA das amostras de influenza e respectivos controles foram extraídos de amostras de tecido embebidas em parafina. As amostras foram cortadas em 3 seções de 10 µm e colocadas em tubos Eppendorf de 2,0 ml sem RNase. Os cortes foram desparafinizados por incubação em 0,8 ml de xileno durante 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas, o sobrenadante foi removido e foi adicionado xileno fresco para uma segunda incubação. Após a desparafinização e centrifugação, os cortes foram lavados com 0,8 ml de etanol, secos ao ar por vários minutos e ressuspensos em 25 µl de 20 mg/ml de Proteinase K (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) mais 720 µl de tampão de digestão com as seguintes concentrações finais: 20mM TRIS-HCl pH8, 10mM EDTA pH8, 1% de SDS. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas *overnight* a 55 °C a

400 rpm. Uma segunda alíquota de 25 µl de 20 mg/ml de Proteinase K foi então adicionada, seguida de vórtex e incubação por 2h a 55 °C. O RNA foi obtido por extração com 1 mL do reagente Trizol e a purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA total de tecido pulmonar fresco de pacientes com SARS-CoV-2 e respectivos controles foi obtido usando o reagente Trizol e a purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA foi quantificado por espectrofotometria em espectrofotômetro NanoDrop 2000c. A concentração foi ajustada para 1 µg/µL e o RNA foi armazenado a -70 °C até a transcrição reversa.

### *13.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para genes inflamatórios*

Para análise de expressão gênica dos genes inflamatórios, o RNA total foi transcrito em DNA complementar (cDNA) usando High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (sem inibidor) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Thermo Fisher, EUA). A reação foi preparada em um volume final de 20,0 µL contendo 4,2 µL de H<sub>2</sub>O, 2,0 µL de tampão, 2,0 µL de primers randômicos, 0,8 µL de Mix de dNTP (100 mM), 1,0 µL de enzima transcriptase reversa (RT) e 1 µL de RNA (1 ug/µL). A solução foi, então, colocada em termociclador com o seguinte programa: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min.

A PCR em tempo real foi realizada em placas de 96 poços utilizando reagentes Sybr Green (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) no termociclador Quant studio (Applied Biosystems, EUA). O PCR em tempo real foi realizado em um volume total de 20 µl em uma placa de 96 poços MicroAmp Fast Optical (Applied Biosystems). Cada poço continha 10 µl de SYBR Green qPCR Master Mix (Thermofisher), 1 µl de cada primer (Tabela Complementar 1), 2 µl de cDNA (20 ng) e 7 µl de água livre de RNase usando o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s seguido de anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. Cada PCR foi seguido por uma análise da curva de melting entre 60-95 °C. Os valores de Ct foram analisados pelo método comparativo de Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) e normalizados para o controle endógeno GAPDH. As diferenças de expressão gênicas foram normalizadas pela expressão  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### *13.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real para RNA viral*

A detecção e quantificação de genes do SARS-CoV-2 foi realizada com conjuntos de sonda e primer para 2019-nCoV\_N2 e gene E, de acordo com o protocolo do Centros dos EUA para Controle e Prevenção de Doenças (Lu *et al.*, 2020) e protocolos do grupo Charité (Corman *et al.*, 2020). Os genes avaliados (N2, E gene housekeeping RNase-P) foram testados por RT-PCR em tempo real de uma etapa usando RNA total extraídos com TRIzol (Invitrogen). Todos os ensaios de PCR em tempo real foram feitos no termociclador Quant studio (Applied Biosystems, EUA). Um total de 70 ng de RNA foi usado para amplificação do genoma, adicionando primers específicos (20 µM), sonda (5 µM), e TaqPath 1-Step RT-PCR Master Mix quantitativo (Applied Biosystems), com os seguintes parâmetros: 25 °C por 2 min, 50 °C por 15 min, e 95 °C por 2 min, seguido de 45 ciclos de 94 °C por 5 s e 60 °C por 30 s.

Os primers utilizados foram os seguintes: N2 direto: 5'-TTACAAACATTGGCCGCAA-3', N2 reverso: 5'-GCGCGACATTCCGAAGAA-3'; sonda N2: 5'-FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1-3'; E direto: 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3', E reverso: 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3'; sonda E: 5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ-1-3'; RNase-P direto: 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3', RNase-P reverso: 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'; e sonda RNase-P: 5'-FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1-3'.

Um plasmídeo de proteína N2 e proteína E foi usado para uma construção de curva padrão para quantificação de carga viral.

### *13.8 Aquisição e avaliação de imagens de tomografia computadorizada de tórax*

Exames de radiografia de tórax (CXR) e tomografia computadorizada (TC) de tórax foram realizados como parte da avaliação clínica de rotina. As radiografias de tórax foram realizadas em equipamentos convencionais, principalmente na incidência anteroposterior. Imagens de TC foram realizadas em scanners multidetectores (Brilliance CT Big Bore 16 - Philips, Holanda, ou Aquilion Prime 160 - Toshiba, Japão), utilizando protocolos semelhantes para a aquisição de imagens de alta resolução dos pulmões (Raghu *et al.*, 2018). Os pacientes foram escaneados em decúbito dorsal sem a administração de meios de contraste intravenosos. Os parâmetros de aquisição típicos foram: tensão do tubo de 120 kVp, 100–140 ref mAs (Koenigkam-Santos *et al.*, 2022),

tempo de rotação do gantry de 0,3–0,7 s, tamanho da matriz de reconstrução de 512 × 512, espessura do corte e incremento de 1,0 mm, usando padrão (soft) e filtros de kernel rígido. Os exames de imagem foram avaliados independentemente por dois radiologistas torácicos (MKS e DTW), cegos aos dados clínicos, laboratoriais e resultados de patologia conforme descrito (Koenigkam-Santos *et al.*, 2022). As divergências foram resolvidas por consenso. Todos os CXRs disponíveis foram classificados quanto à presença e grau de pneumonia viral (Revel *et al.*, 2020). A evolução da doença pulmonar na imagem foi avaliada considerando todos os exames desde a imagem inicial até a última imagem antes do óbito. As imagens tomográficas foram avaliadas de forma semelhante às imagens de CXR.

### 13.9 Análise Estatística

Para quantificação de puncta, todos os cortes histológicos foram visualizados em uma objetiva de 63x para digitalização de imagens aleatórias usando o sistema LSM 780 no microscópio Axio Observer, cobrindo uma área de cerca de ~1,7 mm<sup>2</sup> do parênquima pulmonar analisado por caso. A contagem manual de puncta e células foi cega e realizada usando as imagens adquiridas. As análises morfométricas foram realizadas conforme descrito (Weibel, 1963).

A quantificação da expressão por imunohistoquímica foi realizada calculando a porcentagem de área marcada, as imagens digitalizadas foram abertas no software ImageJ, utilizando o plugin IHQ Toolbox, que consiste em uma ferramenta de seleção de cores semiautomática que seleciona os pixels positivos para marcação imunohistoquímica, diferenciando-as da marcação de fundo e H&E, após selecionar os pixels positivos, as imagens foram transformadas em 8 bits e a área ocupada por esses tons foi calculada.

A distribuição dos dados de expressão gênica, marcadores bioquímicos e contagem de puncta foi avaliada quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk; os dados foram analisados utilizando testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e correlação de Spearman. Os dados foram apresentados em gráficos com média e desvio padrão. Foram realizadas análises estatísticas usando o programa GraphPad PRISM 5.0, com  $p < 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

Os heatmaps foram construídos usando a função heatmap.2 no programa R (versão 3.4.1).



## 14. RESULTADOS

### *14.1 Casos letais de COVID-19 desenvolvem síndrome do desconforto respiratório agudo grave (SDRA) e maior ativação do inflamassoma no parênquima pulmonar do que pacientes com influenza*

Avaliamos a ativação do inflamassoma no parênquima pulmonar de 47 pacientes que morreram de SARS-CoV-2 entre abril e julho de 2020. Esses pacientes foram infectados com a cepa ancestral de SARS-CoV-2 antes do aparecimento das variantes do COVID-19 e antes do uso de vacinas. Nós também avaliamos 12 pacientes que morreram de influenza antes da pandemia de COVID-19. Como controle não infectado, avaliamos a ativação do inflamassoma em biópsias da área benigna dos pulmões de pacientes que morreram por adenocarcinoma pulmonar. Os dados da **Tabela 3** mostram as características demográficas e clínicas dos pacientes com influenza e COVID-19. Os pacientes com COVID-19 tiveram uma idade média maior (67,97 anos) do que os pacientes com gripe (41,5 anos). A maioria dos pacientes com influenza estava infectada com o subtipo A H1N1 (41,66%), mas também com os subtipos A H3N2 (16,66%) e B (16,66%). Além disso, de acordo com os dados observados nos casos de COVID-19 ocorridos em 2020 (pacientes infectados com a cepa ancestral Wuhan de SARS-CoV-2), descobrimos que os pacientes com COVID-19 apresentaram maior frequência de comorbidades como hipertensão, em além de ter (em média) obesidade grau 1 (IMC: 31,10). Além disso, pacientes com influenza e COVID-19 (em média) exibiram valores alterados de PCR, dímeros D, LDH, creatinina, ureia, AST, ALT, PT (INR) e níveis de glicose no sangue. Além disso, os pacientes com influenza apresentaram um quadro fulminante de SDRA e faleceram (em média) em menos de 24 horas após procurarem os serviços de saúde. Em contrapartida, os pacientes com COVID-19 tiveram um tempo médio de doença de 18 dias, e a grande maioria (76,59%) dos pacientes fez uso de Ventilação Mecânica (VM), com média de 12,38 dias de uso de ventilação mecânica. Além disso, os pacientes com COVID-19 tiveram uma condição respiratória mais grave do que os pacientes com influenza, com  $P_{aO_2}$  e  $P_{aO_2}/FiO_2$  consideravelmente alterados, caracterizando uma condição de SDRA moderada a grave (**Tabela 3**). Consistente com os estados respiratórios dos pacientes, as análises histopatológicas de pacientes com COVID-19 demonstraram uma fase fibrótica mais alta de DAD, OP e pneumonite do que as de pacientes com influenza (**Figura 37A-C**).

Tabela 3. Características dos pacientes influenza e COVID-19

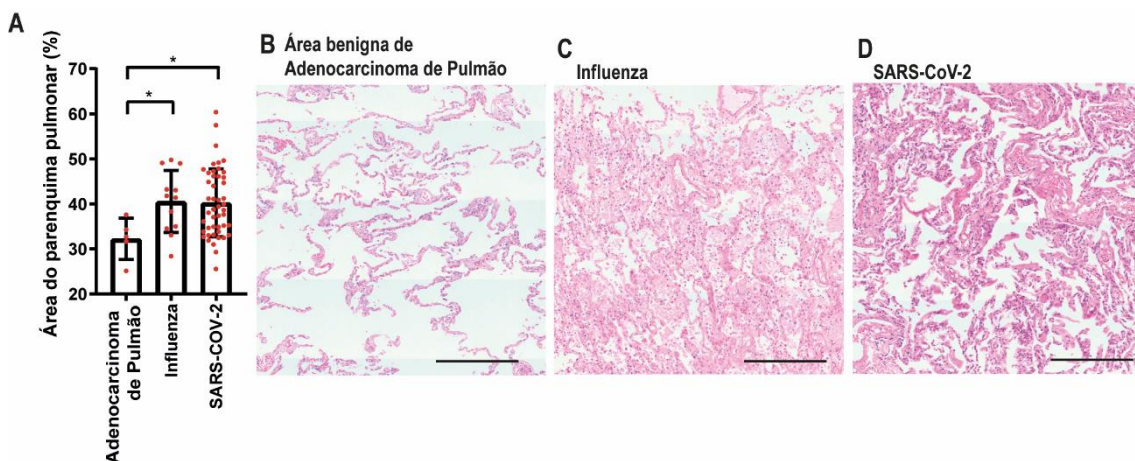
Características Demográficas	Influenza Média ( $\pm$ SD) ou N (%)	SARS-CoV-2 Média ( $\pm$ SD) ou N (%)	Valor de p
N	12	47	
Gênero			
Feminino	4 (33.33%)	23 (48.93%)	0.5177*
Masculino	8 (66.66%)	24 (51.06%)	
Idade (anos)	41.5 (15.24 $\pm$ )	67.97 (15.05 $\pm$ )	<0.0001**
Tempo de doença (dias)	-	18.08 (11.04 $\pm$ )	-
CTI	4 (33.33%)	37 (78.72%)	0.0045*
Influenza A (H1N1)	5 (41.66%)	-	-
Influenza A (H3N2)	2 (16.66%)	-	-
Influenza A não subtipado	3 (25.00%)	-	-
Influenza B	2 (16.66%)	-	-
<b>Comorbidades</b>			
Hipertensão	2 (16.66%)	26 (55.32%)	0.0233*
IMC	-	31.10 ( $\pm$ 8.82)	-
Diabetes	3 (25.00%)	18 (38.29%)	0.5092*
Fumante	0 (0.00%)	12 (25.53%)	0.1012*
Doenças Cardíacas	2 (16.66%)	12 (25.53%)	0.7119*
Doenças Pulmonares	1 (8.33%)	12 (25.53%)	0.2679*
Doença Renal	0 (0.00%)	7 (14.89%)	0.3255*
Histórico de AVC	0 (0.00%)	7 (14.89%)	0.3255*
Doença autoimune	0 (0.00%)	2 (4.25%)	>0.9999*
<b>Achados Laboratoriais</b>			
Proteína C-Reativa (mg/dL)	22.55 ( $\pm$ 12.66)	11.40 ( $\pm$ 8.49)	0.0061**
Dímero D ( $\mu$ g/mL)	-	4.91 ( $\pm$ 4.46)	-
LDH (mmol/L)	5.18 ( $\pm$ 3.91)	5.01 ( $\pm$ 5.24)	0.9443**
Creatinina (mg/dL)	4.59 ( $\pm$ 2.41)	2.22 ( $\pm$ 1.4)	0.0008**
Ureia (mg/dL)	140 ( $\pm$ 64.07)	119.40 ( $\pm$ 58.47)	0.4247**
AST (IU/L)	228 ( $\pm$ 235.06)	104.42 ( $\pm$ 90.74)	0.0174**
ALT (IU/L)	38.2 ( $\pm$ 32.12)	72.12 ( $\pm$ 55.14)	0.2012**
AST/ALT	3.99 ( $\pm$ 2.66)	1.8 ( $\pm$ 1.60)	0.0115**
Tempo de Protrombina (INR)	1.44 ( $\pm$ 0.65)	1.81 ( $\pm$ 2.13)	0.6765**
Albumina (g/dL)	3.02 ( $\pm$ 1.36)	3.09 ( $\pm$ 0.58)	0.8327**
Glicemia (mg/dL)	181.2 ( $\pm$ 105.58)	194.72 ( $\pm$ 94.60)	0.7656**
<b>Perfil Respiratório</b>			
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	38.14 ( $\pm$ 2.58)	37.39 ( $\pm$ 1.73)	0.3833**
Ventilação Mecânica	0.00 (0.00%)	36 (76.59%)	<0.0001*
Oxigenação por cânula nasal	4 (33.33%)	11 (23.40%)	>0.9999*
Tempo de intubação (dias)	0.30 ( $\pm$ 0.57)	12.38 ( $\pm$ 7.14)	0.0004**
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> (mmhg)	103.61 ( $\pm$ 35.98)	74.01 ( $\pm$ 24.63)	0.0112**
Saturação Venosa (S <sub>v</sub> O <sub>2</sub> )	74.54 ( $\pm$ 9.23)	67.58 ( $\pm$ 25.34)	0.5477**
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <sup>#</sup>	476.85 ( $\pm$ 257.13)	159.69 ( $\pm$ 90.84)	<0.0001**
Gradiente de A-a O <sub>2</sub> <sup>#</sup>	157.73 ( $\pm$ 294.00)	283.22 ( $\pm$ 208.31)	0.3988**
Frequência Respiratória (mov/min)	24.40 ( $\pm$ 9.07)	26.55 ( $\pm$ 6.80)	0.4764**
<b>Achados Histopatológicos</b>			
Fibrose (% de área)	1.66 ( $\pm$ 5.77)	30.00 ( $\pm$ 12.68)	<0.0001**
Pneumonia em Organização (% de área)	4.16 ( $\pm$ 14.43)	10.74 ( $\pm$ 14.89)	0.0437**
Pneumonia Aguda Fibrinosa e Organizante (% de área)	8.33 ( $\pm$ 15.27)	6.91 ( $\pm$ 12.49)	0.9052**
Dano Alveolar Difuso (% de área)	37.5 ( $\pm$ 37.44)	17.87 ( $\pm$ 21.05)	0.1419**
Pneumonite (% de área)	1.66 ( $\pm$ 3.89)	22.57 ( $\pm$ 15.34)	<0.0001**
Infarto Pulmonar (% de área)	8.33 ( $\pm$ 13.37)	3.404 ( $\pm$ 9.618)	0.1363**

\* Teste exato de Fisher

\*\* Teste t

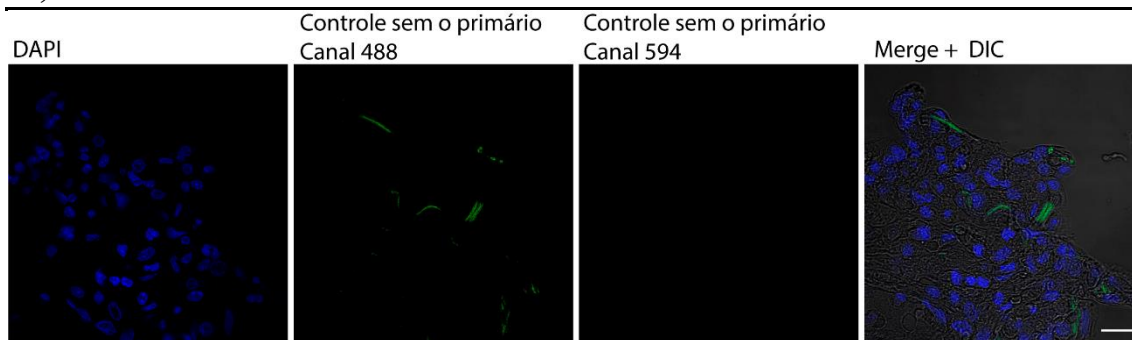
# dado após 18 dias de hospitalização

Para analisar as características histológicas dos pulmões dos pacientes, medimos a área do parênquima pulmonar nos cortes histológicos. Observamos que os pacientes que morreram de SARS-CoV-2 e influenza tinham uma área de parênquima pulmonar muito maior do que os pacientes com adenocarcinoma, mas nenhuma diferença foi encontrada quando comparamos influenza versus COVID-19, apoiando a hipótese de que ambas as infecções virais desencadeiam um robusto infiltrado inflamatório no pulmão em casos graves da doença (**Figura 35A-D**). Esses dados estão de acordo com achados histopatológicos que mostram intenso processo inflamatório em pacientes que morreram por SARS-CoV-2 e influenza (Batah and Fabro, 2021; Hariri *et al.*, 2021).



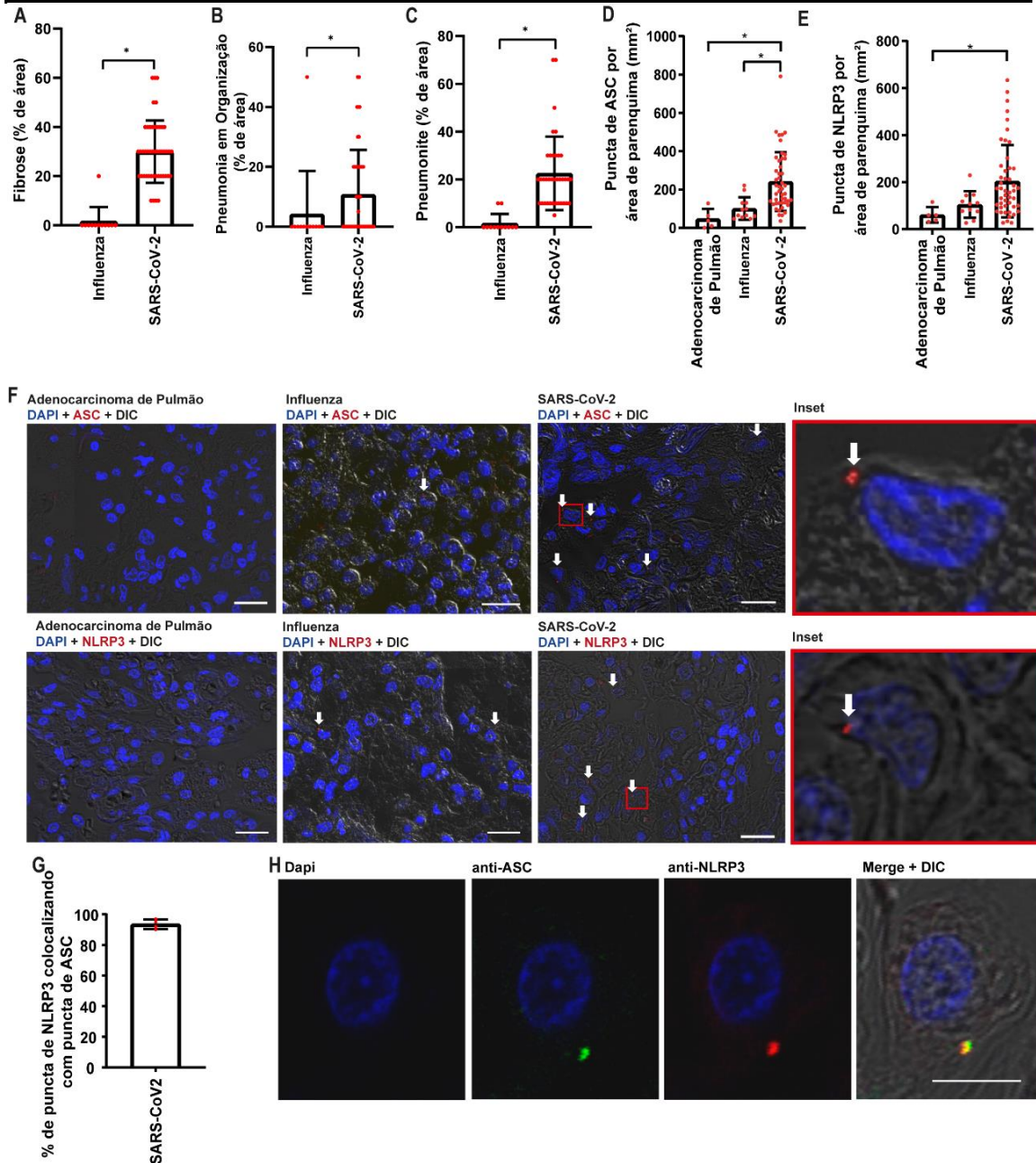
**Figura 35. Pacientes com Influenza e SARS-CoV-2 possuem maior área de parênquima pulmonar.** (A-D) Proporção da área do parênquima pulmonar de pacientes com COVID-19, Influenza e adenocarcinoma (área benigna dos pulmões). (B-D) Imagens representativas da coloração H&E mostrando o parênquima pulmonar. Barras de escala 200 µm.

Para avaliar a ativação do inflamassoma nos pulmões de pacientes com COVID-19 e influenza, foi escaneada uma área de aproximadamente 1,7mm<sup>2</sup> nos cortes histológicos usando microscopia 2-fóton. A área do parênquima foi calculada usando o software ImageJ, e a ativação do inflamassoma foi contada manualmente pela presença de puncta de NLRP3 ou de ASC (Hauenstein *et al.*, 2015). A área do parênquima foi utilizada para normalizar todas as contagens entre os pacientes. Na **Figura 36** estão podemos observar imagens representativas dos controles dos anticorpos utilizados.



**Figura 36. Controle do anticorpo primário para o canal 488 e 594.** Microscopia multifotônica de biópsias pulmonares de um paciente com COVID-19. Os tecidos foram corados com anticorpo secundário para os canais 488 e 594. Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .

Observamos que pacientes com infecção por SARS-CoV-2 tiveram mais inflamassomas ativos (medidos por puncta de ASC e NLRP3) do que pacientes com influenza e o grupo controle com adenocarcinoma de pulmão (**Figura 37D-E**). Imagens representativas de puncta de ASC e NLRP3 nos pulmões dos pacientes são mostradas (**Figura 37F**). Nós observamos a co-localização de ASC em quase todos os puncta de NLRP3, confirmando assim que os puncta que foram abundantemente encontradas nos pulmões dos pacientes são de fato o inflamassoma NLRP3/ASC (**Figura 37G-H**). Coletivamente, esses dados indicam que os pacientes com COVID-19 têm maior ativação do inflamassoma do que os pacientes com influenza e que esses pacientes evoluíram para uma fase fibrótica de DAD, OP e pneumonite.

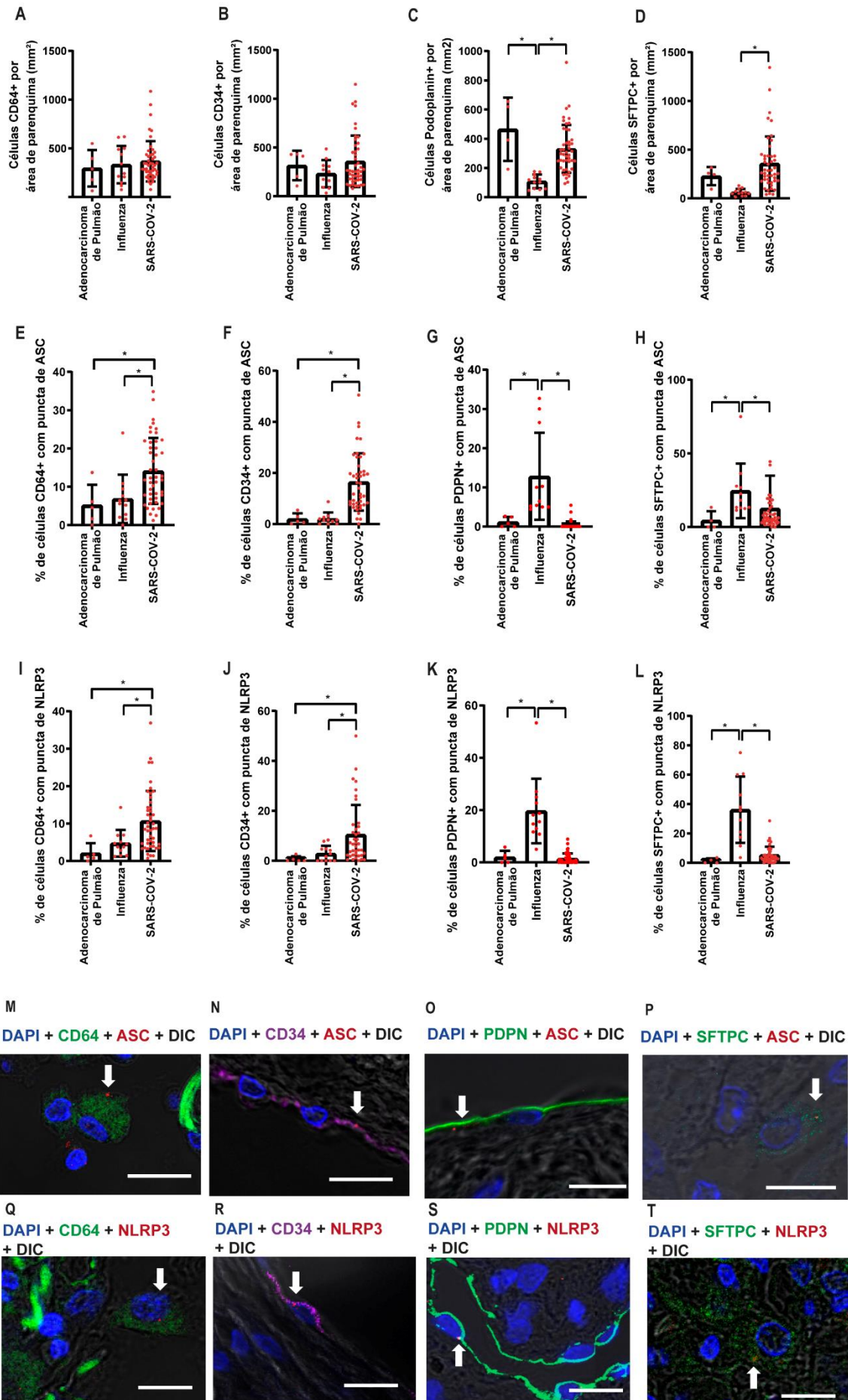


**Figura 37. Padrões histopatológicos e ativação do inflamassoma em autópsia pulmonar de pacientes com COVID-19 e influenza.** Análise histopatológica de casos letais de pacientes com COVID-19 e Influenza. (A-G) Análise histológica de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para a presença de fibrose (A), pneumonia em organização (B) e pneumonite (C). (F-H) Análise de microscopia multifotão de autópsias pulmonares de 47 pacientes com COVID-19, 12 pacientes com gripe e 5 pacientes com adenocarcinoma de pulmão. Os tecidos foram corados com anti-ASC ou anti-NLRP3 (F, G) para quantificação de células com ativação do inflamassoma (presença de puncta) em autópsias pulmonares (em vermelho, indicadas por setas brancas). DAPI cora os núcleos das células (azul). As inserções indicam uma maior ampliação da região indicada (retângulo vermelho). Barras de escala 20  $\mu$ m. (L) Porcentagem de colocalização dos puncta de NLRP3 e ASC nos pulmões de cinco pacientes com COVID-19. (M) Imagens representativas mostrando a colocalização de ASC (verde) e NLRP3 (vermelho). Barra de escala 10  $\mu$ m. Cada ponto na figura representa o valor obtido de cada indivíduo. \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste de Mann-Whitney (A-E) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (F). As imagens foram adquiridas por microscópio multifotão usando uma objetiva 63x e analisadas usando o software ImageJ.

#### 14.2 O perfil celular de ativação do inflamassoma difere em casos letais de COVID-19 e influenza

Para investigar de forma abrangente os tipos de células que atuam na infecção por influenza e por SARS-CoV-2, analisamos a presença de macrófagos (CD64<sup>+</sup>), células endoteliais (CD34<sup>+</sup>), pneumócitos tipo 1 (PDPN<sup>+</sup>, Podoplanin<sup>+</sup>) e pneumócitos tipo 2 (SFTPC<sup>+</sup>) nos pulmões dos pacientes. Descobrimos que as contagens totais de macrófagos e células endoteliais não foram diferentes entre os pacientes com COVID-19 e influenza e também foram semelhantes aos observados na área benigna do adenocarcinoma do pulmão (**Figura 38A, B**). No entanto, observamos que os pacientes que morreram de influenza tinham menos pneumócitos tipo 1 e pneumócitos tipo 2 (**Figura 38C, D**), o que é consistente com dados que indicam que o vírus influenza infecta preferencialmente pneumócitos tipo 1 e tipo 2 do que macrófagos e promove a morte dessas células devido ao processo de replicação viral (Weinheimer *et al.*, 2012).

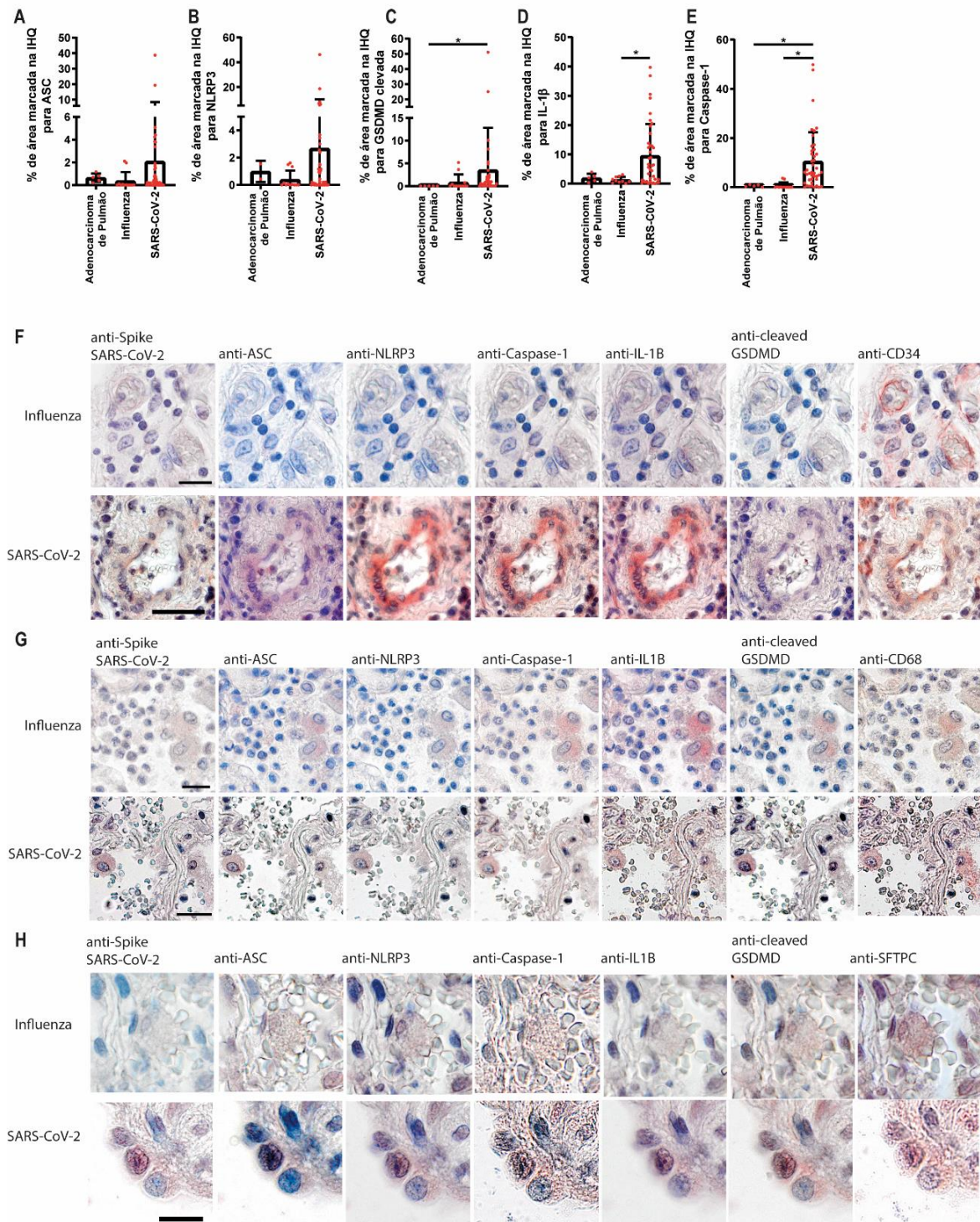
Em seguida, avaliamos a participação dessas células na ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em macrófagos (CD64<sup>+</sup>), células endoteliais (CD34<sup>+</sup>), pneumócitos tipo 1 (PDPN<sup>+</sup>) e pneumócitos tipo 2 (SFTPC<sup>+</sup>). Nós observamos que nos pulmões de pacientes com COVID-19, tanto os puncta de ASC quanto NLRP3 foram mais abundantes em macrófagos (**Figura 38E, I**) e células endoteliais (**Figura 38F, J**) do que em pacientes com influenza. Em contraste, na avaliação dos pneumócitos tipo 1 e tipo 2, descobrimos que os puncta de ASC e NLRP3 foram mais observados nos pulmões de pacientes com influenza do que em pacientes com COVID-19 (**Figura 38G, H, K, L**). Imagens representativas de puncta de ASC e NLRP3 em macrófagos, células endoteliais e pneumócitos tipo 1 e tipo 2 são mostradas na **Figura 38M-T**. Juntos, esses dados demonstram pela primeira vez que tipos distintos de células pulmonares podem desencadear a ativação do inflamassoma na influenza e COVID-19; Além disso, esses dados indicam uma contribuição principal dos macrófagos e células endoteliais para a ativação do inflamassoma durante a infecção por SARS-CoV-2 e pneumócitos tipo I e II para a ativação do inflamassoma na infecção pelo influenza. A magnitude da ativação do inflamassoma e os diferentes perfis celulares da ativação do inflamassoma entre o COVID-19 e a influenza podem contribuir para explicar a maior ativação do inflamassoma encontrado no COVID-19 em comparação com a influenza.



**Figura 38. Macrófagos, células endoteliais e pneumócitos contribuem para a ativação do inflamassoma nos pulmões de pacientes com COVID-19 e influenza.** Análise de microscopia multifotôn de autópsias pulmonares de 47 pacientes com COVID-19, 12 pacientes com influenza e 5 pacientes com adenocarcinoma de pulmão (área benigna dos pulmões). **(A-D)** Quantificação de macrófagos (CD64+, **A**), células endoteliais (CD34+, **B**), pneumócitos tipo I (PDPN+, **C**) e pneumócitos tipo II (SFTPC+, **D**) normalizados por área de parênquima pulmonar. **(E-L)** Porcentagem de células CD64+ (**E, I**), CD34+ (**F, J**), PDPN+ (**G, K**) e SFTPC+ (**H, L**) contendo puncta de ASC (**E-H**) ou NLRP3 (**I-L**). Cada ponto nas figuras representa o valor obtido de cada indivíduo. \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste de Kruskal-Wallis. **(M-T)** Imagem representativa de puncta de ASC (**M-P**) ou NLRP3 (**Q-T**) (em vermelho; indicado por setas brancas) em células CD64+ (em verde; **M, Q**), CD34+ (em rosa; **N, R**), PDPN+ (em verde ; **O, S**) e células SFTPC+ (em verde; **P, T**) de uma autópsia pulmonar de um paciente com COVID-19. DAPI cora os núcleos das células (azul). Barras de escala 10  $\mu\text{m}$ . As imagens foram adquiridas por microscopia multifotôn usando uma objetiva de 63x e analisadas usando o software ImageJ.

Posteriormente, realizamos análises imuno-histoquímicas do parênquima pulmonar para avaliar a expressão dos componentes do inflamassoma e observamos expressão variável de NLRP3, ASC, GSDMD clivado, IL-1 $\beta$  e caspase-1 na COVID-19 e influenza (**Figura 39A-E**). Para avaliar quais células do parênquima pulmonar expressavam esses componentes do inflamassoma, avaliamos a expressão de ASC, NLRP3, caspase-1, GSDMD clivado e IL1 $\beta$  em células endoteliais (CD34<sup>+</sup>), macrófagos (CD68<sup>+</sup>) e pneumócitos tipo 2 (SFTPC<sup>+</sup>) por imuno-histoquímica (**Figura 39F-H**). Também coramos esses tecidos com anti-Spike de SARS-CoV-2 e descobrimos que células endoteliais, macrófagos e pneumócitos tipo 2 infectados expressaram ASC, NLRP3, Caspase-1 e IL-1 $\beta$  (**Figura 39F-H**).

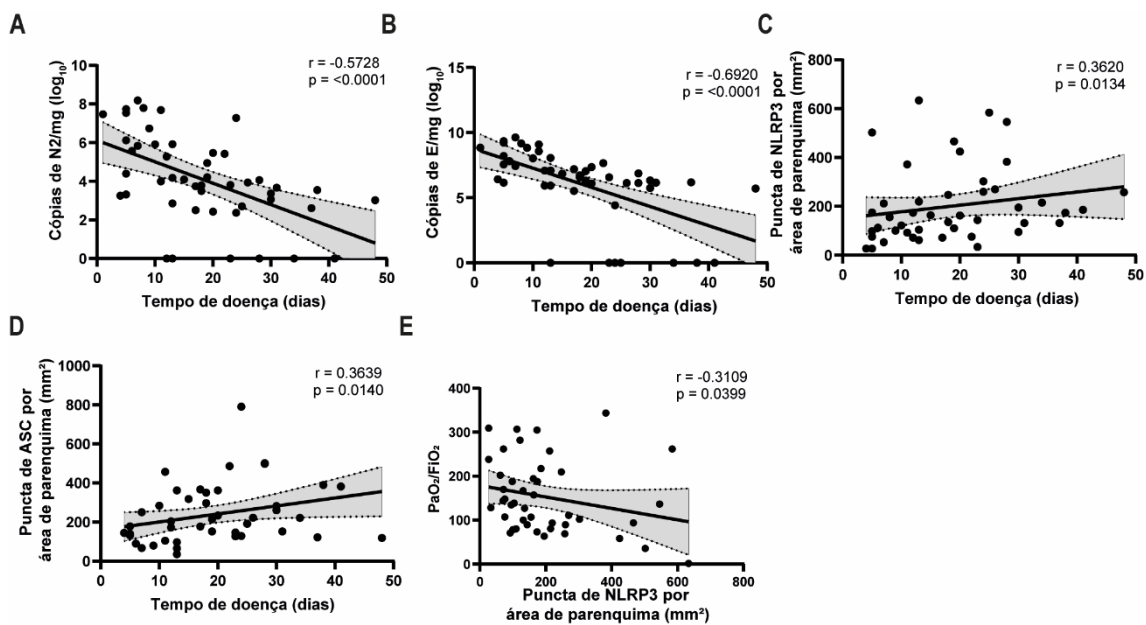




**Figura 39. Imuno-histoquímica de autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19, influenza e adenocarcinoma pulmonar.** Análise de imuno-histoquímica de autópsias pulmonares de 47 pacientes com COVID-19, 12 pacientes com influenza e 5 pacientes com adenocarcinoma de pulmão (área benigna dos pulmões). Quantificação da porcentagem de área marcada para ASC (A), NLRP3 (B), GSDMD clivada (C), IL-1β (D) e Caspase-1 (E). (F-H) Imagens representativas de pulmões de casos fatais de COVID-19 e Influenza, indicando colocalização de Spike viral, ASC, NLRP3, Caspase-1, IL-1β e GSDMD clivado em células endoteliais (CD34+, F), macrófagos (CD68+, G) e pneumócitos tipo II (SFTPC+, H).

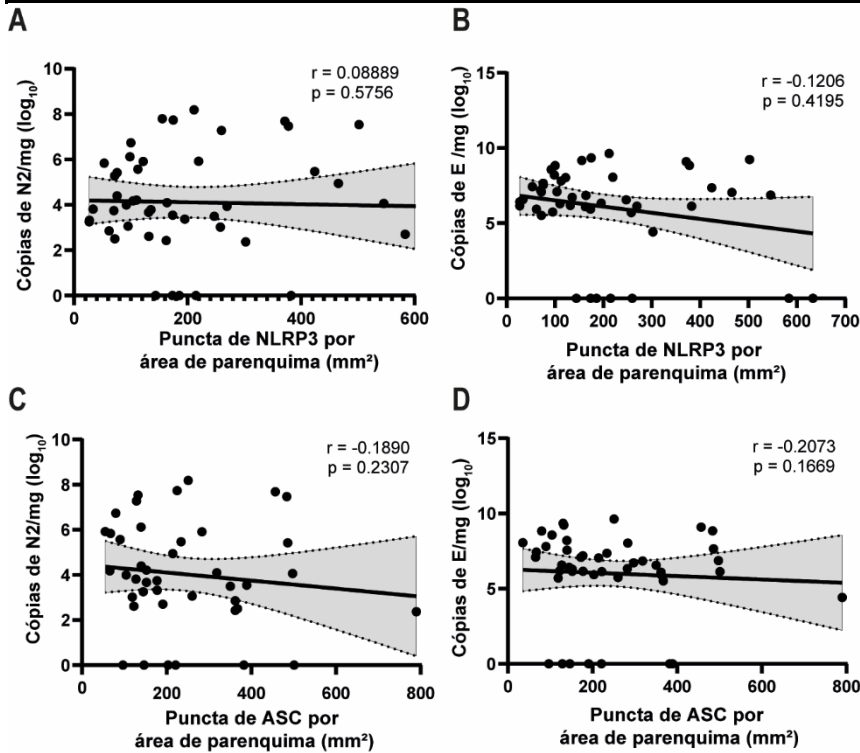
14.3 A progressão da doença em casos letais de COVID-19 ocorre com a diminuição da carga viral e aumento da ativação do inflamassoma no parênquima pulmonar ao longo do tempo

Para avaliar se a ativação do inflamassoma estava associada a condições clínicas específicas de pacientes, realizamos correlações de Pearson nos pacientes COVID-19. Embora todos esses pacientes tenham morrido, observamos uma forte correlação negativa entre a carga viral e tempo de doença (**Figura 40A, B**). Além disso, observamos uma correlação positiva entre a quantidade de puncta de NLRP3 e ASC com o tempo de doença (**Figura 40C, D**), sugerindo assim que, em geral, enquanto a carga viral é reduzida, a ativação do inflamassoma aumenta durante hospitalização nesses casos letais de COVID-19. Também observamos correlações negativas significativas entre puncta de NLRP3 e  $P_{aO_2}/F_{iO_2}$  (**Figura 40E**), sugerindo assim que a ativação do inflamassoma está relacionada a uma piora geral da função pulmonar.



**Figura 40.** A ativação do inflamassoma se correlaciona positivamente com o tempo de doença, e a carga viral se correlaciona inversamente com o tempo de doença. Correlação de Spearman da carga viral pulmonar, ativação do inflamassoma e tempo de doença em 47 pacientes fatais com COVID-19. (A) Correlação do N2 viral com o tempo de doença; (B) Correlação do E viral com o tempo de doença; (C) Correlação de puncta NLRP3 por área de parênquima com o tempo de doença; (D) Correlação de puncta ASC por área de parênquima com o tempo de doença; (E) Correlação de puncta NLRP3 por área de parênquima com  $P_{aO_2}/F_{iO_2}$ . Os valores de  $r$  e  $p$  estão indicados na figura.

Não detectamos correlações estatisticamente significativas entre puncta de NLRP3 ou ASC e carga viral nos tecidos (**Figura 41**).

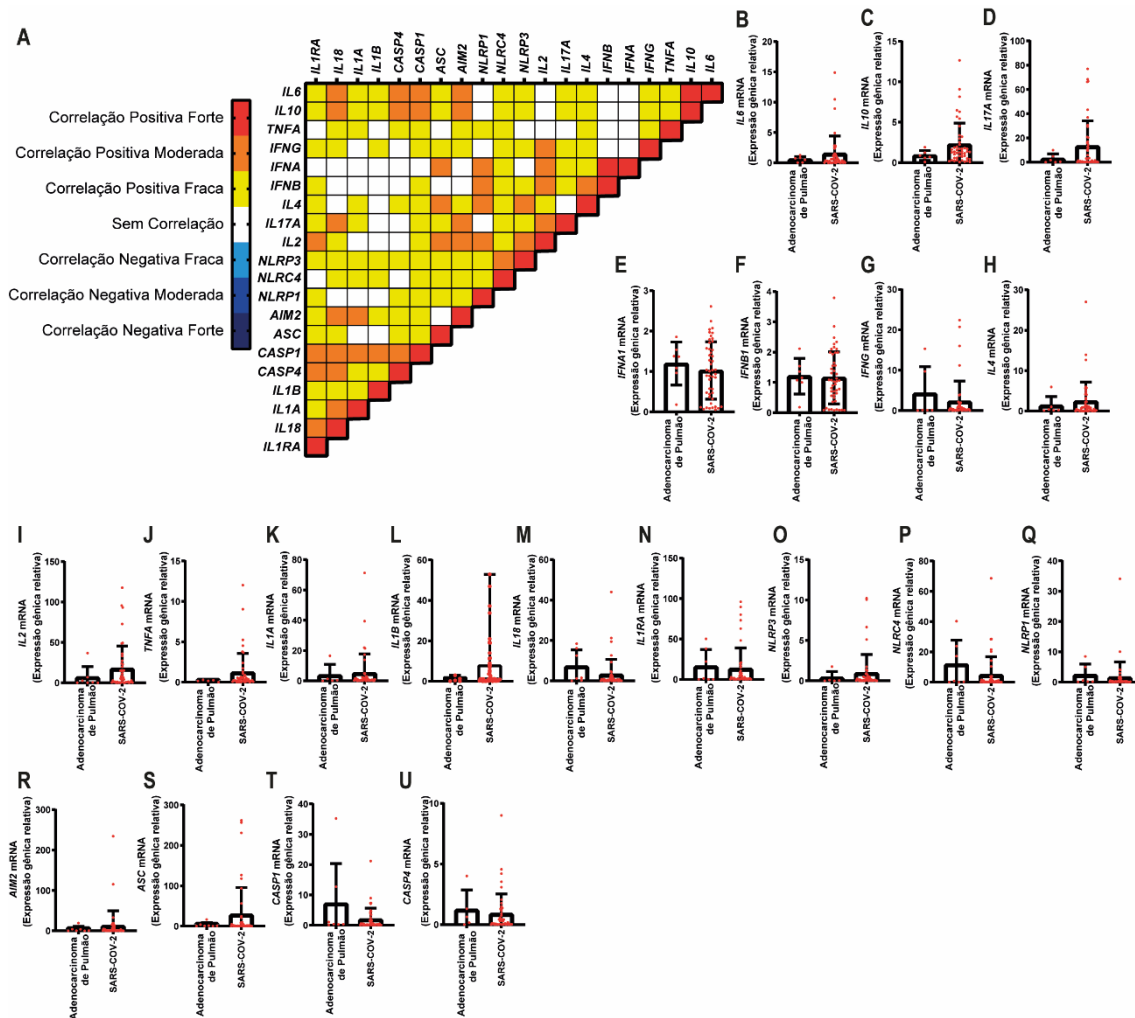


**Figura 41. Correlação não significativa entre as cargas virais e ativação do inflamassoma em casos letais de pacientes com COVID-19.** Correlação de Spearman da carga viral pulmonar e ativação do inflamassoma em 47 pacientes fatais com COVID-19. (A) Correlação de N2 viral com puncta NLRP3 por área de parênquima; (B) Correlação de E viral com puncta NLRP3 por área de parênquima; (C) Correlação de N2 viral com ASC puncta por área de parênquima; (D) Correlação de E viral com puncta ASC por área de parênquima. Os valores de  $r$  e  $p$  estão indicados na figura.

#### 14.4 A ativação do inflamassoma e a carga viral pulmonar definem dois desfechos clínicos distintos em casos letais de COVID-19.

O desequilíbrio dos processos inflamatórios e anti-inflamatórios leva a liberação excessiva de citocinas na circulação sistêmica com consequências potencialmente deletérias, incluindo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), choque circulatório, síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (MODS), e morte (Sinha *et al.*, 2020). Vários estudos relataram a associação da influenza (Peiris *et al.*, 2004; De Jong *et al.*, 2006; Kash *et al.*, 2006; Kobasa *et al.*, 2007; Cillóniz *et al.*, 2009) e SARSCoV-2 (Huang *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021) com síndrome hiper inflamatória relacionada à gravidade da doença, a ativação do inflamassoma pode estar associada à síndrome de liberação de citocinas (SRC) (Dolinay *et al.*, 2012; Cui and Zhang, 2020; Olajide *et al.*, 2021). Assim, para correlacionar a ativação do inflamassoma com o perfil hiper inflamatório observado em casos letais de COVID-19, analisamos a expressão de genes relacionados ao processo inflamatório e ativação do inflamassoma nos pulmões de pacientes com COVID-19. Nós observamos que vários genes de citocinas inflamatórias

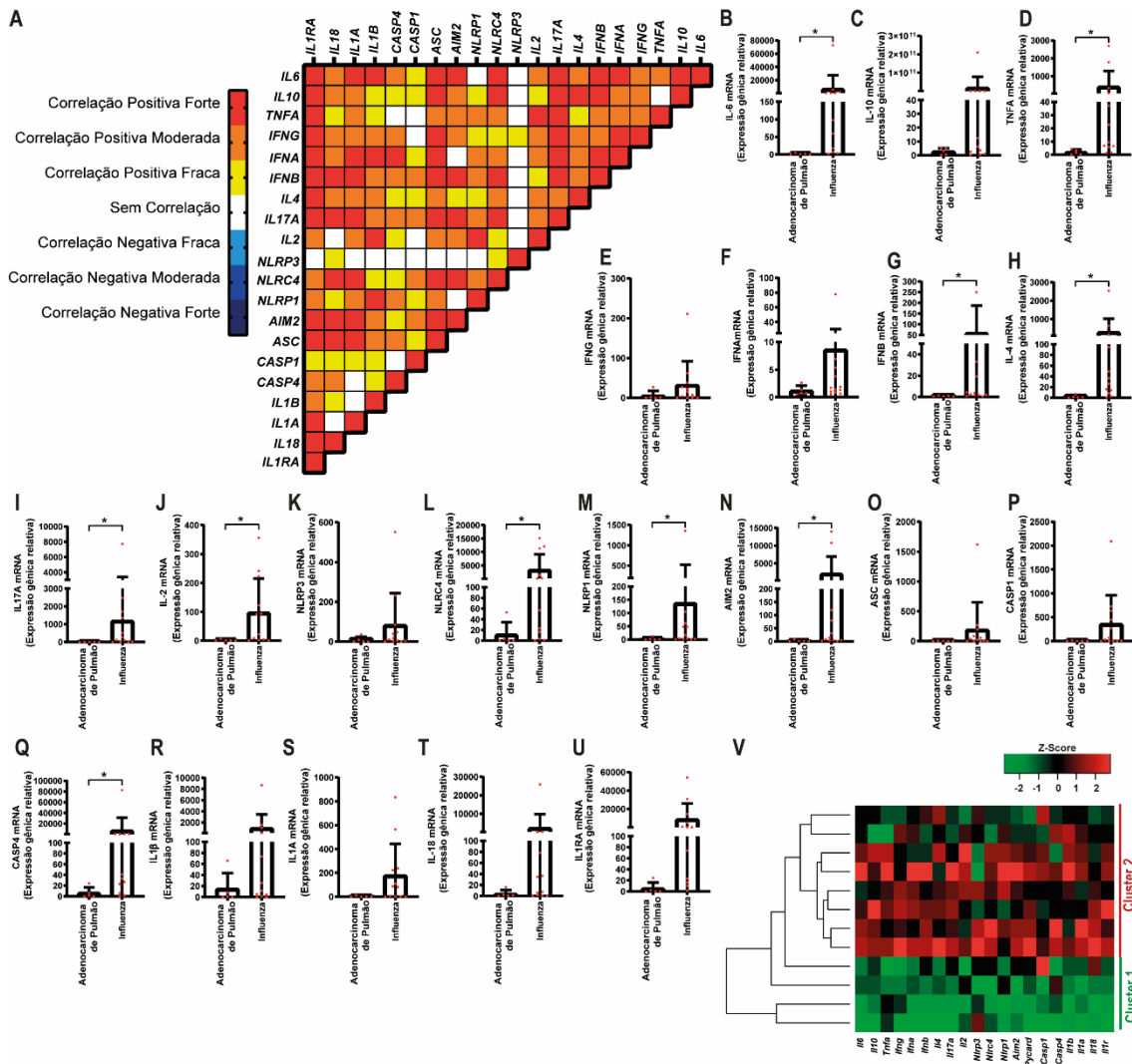
têm uma correlação positiva com os genes envolvidos na ativação do inflamassoma (**Figura 45A**). Não observamos uma diferença significativa na expressão desses genes quando comparamos pacientes com COVID-19 com pacientes com adenocarcinoma de pulmão (**Figura 45B-U**), possivelmente devido à grande dispersão de dados observada em pacientes com COVID-19.



**Figura 42. Expressão gênica pulmonar de pacientes com COVID-19.** Matrix de correlação da expressão gênica de genes associados ao inflamassoma e genes inflamatórios em autópsia pulmonar de 47 pacientes com COVID-19 (**A**). As cores indicam os scores de correlação, categorizados como correlação positiva forte ( $r \geq 0,70$ ; vermelho); correlação positiva moderada ( $0,50 \geq r \leq 0,70$ ; laranja); correlação positiva fraca ( $0,30 \geq r \leq 0,50$ ; amarelo); correlação negativa forte ( $r \geq -0,70$ ; azul escuro); correlação moderada negativa ( $-0,50 \geq r \leq -0,70$ ; azul) ou correlação negativa fraca ( $-0,30 \geq r \leq -0,50$ ; azul claro). Apenas correlações com  $p < 0,05$  são representadas na matriz de correlação. (**B-U**) Expressão de mRNA nas autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19 e pacientes com adenocarcinoma de pulmão (área benigna dos pulmões). Os genes selecionados foram *Il6* (**B**), *Il10* (**C**), *Il17* (**D**), *Ifna1* (**E**), *Ifnb1* (**F**), *Ifng* (**G**), *Il4* (**H**), *Il2* (**I**), *Tnfa* (**J**), *Il1a* (**K**), *Il1b* (**L**), *Il18* (**M**), *Il1ra* (**N**), *Nlrp3* (**O**), *Nlrp1* (**Q**), *Aim2* (**R**), *Pycard* (**S**), *Casp1* (**T**), *Casp4* (**U**).

Entre os pacientes com influenza, observamos uma correlação mais forte entre os genes avaliados (**Figura 43A**). Nesses pacientes a expressão de *Il6* (**Figura 43B**), *Tnfa*

(Figura 43D), *Ifnb* (Figura 43G), *Il4* (Figura 43H), *Il17a* (Figura 43I), *Il2* (Figura 43J), *Nlr4* (Figura 43L), *Nlrp1* (Figura 43M), *Aim2* (Figura 43N) e *Casp4* (Figura 43Q) são significativamente maiores do que em pacientes com adenocarcinoma de pulmão.

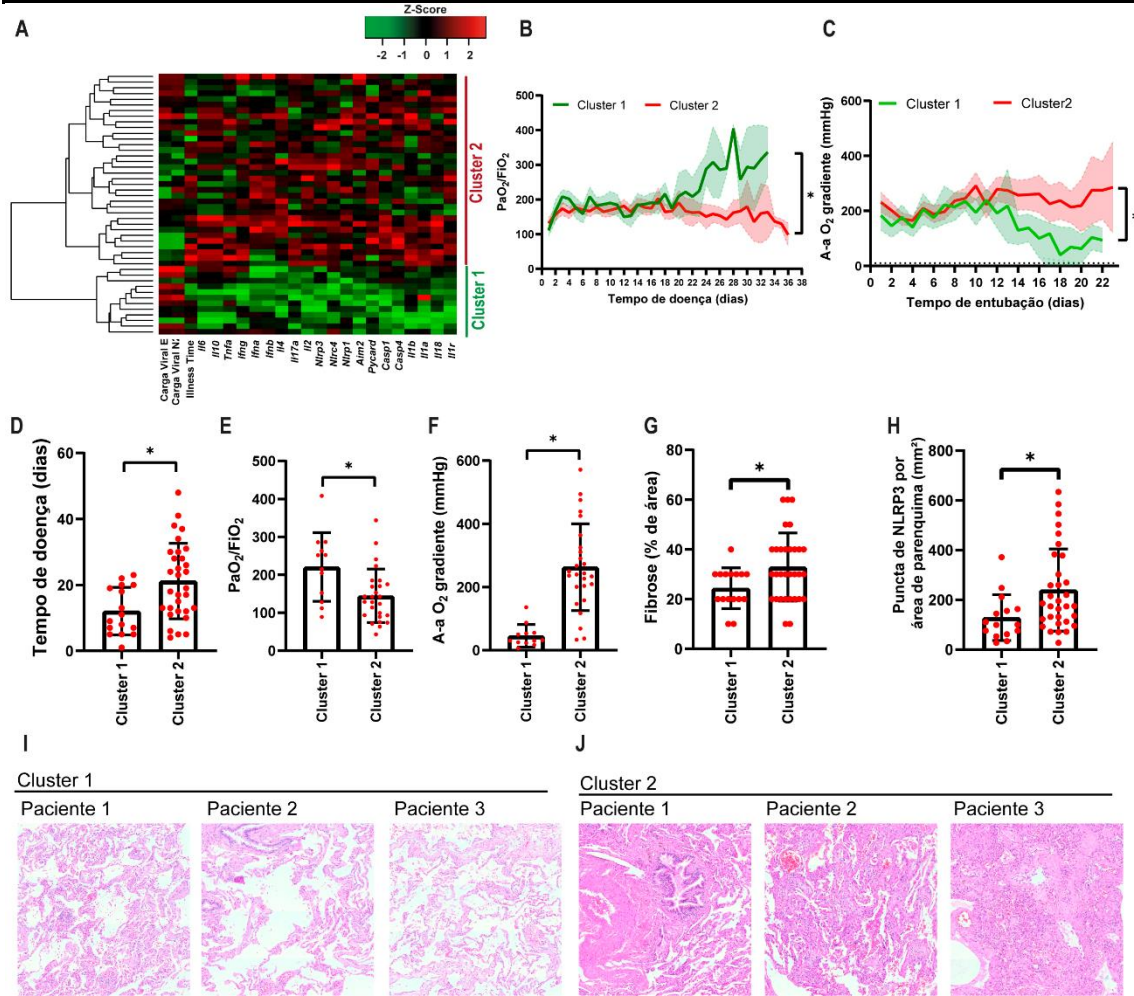


**Figura 43. Expressão gênica pulmonar de pacientes com influenza.** Matriz de correlação da expressão gênica do inflamassoma e genes inflamatórios em biópsias pulmonares de pacientes com influenza (A) que são representadas por scores de correlação, que foram categorizados como correlação positiva forte ( $r \geq 0,70$ ; vermelho), correlação positiva moderada ( $0,50 \geq r \leq 0,70$ ; laranja), correlação positiva fraca ( $0,30 \geq r \leq 0,50$ ; amarelo), correlação negativa forte ( $r \geq -0,70$ ; azul escuro), correlação negativa moderada ( $-0,50 \geq r \leq -0,70$ ; azul) ou correlação negativa fraca ( $-0,30 \geq r \leq -0,50$ ; azul claro). Apenas correlações com  $p < 0,05$  são representadas na matriz de correlação. Expressão de mRNA em biópsias pulmonares de pacientes com influenza e adenocarcinoma de pulmão (Controle). Os genes selecionados foram *Il6* (B), *Il10* (C), *Il17* (D), *Ifna1* (E), *Ifnb1* (F), *Ifng* (G), *Il4* (H), *Il2* (I), *Tnfa* (J), *Il1a* (K), *Il1 $\beta$*  (L), *Il18* (M), *Il1ra* (N), *Nlrp3* (O), *Nlr4* (P), *Nlrp1* (Q), *Aim2* (R), *Pycard* (S), *Casp1* (T), *Casp4* (U). (V) Heatmap da expressão de mRNA de genes do inflamassoma e genes inflamatórias em biópsias pulmonares de pacientes com influenza.

Devido à alta variação na expressão gênica detectada nos pacientes com COVID-19, realizamos um *heatmap* não supervisionado construído com dados da expressão

gênica relativa e observamos a formação de dois clusters nos pacientes com COVID-19 (**Figura 44A**). Estes clusters também foram observados entre os pacientes influenza (**Figura 43V**). O cluster 1 foi caracterizado por uma maior carga viral e menor expressão dos genes do inflamassomas e genes inflamatórios. Em contraste com o Cluster 1, o Cluster 2 foi composto por pacientes que morreram com menor carga viral e expressão aumentada de genes do inflamassomas e genes inflamatórios (**Figura 44A**). Devido ao baixo número amostral de pacientes com influenza, optamos por não os estratificar, de modo que as análises dos pacientes estratificados serão realizadas apenas entre os pacientes com COVID-19.

Para avaliar melhor as principais diferenças entre esses dois grupos, analisamos a cinética de  $P_aO_2/FiO_2$  e gradiente de A-a  $O_2$  nesses pacientes. Observamos que os pacientes do Cluster 2, que apresentavam inflamação geral aumentada, possuíam uma piora da função pulmonar em comparação com o Cluster 1 (**Figura 44B, C**). Em contrapartida, os pacientes do Cluster 1 apresentaram coagulação intravascular disseminada (**Tabela 4**), de acordo com os parâmetros recomendados pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH) (Taylor *et al.*, 2001). As informações demográficas básicas estratificadas por cluster são fornecidas na **Tabela 4**. Surpreendentemente, os pacientes que pertenciam ao Cluster 2 tiveram um tempo de doença maior (**Figura 44D**), pior função pulmonar (como indicado pelo  $P_aO_2/FiO_2$  e gradiente A-a  $O_2$ ) (**Figura 44E, F**), maior área de fibrose pulmonar (**Figura 44G**) e maior ativação do inflamassoma de NLRP3, conforme medido pela formação de puncta (**Figura 44H**). Imagens representativas do parênquima pulmonar de três pacientes do Cluster 1 e três pacientes do Cluster 2 são mostradas na **Figura 44I-J**.



**Figura 44** Carga viral pulmonar e expressão gênica de genes inflamatórios definem dois grupos de pacientes em casos letais de COVID-19. (A) Heatmap da expressão gênica de inflamassoma, moléculas/citocinas inflamatórias e N2 e E virais em autópsias pulmonares de 47 pacientes com COVID-19.  $PaO_2/FiO_2$  (B) e gradiente A-a  $O_2$  (C) durante o desenvolvimento da doença de pacientes do Cluster 1 (N=16, verde) e Cluster 2 (N=31, vermelho). \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste Area Sob a Curva. (D-H) Análise do Cluster 1 e Cluster 2 para tempo de doença (D),  $PaO_2/FiO_2$  (E), gradiente A-a  $O_2$  (F), fibrose (G) e puncta de NLRP3 por área do parênquima pulmonar (H). Cada ponto na figura representa o valor obtido de cada indivíduo. \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste de Mann-Whitney. (I-J) Imagens H&E representativas do parênquima pulmonar de 3 pacientes do cluster 1 (I) e 3 pacientes do cluster 2 (J). Barras de escala 200  $\mu m$ .

Tabela 4. Características dos pacientes COVID-19

Características Demográficas	Cluster 1 Média (±SD) ou n(%)	Cluster 2 Média (±SD) ou n(%)	Valor de p
N	16	31	-
Gênero			
Feminino	6 (37.50%)	17 (54.83%)	0.358*
Masculino	10 (62.50%)	14 (45.16%)	
Idade (anos)	70.81 (±10.34)	66.5 (±17.46)	0.369**
Tempo de doença (dias)	12.06 (±6.97)	21.19 (±9.64)	0.001**
CTI	11 (68.75%)	25 (80.64%)	0.471*
<b>Comorbidades</b>			
Hipertensão	10 (62.50%)	16 (51.61%)	0.546*
IMC	28.39 (±6.92)	33.21 (±8.52)	0.057**
Diabetes	7 (43.75%)	11 (35.48%)	0.999*
Fumante	4 (25.00%)	8 (25.80%)	0.999*
Doenças Cardíacas	4 (25.00%)	8 (25.80%)	0.999*
Doenças Pulmonares	3 (18.75%)	9 (29.03%)	0.505*
Doença Renal	1 (6.25%)	6 (19.35%)	0.395*
Histórico de AVC	3 (18.75%)	4 (12.90%)	0.675*
Doença autoimune	1 (6.25%)	1 (3.22%)	0.999*
<b>Achados Laboratoriais</b>			
Proteína C-Reativa (mg/dL)	11.54 (±1.64)	11.32 (±9.15)	0.924**
Dímero D (µg/mL)	6.07 (±5.45)	4.38 (±3.91)	0.227**
LDH (mmol/L)	6.17 (±6.42)	4.41 (±4.52)	0.280**
Creatinina (mg/dL)	2.41 (±1.64)	2.12 (±1.21)	0.494**
Ureia (mg/dL)	108.36 (±53.92)	125.09 (±60.75)	0.358**
AST (IU/L)	110.65 (±112.67)	101.08 (±78.69)	0.735**
ALT (IU/L)	72.40 (±59.92)	71.98 (±53.88)	0.980**
AST/ALT	2.1 (±2.47)	1.6 (±0.92)	0.319**
Tempo de Protrombina (INR)	1.56 (±0.98)	1.95 (±2.55)	0.560**
Albumina (g/dL)	3.24 (±0.65)	3.01 (±0.54)	0.251**
Glicemia (mg/dL)	191.00 (±100.25)	196.65 (±96.32)	0.851**
<b>Perfil Respiratório</b>			
Temperatura (°C)	37.74 (±1.82)	37.20 (±1.62)	0.304**
Ventilação Mecânica	11 (68.75%)	25 (80.64%)	0.471*
Oxigenação por cânula nasal	5 (31.25%)	6 (19.35%)	0.471*
Tempo de intubação (dias)	8 (±4.72)	14.32 (±6.94)	0.009**
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> (mmhg)	75.54 (±8.06)	73.27 (±1.69)	0.135**
Saturação Venosa (S <sub>v</sub> O <sub>2</sub> )	61.33 (±27.83)	70.59 (±19.27)	0.187**
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <sup>#</sup>	216.16 (±32.94)	164.15 (±21.09)	<0.001**
Gradiente de A-a O <sub>2</sub> <sup>#</sup>	40.20 (±101.48)	237.58 (±68.05)	0.006**
Frequência Respiratória (mov/min)	26.76 (±7.86)	26.45 (±5.75)	0.878**
<b>Achados Histopatológicos, Perfil Vascular e Ativação do inflamassoma</b>			
Fibrose (% de área)	24.38 (±11.59)	32.90 (±14.05)	0.042**
Pneumonia em Organização (% de área)	23.30 (±18.16)	24.50 (±15.71)	0.815**
Pneumonia Aguda Fibrinosa e Organizante (% de área)	18.33 (±12.24)	23.89 (±15.76)	0.225**
Dano Alveolar Difuso (% de área)	34.00 (±24.03)	33.33 (±20.23)	0.920**
Pneumonite (% de área)	20.67 (±18.52)	23.86 (±15.88)	0.540**
Infarto Pulmonar (% de área)	26.67 (±14.14)	20.00 (±14.14)	0.132**
Coagulação Intravascular Disseminada	8 (50.00%)	5 (16.13%)	0.0198*
Puncta de NLRP3 por área de parênquima (mm <sup>2</sup> )	143.67 (±89.00)	238.40 (±157.76)	0.031**

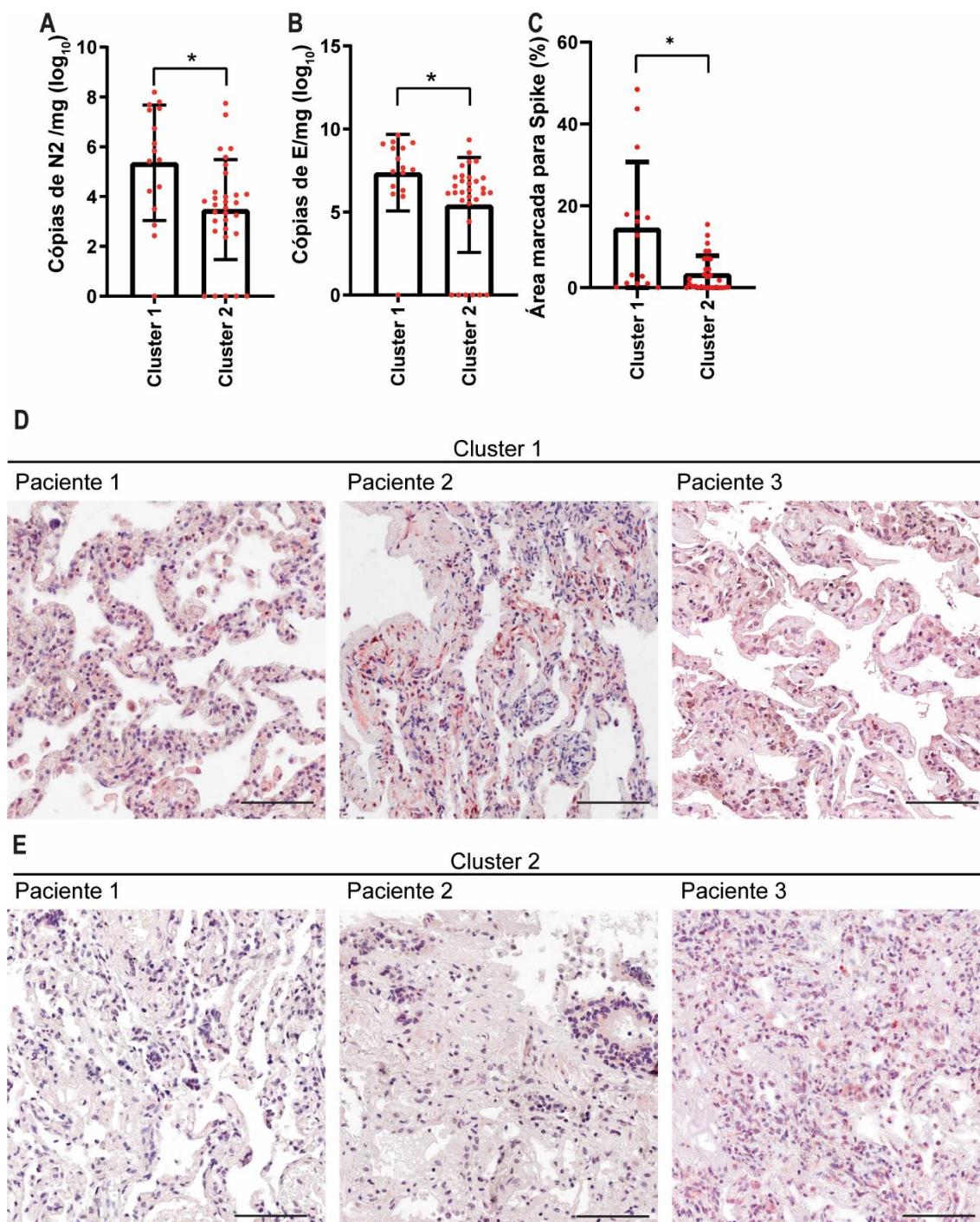
\* Teste exato de Fisher

\*\* Teste t



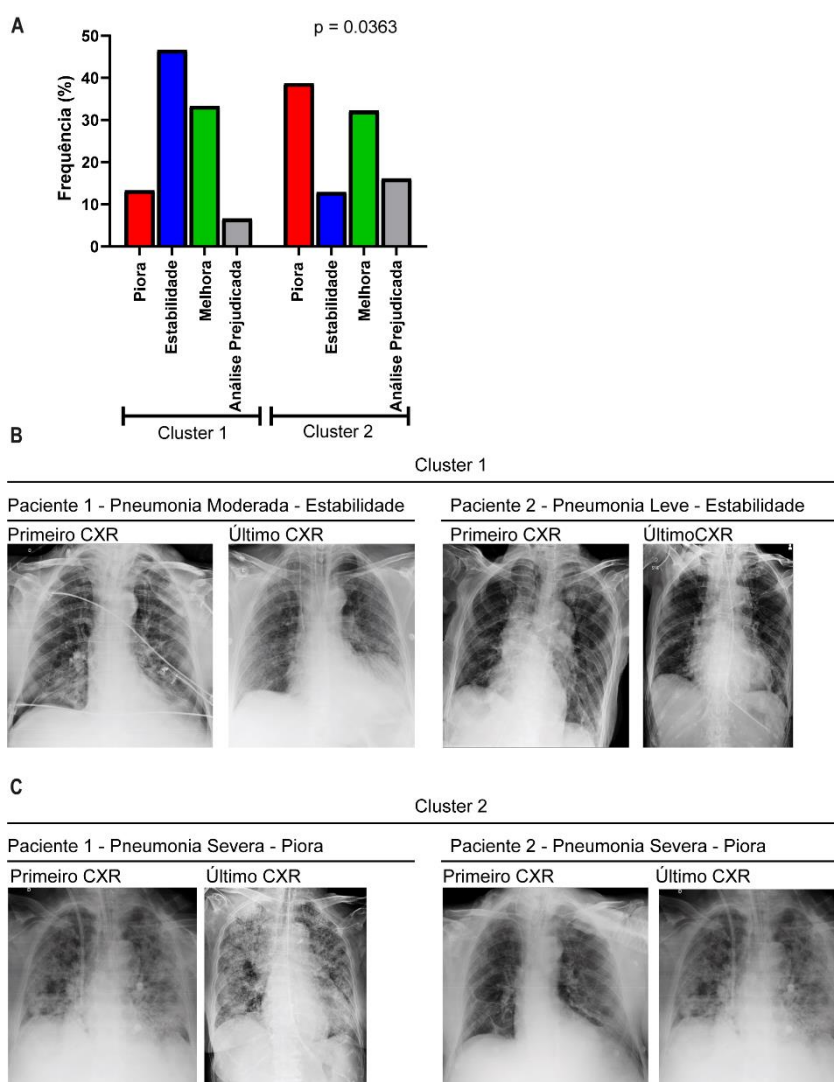
# dado após 18 dias de hospitalização

Além disso, confirmamos que os pacientes pertencentes ao Cluster 2 tinham uma carga viral global mais baixa do que os pacientes do Cluster 1 (**Figura 45**).



**Figura 45.** Os pacientes com COVID-19 do Cluster 1 contêm cargas virais mais altas nos pulmões em comparação com os pacientes do Cluster 2. Quantificação de N2 viral (A) e E (B) em autópsias pulmonares de 47 pacientes com COVID-19 do Cluster 1 (N = 16) e Cluster 2 (N = 31). (C) Quantificação da porcentagem de área marcada para proteína viral Spike em autópsias pulmonares. Cada ponto na figura representa o valor obtido de cada indivíduo. \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste de Mann-Whitney. (D-E) Imagens representativas de tecidos pulmonares corados para Spike (vermelho) e Hematoxilina (azul). Barras de escala 100  $\mu\text{m}$ .

Em seguida, avaliamos as análises radiológicas de 16 pacientes do Cluster 1 e 31 pacientes do Cluster 2 comparando a primeira e a última radiografia de tórax (CXR) e observamos uma piora geral das condições pulmonares nos pacientes do Cluster 2 (**Figura 46A**). Imagens representativas de CXR de 2 pacientes de cada cluster são mostradas na **Figura 46B, C**. A **Tabela 5** resume os achados gerais das análises de imagem para os pacientes do Cluster 1 e Cluster 2.



**Figura 46. Evolução CXR de pacientes do Cluster 1 e Cluster 2.** Análise da primeira e última radiografia de tórax (CXR) de 46 pacientes com COVID-19 pertencentes ao Cluster 1 (n=15) e Cluster 2 (n=31). (A) Pacientes com opacidades reduzidas (verde), estabilidade (azul) e opacidades aumentadas (vermelho). As análises prejudicadas são mostradas em cinza. Imagens representativas da primeira e última radiografia de dois pacientes do Cluster 1, indicando estabilidade em pneumonia moderada e leve (B) e dois pacientes do Cluster 2, indicando piora do quadro em casos de pneumonia grave (C).

**Tabela 5.** Análises Radiológicas

	Cluster 1	Cluster 2	Valor de p
<b>Padrão do Primeiro CXR</b>			
Sem Opacidades	1 (6.250%)	3 (9.67%)	0.9101
Pneumonia Viral Leve	2 (12.50%)	3 (9.67%)	
Pneumonia Viral Moderada	8 (50.00%)	12 (38.70%)	
Pneumonia Viral Severa	5 (31.25%)	11 (35.48%)	
Análise Prejudicada	0	2 (6.45%)	
<b>Padrão do Último CXR</b>			
Sem Opacidades	1 (6.25%)	2 (6.45%)	0.9971
Pneumonia Viral Leve	3 (18.75%)	5 (16.12%)	
Pneumonia Viral Moderada	6 (37.50%)	12 (38.70%)	
Pneumonia Viral Severa	4 (25.00%)	8 (25.80%)	
Análise Prejudicada	2 (12.50%)	4 (12.90%)	
<b>Evolução do CXR até o óbito</b>			
Melhora (Menos opacidades)	5 (33.33%)	10 (32.25%)	0.0364
Estabilidade	7 (46.66%)	4 (12.90%)	
Piora (mais opacidades)	2 (13.33%)	12 (38.70%)	
Análise Prejudicada	1 (6.66%)	5 (16.12%)	
<b>Comprometimento do Pulmão (CT Torácico)</b>			
0	0	0	0.0363
<25%	4 (66.66%)	1 (12.50%)	
25-50%	0	3 (37.50%)	
50-75%	1 (16.66%)	3 (37.50%)	
>75%	1 (16.66%)	1 (12.50%)	

#### 14.5 Expressão gênica e perfil celular de ativação do inflamassoma não estão associados ao uso de ventilação mecânica em pacientes

Para avaliar se a ventilação mecânica (MV) pode estar associada à inflamação ou ativação do inflamassoma, dividimos os pacientes com COVID-19 em uso ou não de ventilação mecânica. As informações demográficas desses pacientes são apresentadas na

**Tabela 6.** Em nossa coorte, os pacientes submetidos à ventilação mecânica apresentam maior tempo de doença, hipertensão, menor quantidade de Proteína C-Reativa, Tempo de protrombina (INR) e albumina e maiores quantidades de LDH e ureia, pior função pulmonar ( $P_aO_2/FiO_2$  e gradiente A-a  $O_2$ ), embora não tenham sido observadas diferenças nas análises histopatológicas (

**Tabela 6).**

**Tabela 6.** Características dos pacientes COVID-19 que foram submetidos ou não a Ventilação Mecânica (MV).

<b>Características Demográficas</b>	<b>MV+</b> Média ( $\pm$ SD) ou n(%)	<b>MV-</b> Média ( $\pm$ SD) ou n(%)	<b>Valor de p</b>
N	36	11	
Gênero			
Feminino	17 (47.22%)	6 (54.54%)	0.7400*
Masculino	19 (52.77%)	5 (45.45%)	
Idade (anos)	65.61 ( $\pm$ 13.52)	75.72 ( $\pm$ 17.61)	0.0493**
Tempo de doença (dias)	20.94 ( $\pm$ 10.76)	8.72 ( $\pm$ 5.40)	0.0007**
CTI	36 (100.00%)	0 (0.00%)	>0.9999*
<b>Comorbidades</b>			
Hipertensão	23 (63.88%)	3 (27.27%)	0.0433*
IMC	30.61 ( $\pm$ 8.52)	34.56 ( $\pm$ 14.46)	0.4324**
Diabetes	16 (44.44%)	2 (18.18%)	0.1644*
Fumante	11 (30.55%)	3 (27.77%)	>0.9999*
Doenças Cardíacas	11 (30.55%)	1 (9.09%)	0.2440*
Doenças Pulmonares	9 (25.00%)	2 (18.18%)	>0.9999*
Doença Renal	6 (16.66%)	1 (9.09%)	>0.9999*
Histórico de AVC	4 (11.11%)	3 (27.77%)	0.3296*
Doença autoimune	1 (2.77%)	1 (9.09%)	0.4172*
<b>Achados Laboratoriais</b>			
Proteína C-Reativa (mg/dL)	9.99 ( $\pm$ 7.83)	16.02 ( $\pm$ 9.29)	0.0377**
Dímero D ( $\mu$ g/mL)	4.99 ( $\pm$ 4.68)	4.56 ( $\pm$ 3.62)	0.7989**
LDH (mmol/L)	5.78 ( $\pm$ 5.76)	2.49 ( $\pm$ 1.13)	0.0680**
Creatinina (mg/dL)	1.58 ( $\pm$ 1.39)	1.05 ( $\pm$ 0.50)	0.2242**
Ureia (mg/dL)	138.18 ( $\pm$ 54.07)	64.48 ( $\pm$ 34.12)	0.0001**
AST (IU/L)	109.61 ( $\pm$ 98.16)	84.81 ( $\pm$ 54.14)	0.4725**
ALT (IU/L)	79.02 ( $\pm$ 58.67)	45.38 ( $\pm$ 26.97)	0.1254**
AST/ALT	1.6 ( $\pm$ 1.74)	2.2 ( $\pm$ 0.88)	0.3542**
Tempo de Protrombina (INR)	1.53 ( $\pm$ 0.91)	2.82 ( $\pm$ 4.24)	0.0900**
Albumina (g/dL)	2.99 ( $\pm$ 0.54)	3.78 ( $\pm$ 0.41)	0.0034**
Glicemia (mg/dL)	198.22 ( $\pm$ 93.77)	181.11 ( $\pm$ 102.34)	0.6340**
<b>Perfil Respiratório</b>			
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	37.51 ( $\pm$ 1.79)	36.99 ( $\pm$ 1.53)	0.3890**
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> (mmhg)	79.57 ( $\pm$ 20.19)	53.99 ( $\pm$ 24.12)	0.0014**
Saturação Venosa (S <sub>v</sub> O <sub>2</sub> )	70.86 ( $\pm$ 14.36)	50.71 ( $\pm$ 31.26)	0.0092**
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <sup>#</sup>	132.63 ( $\pm$ 67.94)	257.11 ( $\pm$ 114.86)	<0.0001**
Gradiente de A-a O <sub>2</sub> <sup>#</sup>	351.09 ( $\pm$ 183.40)	45.69 ( $\pm$ 26.55)	<0.0001**
Frequência Respiratória (mov/min)	27.61 ( $\pm$ 6.17)	23.09 ( $\pm$ 7.89)	0.0669**
<b>Achados Histopatológicos</b>			
Fibrose (% de área)	30.28 ( $\pm$ 14.05)	29.09 ( $\pm$ 12.21)	0.8015**
Pneumonia em Organização (% de área)	26.11 ( $\pm$ 13.56)	20.00 ( $\pm$ 11.54)	0.4520**
Pneumonia Aguda Fibrinosa e Organizante (% de área)	19.50 ( $\pm$ 12.48)	26.00 ( $\pm$ 15.16)	0.3906**
Dano Alveolar Difuso (% de área)	28.82 ( $\pm$ 19.34)	43.75 ( $\pm$ 16.85)	0.0742**
Pneumonite (% de área)	23.52 ( $\pm$ 17.33)	20.00 ( $\pm$ 8.16)	0.5435**
Infarto Pulmonar (% de área)	25.00 ( $\pm$ 10.00)	10.00 ( $\pm$ 0.00)	0.2235**
<b>Ativação do Inflamassoma</b>			
Puncta de NLRP3 por área de parênquima (mm <sup>2</sup> )	204.3 ( $\pm$ 155.5)	204.0 ( $\pm$ 156.6)	0.9310**
Puncta de ASC por área de parênquima (mm <sup>2</sup> )	251.8 ( $\pm$ 192.5)	267.3 ( $\pm$ 133.1)	0.4196**

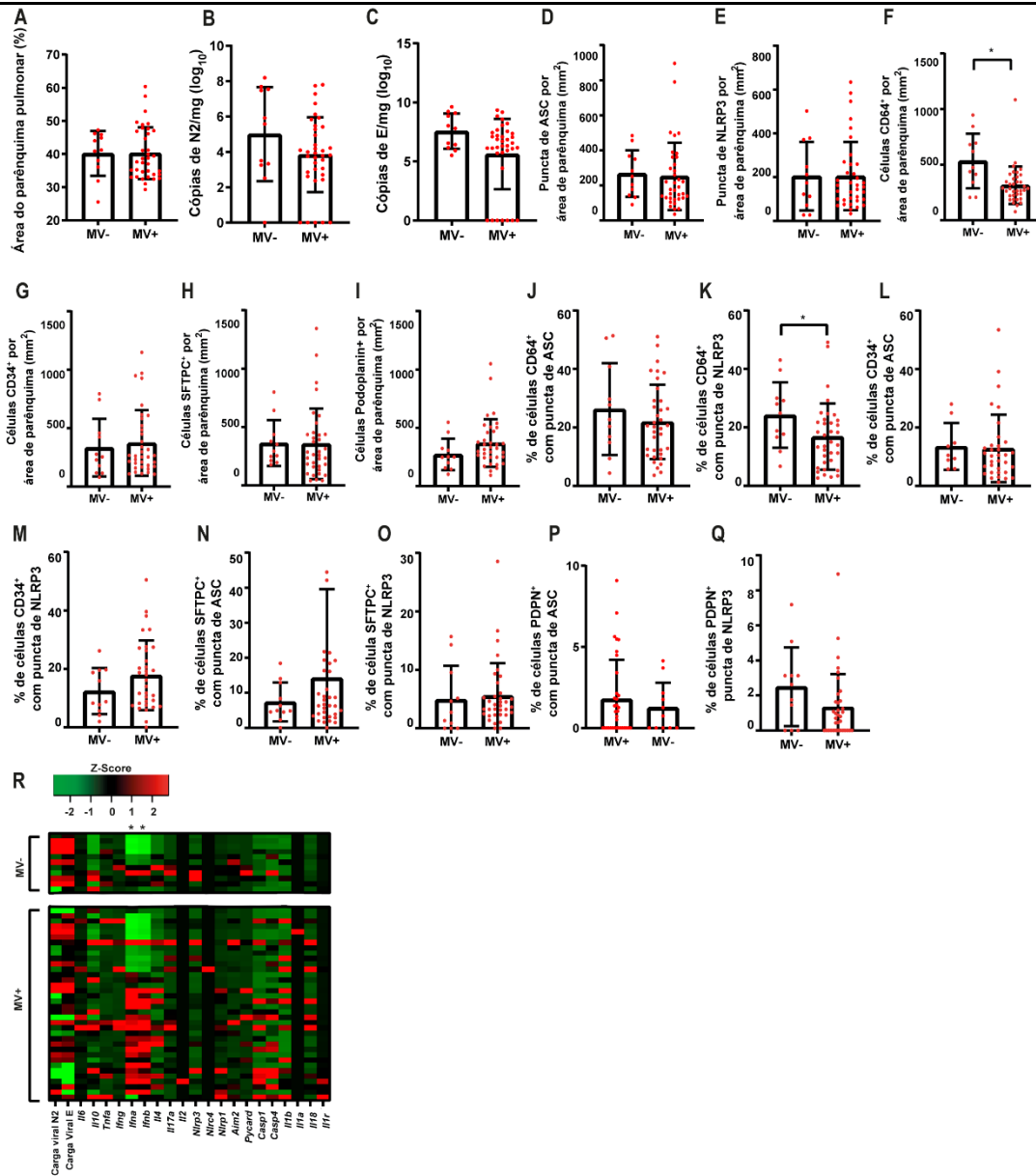
\* Fisher's exact test

\*\* t-Test

# data after 18 days of hospitalization

Não foram observadas diferenças entre a proporção de área do parênquima (**Figura 47A**), carga viral (**Figura 47B-C**), ativação do inflamassoma (**Figura 47D-E**), células endoteliais (**Figura 47G**), pneumócito tipo 1 (**Figura 47I**), pneumócito tipo 2 (**Figura 47H**), assim como não foi observada diferença entre a ativação do inflamassoma nas células endoteliais (**Figura 47M-N**), pneumócito tipo 1 (**Figura 47Q-R**), pneumócito tipo 2 (**Figura 47O-P**). Apenas os macrófagos apresentam uma pequena redução nos pacientes submetidos à ventilação mecânica (**Figura 47F**) e essas células também apresentam uma pequena redução apenas na ativação do NLRP3 (**Figura 47K-L**).

Ao avaliar o perfil de expressão de genes associados à resposta inflamatória e ativação do inflamassoma, apenas *Ifna* e *Ifnb* apresentaram maior expressão entre os pacientes submetidos à ventilação mecânica (**Figura 47R**). As diferenças encontradas entre os pacientes que foram ou não submetidos à ventilação mecânica são semelhantes ao que já foi descrito na literatura (Dolinay *et al.*, 2012). Apesar disso, os dados apresentados não suportam a hipótese de que a ventilação mecânica esteja associada à ativação do inflamassoma, fibrose, síndrome de liberação de citocinas ou piora da função pulmonar.



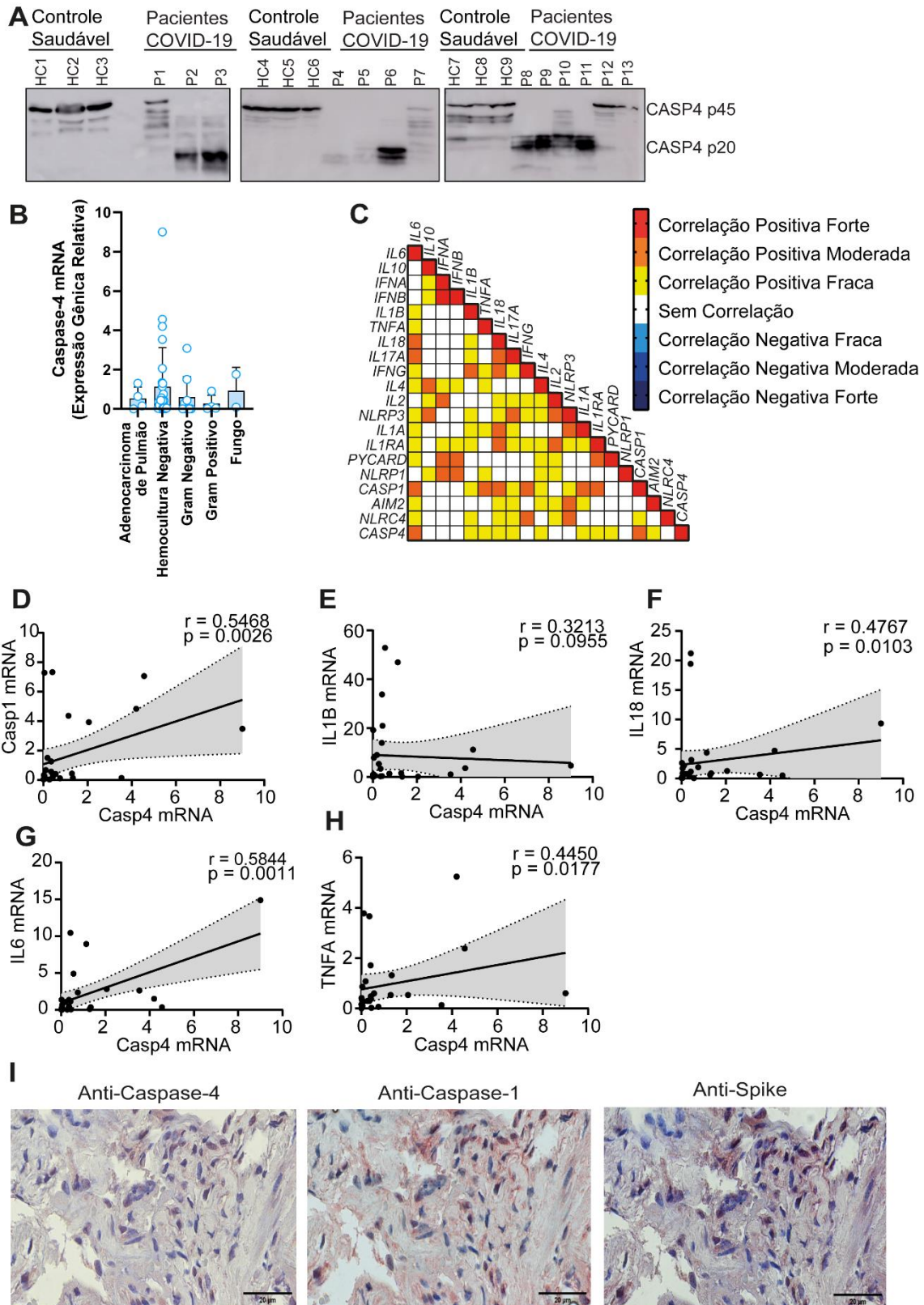
**Figura 47. A ventilação mecânica não está relacionada ao aumento da ativação do inflamassoma em pacientes com COVID-19.** Pacientes com COVID-19 submetidos ou não à ventilação mecânica (VM). (A) Proporção da área do parênquima pulmonar dos pacientes. (B-C) Quantificação da carga viral N2 (B) e carga viral E (C), células com puncta de ASC (D) e NLRP3 (E) em células do parênquima pulmonar. Cada ponto na figura representa o valor obtido de cada indivíduo. Células CD64+ por área de parênquima pulmonar (F), porcentagem de células CD64+ com puncta de ASC (J) ou NLRP3 (K). Células CD34+ por área de parênquima pulmonar (G), porcentagem de células CD34+ com puncta de ASC (L) ou NLRP3 (M). Células SFTPC+ por área de parênquima pulmonar (H), porcentagem de células SFTPC+ com puncta de ASC (N) ou NLRP3 (O). Células PDPN+ por área de parênquima pulmonar (I), porcentagem de células PDPN+ com puncta de ASC (P) ou NLRP3 (Q). \*, P < 0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste de Mann-Whitney. (R) Mapa de calor da expressão de mRNA de inflamassoma, moléculas inflamatórias e citocinas em biópsias pulmonares de pacientes com COVID-19 dividido por pacientes submetidos ou não à ventilação mecânica (VM).

*14.6 A caspase-4 é regulada positivamente em pacientes com COVID-19 e ativada durante infecção por SARS-CoV-2 e correlaciona-se com mediadores inflamatórios e componentes do inflamassoma.*

Para investigar se a CASP4 é regulada positivamente em pacientes com COVID-19 e como isso se correlaciona com a gravidade da doença, avaliamos a clivagem de CASP4 em Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs) obtidas de amostras de sangue fresco de pacientes com COVID-19 coletados durante a internação (todos casos moderados a graves de COVID-19). Foi observada clivagem de CASP4 em PBMCs obtidos de pacientes com COVID-19 (em 7 de 13 pacientes testados) (**Figura 48A**).

Em seguida, avaliamos a expressão de CASP4 e mediadores inflamatórios em autópsias pulmonares de casos letais de COVID-19. Ao realizar RT-PCR, descobrimos que o CASP4 é regulado positivamente nos pulmões de pacientes com COVID-19 (n = 28) como em comparação com pacientes de controle (área benigna de adenocarcinoma de pulmão, n = 4) (**Figura 48B**). Vale a pena notar que muitos pacientes não apresentaram expressão de CASP4, indicando que a expressão e ativação de CASP4 é variável entre os pacientes com COVID-19. Todos os 28 pacientes mostrados nessa figura possuíam hemoculturas negativas, sugerindo que coinfeções bacterianas ou fúngicas não contribuem para o aumento da expressão de CASP4 observada nos pacientes. Análises adicionais, incluindo amostras de pacientes com COVID-19 que testaram positivo para fungos ou bactérias durante hospitalizações, não suportam uma contribuição significativa de coinfeções para a expressão aumentada de CASP4 (**Figura 48B**). Curiosamente, as análises de expressão gênica em pacientes com cultura negativa com COVID-19 mostraram uma correlação positiva entre CASP4 e vários genes inflamatórios (**Figura 48C**). Entre esses, encontramos uma correlação positiva significativa com CASP1, IL1B, IL18, IL6, TNFA (**Figura 48C-H**). Ao realizar o método sequencial de marcação e apagamento da imunoperoxidase nos tecidos pulmonares, confirmamos a expressão das proteínas CASP4, CASP1 e SARS-CoV-2 Spike nos pulmões de pacientes fatais com COVID-19 (**Figura 48I**).

Ao todo, esses dados indicaram que a expressão do gene CASP4 é regulada positivamente em pacientes com COVID-19, e a infecção por SARS-CoV-2 desencadeia a ativação de CASP4 em monócitos infectados in vitro e em PBMCs de pacientes com COVID-19.

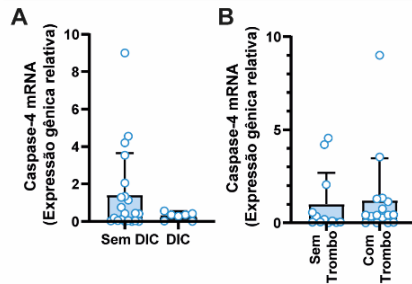


**Figura 48. A caspase-4 é regulada positivamente em pacientes com COVID-19 e ativada durante a infecção por SARS-CoV-2.** (A) Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs) foram isoladas de sangue fresco de Controles Saudáveis (n=9) ou COVID-19 (n=13). A clivagem de caspase-4 foi avaliada por análise de Western blotting do lisado celular. Autópsias pulmonares foram obtidas de 28 casos fatais de COVID-19 que testaram negativo para coinfeções (hemocultura) durante a hospitalização. Os controles incluem amostras de 4 pacientes que faleceram devido à adenocarcinoma de pulmão (área benigna dos pulmões). (B-H) Expressão de mRNA de caspase-4 (CASP4) e outros genes inflamatórios

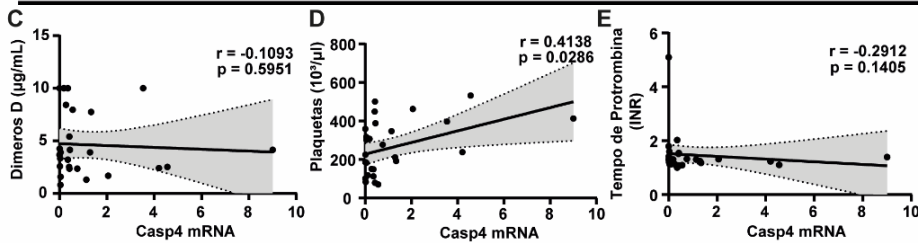


foram avaliados em autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19 por RT-PCR. (B) Expressão de CASP4 entre os pacientes COVID-19 e grupo controle. (C) Matriz de correlação da expressão do gene CASP4 e outros genes inflamatórios indicando correlação forte positiva (vermelho), correlação moderada positiva (laranja) e correlação fraca positiva (amarelo). (D-H) Correlações de CASP4 com CASP1 (D), IL-1 $\beta$  (E), IL-18 (F), IL-6 (G) e TNF (H). (I) A coloração multiplex por imuno-histoquímica ilustra a expressão de CASP4 (anti-Caspase-4), CASP1 (anti-Caspase-1) e proteína Spike SARS-CoV-2 (anti-Spike) no tecido pulmonar de um paciente com COVID-19. Barra de escala 20  $\mu$ m.

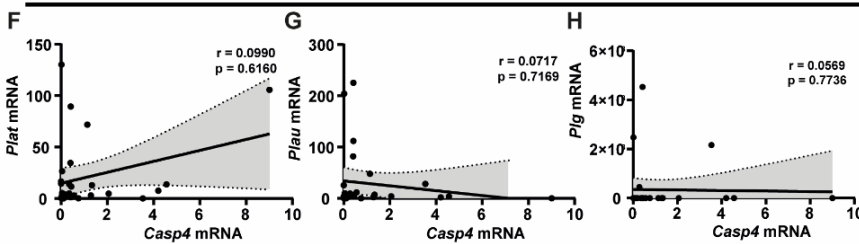
Marcadores Clínicos de Coagulação



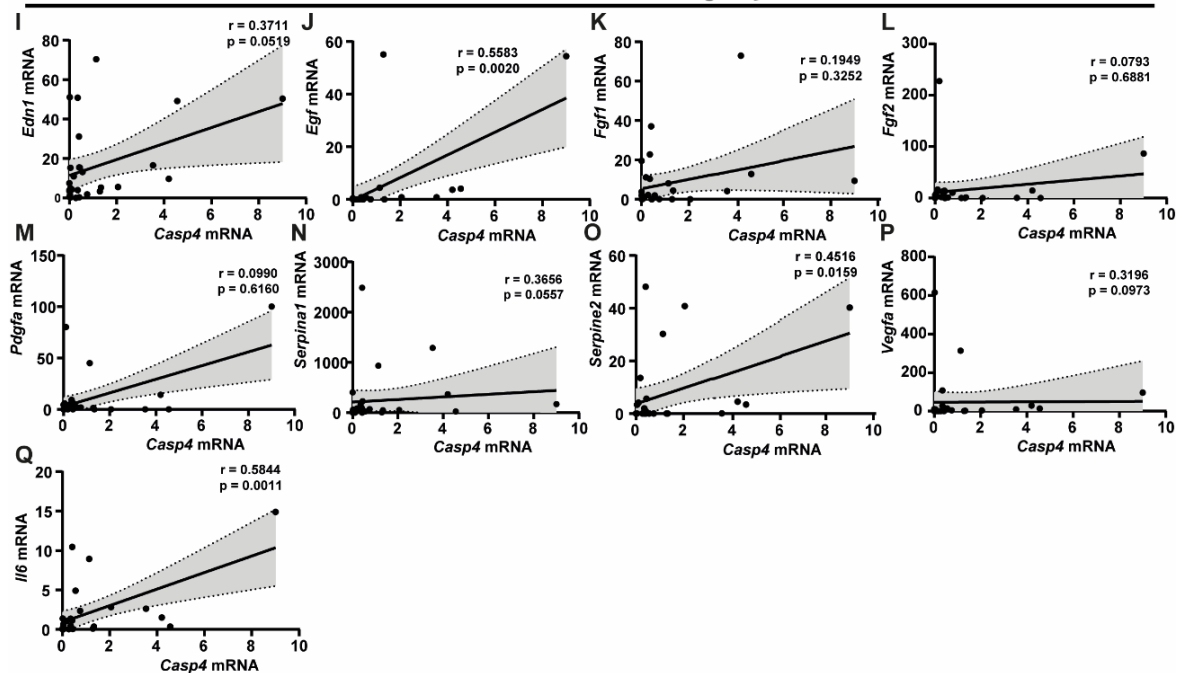
Marcadores Bioquímicos de Coagulação



Genes Relacionados a Fibrinólise



Genes Relacionados a Coagulação

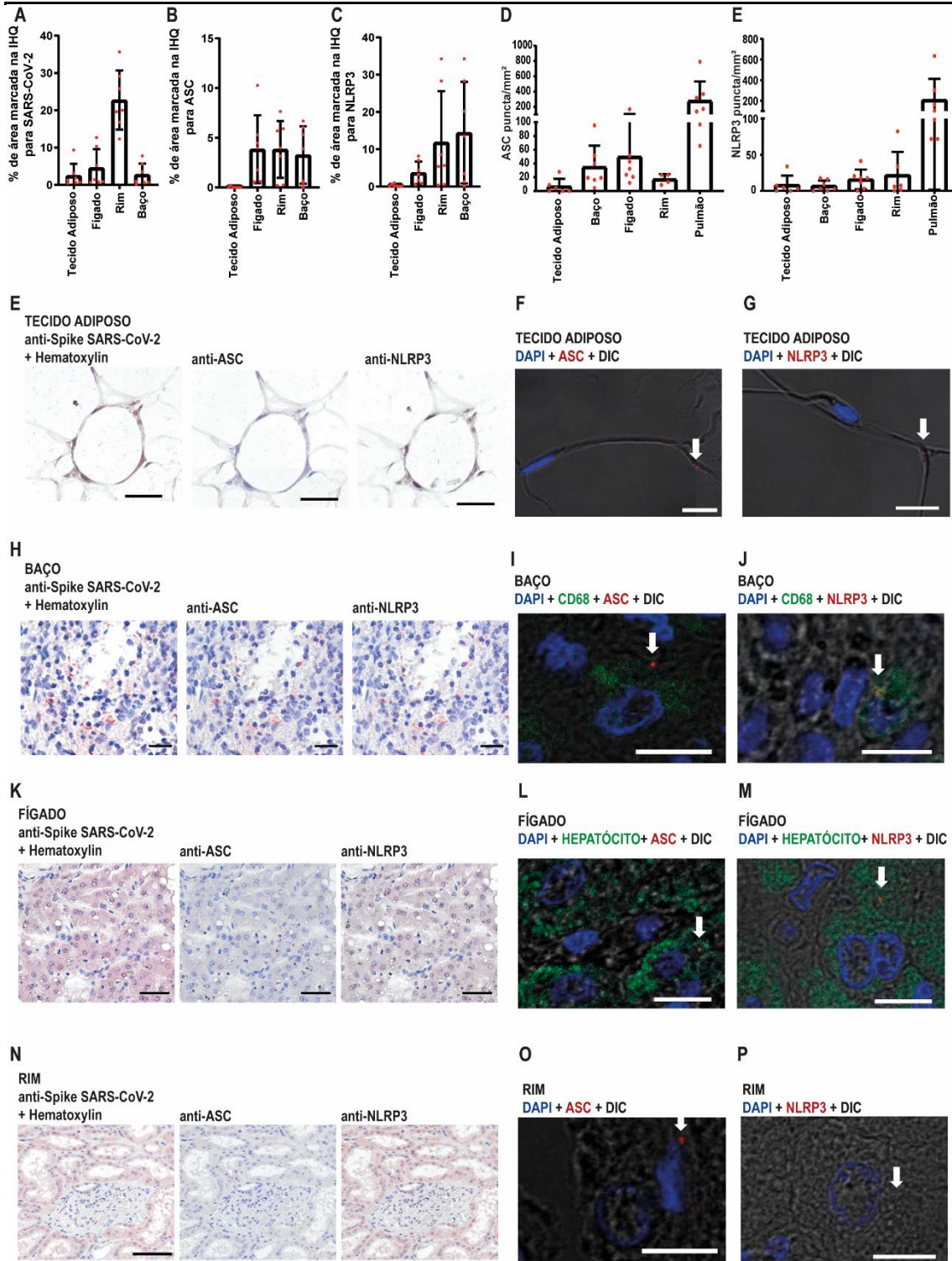


**Figura 49. Expressão de caspase-4 não está associada à coagulação em pacientes com COVID-19.** Marcadores clínicos, sorológicos e gênicos para coagulação de 28 casos fatais de COVID-19 que testaram negativo para coinfeções (hemocultura) durante a hospitalização. (A) Expressão gênica de Caspase-4 em pacientes com Coagulação Disseminada Intravascular (DIC). (B) Expressão de Caspase-4 entre os pacientes que apresentaram formação de trombo ou não nas análises histológicas do pulmão. (C-E) Correlação de Dímero-D (C), Plaquetas (D) e Tempo de Protrombina (E). Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs) foram isoladas de sangue fresco de Controles Saudáveis (n=9) ou COVID-19 (n=13). Correlação de Caspase-4 com Edn1 (F), Egf (G), Fgf1 (H), Fgf2 (I), Pdgfa (J), Serpina1 (K), Serpine2 (L), Vegfa (M) e Il6 (N).

*14.7 A ativação do inflamassoma ocorre de forma sistêmica, podendo levar ao envolvimento de diversos órgãos.*

O fenótipo hiper inflamatório da COVID-19 é caracterizado por concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias e envolvimento sistêmico com falência de múltiplos órgãos e altas taxas de mortalidade (Ramos-Casals *et al.*, 2021). Não se sabe por que alguns pacientes com COVID-19 grave entram rapidamente em um estado de falência múltipla de órgãos. Para entender se a ativação do inflamassoma estaria envolvida nesse processo, avaliamos amostras de biópsia de rim, fígado, baço e tecido adiposo.

Em nossa coorte, os pacientes com COVID-19 apresentaram distúrbios de coagulação, insuficiência hepática e danos nos rins (**Tabela 3**). Observamos que por imuno-histoquímica há marcação positiva para Spike nesses tecidos (**Figura 50A**), assim como marcação para ASC (**Figura 50B**) e NLRP3 (**Figura 50C**) e que essas marcações colocalizam (**Figura 50E, H, K, N**). Além da expressão proteica desses marcadores, também observamos a ativação dos inflamassomas (**Figura 50D, E**) no tecido adiposo (**Figura 50F, G**), baço (**Figura 50I, J**), fígado (**Figura 50L, M**) e rim (**Figura 50O, P**). Esses achados apoiam a hipótese de que a ativação do inflamassoma ocorre sistemicamente em pacientes com COVID-19 e pode estar associada à falência de múltiplos órgãos e altas taxas de mortalidade.



**Figura 50. Ativação sistêmica do inflamassoma em casos letais de COVID-19.** Imuno-histoquímica de biópsias de pacientes com COVID-19. Os tecidos foram corados com anti-Spike, anti-ASC e anti-NLRP3. Quantificação da porcentagem de área corada para spike (A), ASC (B) ou NLRP3 (C) em biópsias. Imagens representativas mostrando marcação para NLRP3 ou ASC em biópsias de tecido adiposo (E), baço (H), fígado (K), rim (N). (D-E) Microscopia multifotôn de biópsias de pacientes com COVID-19. Os tecidos foram marcados com anti-ASC e anti-NLRP3. Quantificação de células com puncta de ASC (D) ou NLRP3 (E) nas biópsias. Cada ponto na figura representa o valor obtido de cada indivíduo. \*,  $P < 0,05$  comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste de Kruskal-Wallis. Imagens representativas mostrando puncta de NLRP3 ou ASC em vermelho (indicado por uma seta branca) em biópsias de tecido adiposo (F-G), baço (I-J), fígado (L-M), rim (O-P). DAPI cora os núcleos das células (azul), barra de escala de 20  $\mu\text{m}$ . As imagens foram adquiridas por microscopia multifotônica usando uma objetiva de imersão em óleo de 63x e analisadas usando o software ImageJ.

## 15. DISCUSSÃO

Embora o SARS-CoV-2 e o vírus da influenza compartilhem muitas semelhanças, incluindo a transmissão, replicação e sintomas clínicos semelhantes em humanos, o COVID-19 pode ser significativamente mais grave em indivíduos não vacinados (Manzanares-Meza and Medina-Contreras, 2020; Godaert *et al.*, 2021; Fröhlich *et al.*, 2022; Taniguchi *et al.*, 2022). Os mecanismos que levam a essas diferenças são desconhecidos, e a informação de que a ativação exacerbada do inflamassoma medeia a patologia do COVID-19 (Rodrigues *et al.*, 2021; Junqueira *et al.*, 2022; Sefik *et al.*, 2022) nos levou a comparar a ativação do inflamassoma em pacientes com COVID-19 com outras doenças virais pulmonares. Dessa forma, avaliamos amostras pulmonares de casos letais de COVID-19 e influenza e determinamos o perfil celular de ativação do inflamassoma nos pulmões dos pacientes. Os casos letais de COVID-19 exibiram uma maior ativação global do inflamassoma, além de terem um perfil de ativação celular diferente, em comparação com casos letais de influenza. Esse perfil diferente de ativação do inflamassoma pode ser parcialmente explicado pelo tropismo de cada vírus. Enquanto o vírus influenza infecta quase exclusivamente pneumócitos (Weinheimer *et al.*, 2012; Ogiwara *et al.*, 2014), com menor envolvimento de macrófagos, o SARS-CoV-2 associa-se a uma ampla gama de células imunes, incluindo macrófagos e células estruturais, como pneumócitos tipo 2, células caliciformes e células endoteliais (Bhatnagar *et al.*, 2021; Pei *et al.*, 2021; Ramos Da Silva *et al.*, 2021). Assim, é possível que o grande número de tipos celulares que podem ser infectados pelo SARS-CoV-2 possa ser um fator determinante para o aumento da ativação do inflamassoma observado em casos fatais de COVID-19 em relação aos casos fatais de influenza.

A ativação reduzida do inflamassoma em pacientes com influenza pode ser parcialmente explicada pela proteína NS1 do vírus influenza A, que inibe o inflamassoma NLRP3 ao suprimir a ubiquitinação de ASC (Park *et al.*, 2018). Além disso, a ativação do inflamassoma é responsável pela imunidade antiviral protetora na infecção por influenza (Schmitz *et al.*, 2005; Ichinohe *et al.*, 2009), enquanto um papel protetor do inflamassoma nunca foi relatado para COVID-19. Portanto, é possível que pacientes com influenza com maior ativação do inflamassoma evoluam para uma resolução da infecção; como resultado, esses pacientes não procuram internações, o que muitas vezes ocorre com pacientes COVID-19.

Entre os mecanismos que levam a ativação do inflamassoma na infecção pelo SARS-CoV-2, podemos destacar que as proteínas virais N (Pan *et al.*, 2021), ORF3a (Siu

*et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2022) e ORF8b (Shi *et al.*, 2019) interagem diretamente com o NLRP3 levando à sua ativação, secreção de IL-1 $\beta$ , piroptose e danos pulmonares. Além disso, a infecção por SARS-CoV-2 causa a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (D'agnillo *et al.*, 2021), um conhecido ativador do inflamassoma NLRP3 (Dostert *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011).

No pulmão, macrófagos alveolares e macrófagos intersticiais interagem constantemente com células epiteliais, células endoteliais, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos e células-tronco ou progenitoras teciduais para regular a homeostase pulmonar e a imunidade inata e adaptativa contra patógenos (Misharin *et al.*, 2011). Devido a essa interação celular, extremamente importante para a ativação e regulação do processo inflamatório, optamos por avaliar a ativação do inflamassoma em diferentes tipos celulares.

Os macrófagos são possivelmente os tipos de células mais eficazes que desencadeiam a ativação do inflamassoma (Broz and Dixit, 2016); De acordo com essas informações, nossos dados mostraram que macrófagos nos pulmões de pacientes com COVID-19 e influenza são infectados e induzem uma alta ativação do inflamassoma. Esses dados estão de acordo com artigos publicados anteriormente indicando altos níveis de RNA viral em monócitos e macrófagos pulmonares de pacientes com COVID-19 (Delorey *et al.*, 2021; Pontelli *et al.*, 2022), bem como ativação pronunciada do inflamassoma em macrófagos de pacientes com COVID-19 (Rodrigues *et al.*, 2021; Junqueira *et al.*, 2022; Sefik *et al.*, 2022) e aumento da secreção de IL-1 $\beta$  e produção de IL-6 dependente da ativação do inflamassoma NLRP3 pelo proteína viral N12 e proteína spike (Theobald *et al.*, 2021).

Em contraste, o vírus influenza, que efetivamente se replica nos pneumócitos tipo I e tipo II, promove a ativação do inflamassoma e a depleção dessas células nos pulmões dos casos fatais de influenza. É possível que o inflamassoma e a piroptose de pneumócitos tipo I e II durante a infecção por influenza contribuam para os sintomas clínicos e desfechos clínicos dessa doença. É importante ressaltar que esse parece ser o primeiro relato de ativação do inflamassoma em pneumócitos tipo 1 e tipo 2 no pulmão, uma vez que a descrição da ativação do inflamassoma em pneumócitos foi anteriormente restrita à linhagem de células A549 (Wang *et al.*, 2016; Furukawa *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2021). Notavelmente, a ativação do inflamassoma em pneumócitos é mais pronunciada em pacientes infectados com o vírus influenza. É possível que a ativação do inflamassoma em pneumócitos seja favorecida pelo tropismo do vírus influenza nessas células (Weinheimer *et al.*, 2012; Ogiwara *et al.*, 2014).

Nossos dados mostram que as células endoteliais expostas ao SARS-CoV-2 expressam proteínas do inflamassoma e contêm puncta de NLRP3/ASC, demonstrando assim a ativação do inflamassoma. Apesar de relatos indicando que as células endoteliais não são produtivamente infectadas pelo SARS-CoV-2 (Schimmel *et al.*, 2021), precursores de células hematopoiéticas e endoteliais estimuladas com a proteína spike SARS-CoV-2 aumentam a expressão de AIM2, NLRP1, NLRP3, IL-1 $\beta$  e ASC e desencadeiam a ativação da caspase-1 (Kucia *et al.*, 2021; Ratajczak *et al.*, 2021). Além disso, a ativação do inflamassoma em células endoteliais foi relatada anteriormente (Xiang *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016; Paul *et al.*, 2021). Essas observações são consistentes com nossos dados que indicam a expressão de componentes do inflamassoma e a ativação do inflamassoma em células CD34+ nos pulmões de pacientes com COVID-19. Embora essas células tenham sido positivas para a proteína spike SARS-CoV-2, não se sabe se a infecção e a replicação viral são necessárias para a ativação do inflamassoma nessas células. É possível que o ambiente inflamatório seja suficiente para a ativação do inflamassoma (Xu *et al.*, 2020). Esses achados são importantes porque o endotélio vascular está ativamente envolvido na regulação da inflamação e formação de trombos, uma vez que a interação entre a ativação do inflamassoma nos macrófagos e o endotélio pode levar os macrófagos piroptóticos a liberarem o fator tecidual, um iniciador essencial das cascatas de coagulação (Wu *et al.*, 2019; Campos *et al.*, 2021; Zhang, Y. *et al.*, 2021). Dessa forma, nossos dados podem explicar alguns achados que descrevem danos e disfunções dessas células (Varga *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Nuovo *et al.*, 2021; Ward *et al.*, 2021), caracterizando a COVID-19 como uma doença endotelial (Libby and Lüscher, 2020).

Durante o processo inflamatório, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, que participam da formação e deposição da matriz extracelular. Isso ocorre como um processo de cicatrização de feridas, no entanto, a fibrose excessiva pode afetar a função fisiológica do tecido. Por exemplo, a diminuição da elasticidade do tecido pulmonar resultante da fibrose intensa afeta seriamente a função fisiológica do pulmão. As análises dos dados dos 47 pacientes com COVID-19 permitiram a classificação dos pacientes em dois grupos. O cluster 2, composto por 31 pacientes, possuíam grande ativação do inflamassoma e alta expressão de genes inflamatórios com fibrose aumentada nos pulmões dos pacientes. As citocinas inflamatórias liberadas na ativação do inflamassoma foram previamente associadas ao desenvolvimento de fibrose pulmonar (Xiang *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016; Libby and Lüscher, 2020; Nuovo *et al.*, 2021; Ward *et al.*, 2021). Além disso, citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-1 $\alpha$  foram

descritas como desencadeadoras da ativação de fibroblastos e estimuladoras da síntese e acúmulo de colágeno tipo I, TIMP, colagenase e PGE2 (Wu *et al.*, 2019; Nuovo *et al.*, 2021).

Nossos achados mostraram que a carga viral nos pulmões de pacientes com COVID-19 é inversamente proporcional à duração da doença, como sugerido em estudos anteriores (Campos *et al.*, 2021; Zhang, Y. *et al.*, 2021). Além disso, nossos dados indicam que o aumento do tempo de doença está associado ao aumento da ativação do inflamassoma e a redução da carga viral, o que implica em uma resposta imune desregulada na qual a inflamação persiste, enquanto a carga viral diminui. Nesse contexto, é possível que a ativação do inflamassoma nesses pacientes ocorra não pela própria infecção viral, mas pela presença de padrões moleculares associados a danos gerados durante o processo inflamatório. Também testamos se a ventilação mecânica usada em pacientes com COVID-19 interferiria na ativação do inflamassoma. Essa hipótese é apoiada por dados que indicam que a hiperóxia induzida pela ventilação mecânica pode induzir o efluxo de potássio através do receptor P2X7, levando à ativação do inflamassoma e à secreção de citocinas pró-inflamatórias (Wang *et al.*, 2016; Furukawa *et al.*, 2019; Sinha *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2021; Robinot *et al.*, 2021). No entanto, quando separamos os pacientes com COVID-19 em dois grupos de acordo com o uso ou não de ventilação mecânica, não detectamos diferenças nas análises histopatológicas e na ativação do inflamassoma (**Tabela 6**). Além disso, confirmamos que os pacientes submetidos à ventilação mecânica apresentavam maior tempo de doença, maior hipertensão, menos Proteína C Reativa e albumina, maiores quantidades de ureia e piora da função pulmonar (de acordo com  $PaO_2/FiO_2$  e gradiente A-a  $O_2$ ). Assim, nossos dados não suportam a hipótese de que a ventilação mecânica esteja diretamente associada à ativação do inflamassoma.

Foi demonstrado que autópsias de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam níveis mais elevados de Gasdermina-D clivada, um indicador da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , e morte celular por piroptose (Zhang, J. *et al.*, 2021). Além de a ativação do inflamassoma e a piroptose contribuírem para a tempestade de citocinas associada ao SARS-CoV-2 (Iyer *et al.*, 2009; Zhang, J. *et al.*, 2021). Esses dados corroboram com os nossos, onde observamos que uma grande ativação do inflamassoma está relacionada à síndrome de liberação de citocinas, aumento da fibrose pulmonar e pior função pulmonar (pacientes do Cluster 2). Uma vez que a liberação de IL-1 $\beta$ , está relacionada ao recrutamento de células pró-inflamatórias que em casos extremos causa dano tecidual e fibrose pulmonar (Patton *et al.*, 1995; Kolb *et al.*, 2001;

Grailer *et al.*, 2014). Nossa hipótese é que a ocorrência de secreção de IL-1 $\beta$  por células endoteliais e pneumócitos, bem como piroptose por macrófagos, poderia contribuir para a manutenção do ambiente inflamatório no pulmão.

Os pacientes com COVID-19 são mais velhos que os pacientes com influenza. A idade desses pacientes também pode contribuir para esse ambiente mais inflamatório, pois o aumento da atividade de ASC, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , IL-18 e ROS tem sido observado no pulmão envelhecido (Stout-Delgado *et al.*, 2016; Lara *et al.*, 2020), levando os idosos a uma predisposição a reagir exageradamente a infecção, mostrando uma cascata de inflamação extrema, que parece não ser totalmente controlada fisiologicamente (Lara *et al.*, 2020). Essa inflamação intensa pode levar à liberação de novos DAMPS, formando um loop de feedback positivo.

Sabe-se que diferentes órgãos são infectados pelo vírus SARS-CoV-2 (Wang, Y. *et al.*, 2020; Helms *et al.*, 2021; Jansen *et al.*, 2021; Reiterer *et al.*, 2021), uma vez que o tropismo celular desse vírus está associado principalmente a tipos celulares que expressam seu receptor ACE2 (Zou *et al.*, 2020). Pouco se sabe sobre a relevância da ativação do inflamassoma nesses tecidos, dessa forma avaliamos amostras de tecidos de pacientes diagnosticados com SARS-CoV-2 e observamos a expressão e ativação do inflamassoma ASC e NLRP3 no tecido adiposo, baço, rim e fígado de esses pacientes. As análises laboratoriais identificaram valores sorológicos mais elevados do que o habitual para D-dímero, creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose e lactato desidrogenase (LDH) indicando um processo de lesão hepática e renal, bem como alteração no processo de coagulação. A hiperglicemia observada nesses pacientes também pode estar relacionada à disfunção do tecido adiposo (Reiterer *et al.*, 2021). Esse achado mostra que a ativação do inflamassoma pode estar associada a um perfil extremamente pró-inflamatório que causa danos teciduais não apenas no pulmão, mas de forma sistêmica.



## 16. CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos pela primeira vez um perfil celular de ativação do inflamassoma em amostras de biópsia pulmonar de pacientes que morreram de COVID-19 e influenza. Esses dados abrem novas perspectivas sobre as diferenças encontradas nas duas doenças, bem como novos *insights* sobre o papel da ativação do inflamassoma em diferentes tecidos e tipos celulares e como ocorre a interação dessas células no microambiente inflamatório. É importante ressaltar que a identificação de dois perfis distintos em casos letais de COVID-19 (que revelaram o equilíbrio de cargas virais versus inflamação pulmonar mediada por inflamassoma) será fundamental para decisões entre terapias imunomediadas ou mediadas por antivirais para o tratamento de casos críticos da COVID-19.

## 17. REFERÊNCIAS

A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. **Bull World Health Organ**, v. 58, n. 4, p. 585-91, 1980. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686.

ABDIN, S. M. et al. Tackling the cytokine storm in COVID-19, challenges and hopes. **Life Sci**, v. 257, p. 118054, Sep 15 2020. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

ABOU FAKHER, F. H. et al. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. **J Immunol**, v. 182, n. 3, p. 1386-96, Feb 1 2009. ISSN 0022-1767.

ABREU-SILVA, A. L. et al. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. **Parasitology**, v. 128, n. Pt 4, p. 385-90, Apr 2004. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820.

AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J Immunol**, v. 169, n. 2, p. 898-905, Jul 15 2002. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

AGLIETTI, R. A. et al. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 28, p. 7858-63, Jul 12 2016. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

AKARID, K. et al. *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 1, p. 95-103, Jul 2004. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul 2004. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733.

ALLEN, I. C. et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 556-65, Apr 17 2009. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613.

ALMEIDA, A.; CODEÇO, C.; LUZ, P. M. Seasonal dynamics of influenza in Brazil: the latitude effect. **BMC Infect Dis**, v. 18, n. 1, p. 695, Dec 27 2018. ISSN 1471-2334.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. ISSN 1932-6203.

AMBIT, A. et al. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 11, p. 1429-38, Nov 2011. ISSN 1535-9778 (Print) 1535-9786.

AMORIM, M. J. et al. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. **J Virol**, v. 85, n. 9, p. 4143-56, May 2011. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 6734-40, Dec 2002. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

BATAH, S. S.; FABRO, A. T. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. **Respir Med**, v. 176, p. 106239, Jan 2021. ISSN 0954-6111 (Print) 0954-6111.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr Mol Med**, v. 4, n. 6, p. 601-9, Sep 2004. ISSN 1566-5240 (Print) 1566-5240.

BEATTIE, L. et al. Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani*-induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8 T cells. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 3, p. e1000805, Mar 12 2010. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

BHATNAGAR, J. et al. Evidence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication and Tropism in the Lungs, Airways, and Vascular Endothelium of Patients With Fatal Coronavirus Disease 2019: An Autopsy Case Series. **J Infect Dis**, v. 223, n. 5, p. 752-764, Mar 3 2021. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899.

BI, Q. et al. Epidemiology and transmission of COVID-19 in 391 cases and 1286 of their close contacts in Shenzhen, China: a retrospective cohort study. **Lancet Infect Dis**, v. 20, n. 8, p. 911-919, Aug 2020. ISSN 1473-3099 (Print) 1473-3099.

BLANCO-MELO, D. et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1036-1045.e9, May 28 2020. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

BOAL-CARVALHO, I. et al. Influenza A viruses limit NLRP3-NEK7-complex formation and pyroptosis in human macrophages. **EMBO Rep**, v. 21, n. 12, p. e50421, Dec 3 2020. ISSN 1469-221X (Print) 1469-221x.

BOHULA, E. A. et al. Anticoagulation and Antiplatelet Therapy for Prevention of Venous and Arterial Thrombotic Events in Critically Ill Patients with COVID-19: COVID-PACT. **Circulation**, Aug 29 2022. ISSN 0009-7322.

BOS, T. J.; DAVIS, A. R.; NAYAK, D. P. NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic region of influenza virus neuraminidase provides the signal function in translocation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 8, p. 2327-31, Apr 1984. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

BRADLEY, B. T. et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. **Lancet**, v. 396, n. 10247, p. 320-332, Aug 1 2020. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736.

BRANN, D. H. et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. **Sci Adv**, v. 6, n. 31, Jul 31 2020. ISSN 2375-2548.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. D. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. TRANSMISSÍVEIS, D. D. V. D. D. Brasília: Ministério da Saúde 2017.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. D. **Boletim Epidemiológico 07**. SAÚDE, S. D. V. E. <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/boletins-epidemiologicos-1/abr/2020-04-06-be7-boletim-especial-do-coe-atualizacao-da-avaliacao-de-risco.pdf/view>. 2022 2020.

BRODSKY, I. E. et al. A Yersinia effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. **Cell Host Microbe**, v. 7, n. 5, p. 376-87, May 20 2010. ISSN 1931-3128 (Print) 1931-3128.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 7, p. 407-20, Jul 2016. ISSN 1474-1733.

BRYSON, K. J.; WEI, X. Q.; ALEXANDER, J. Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice. **Microbes Infect**, v. 10, n. 7, p. 834-9, Jun 2008. ISSN 1286-4579 (Print) 1286-4579.

BULLOUGH, P. A. et al. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. **Nature**, v. 371, n. 6492, p. 37-43, Sep 1 1994. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

BURKE, R. M. et al. Symptom Profiles of a Convenience Sample of Patients with COVID-19 - United States, January-April 2020. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 69, n. 28, p. 904-908, Jul 17 2020. ISSN 0149-2195 (Print) 0149-2195.

BUTOWT, R.; VON BARTHELD, C. S. Anosmia in COVID-19: Underlying Mechanisms and Assessment of an Olfactory Route to Brain Infection. **Neuroscientist**, v. 27, n. 6, p. 582-603, Dec 2021. ISSN 1073-8584 (Print)

1073-8584.

BÖSMÜLLER, H. et al. The pulmonary pathology of COVID-19. *Virchows Arch*, v. 478, p. 137–150, 2021. ISSN 1.

CAI, Q. et al. Obesity and COVID-19 Severity in a Designated Hospital in Shenzhen, China. *Diabetes Care*, v. 43, n. 7, p. 1392-1398, Jul 2020. ISSN 0149-5992.

CAMA, V. F. et al. The microglial NLRP3 inflammasome is involved in human SARS-CoV-2 cerebral pathogenicity: A report of three post-mortem cases. *J Neuroimmunol*, v. 361, p. 577728, Dec 15 2021. ISSN 0165-5728 (Print) 0165-5728.

CAMPOS, J. et al. Neutrophil extracellular traps and inflammasomes cooperatively promote venous thrombosis in mice. *Blood Adv*, v. 5, n. 9, p. 2319-2324, May 11 2021. ISSN 2473-9529 (Print) 2473-9529.

CARDOSO, T. M. et al. Inflammasome Activation by CD8(+) T Cells from Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in the Immunopathogenesis of the Disease. *J Invest Dermatol*, v. 141, n. 1, p. 209-213.e2, Jan 2021. ISSN 0022-202x.

CARRAT, F. et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *Am J Epidemiol*, v. 167, n. 7, p. 775-85, Apr 1 2008. ISSN 0002-9262.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION , N. C. F. I. A. R. D. N. **Disease Burden of Flu 2021.**

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, v. 5, n. 11, p. 873-82, Nov 2007. ISSN 1740-1526.

CHARMOY, M. et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 2, p. e1000755, Feb 5 2010. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

\_\_\_\_\_. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 $\beta$ , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *Eur J Immunol*, v. 46, n. 4, p. 897-911, Apr 2016. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980.

CHAVES, M. M. et al. The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection transmitted by sand fly bite. *PLoS Pathog*, v. 16, n. 11, p. e1008674, Nov 2020. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

\_\_\_\_\_. Non-canonical NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  signaling are necessary to *L. amazonensis* control mediated by P2X7 receptor and leukotriene B4. *PLoS Pathog*, v. 15, n. 6, p. e1007887, Jun 2019. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **J Clin Invest**, v. 130, n. 5, p. 2620-2629, May 1 2020. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32217835> >.

CHEN, H. et al. SARS-CoV-2 activates lung epithelial cell proinflammatory signaling and leads to immune dysregulation in COVID-19 patients. **EBioMedicine**, v. 70, p. 103500, Aug 2021. ISSN 2352-3964.

CHEN, K. W. et al. Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP3 inflammasome assembly. **Embo j**, v. 38, n. 10, May 15 2019. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189.

\_\_\_\_\_. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. **Sci Immunol**, v. 3, n. 26, Aug 24 2018. ISSN 2470-9468.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-513, Feb 15 2020. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736.

CHEN, X. et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. **Cell Res**, v. 26, n. 9, p. 1007-20, Sep 2016. ISSN 1001-0602 (Print) 1001-0602.

CHI, Y. et al. Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. **J Infect Dis**, v. 222, n. 5, p. 746-754, Aug 4 2020. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32563194> >.

CHOU, S. H.-Y. et al. Global Incidence of Neurological Manifestations Among Patients Hospitalized With COVID-19—A Report for the GCS-NeuroCOVID Consortium and the ENERGY Consortium. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 5, p. e2112131-e2112131, 2021. ISSN 2574-3805. Available at: < <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.12131> >. Accessed on: 4/29/2022.

CILLÓNIZ, C. et al. Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 10, p. e1000604, Oct 2009. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

COHEN, M. et al. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. **Virol J**, v. 10, p. 321, Nov 22 2013. ISSN 1743-422x.

COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. In: (Ed.). **Trends Microbiol**. England, v.9, 2001. p.113-4. ISBN 0966-842X (Print) 0966-842X (Linking).

- CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Euro Surveill**, v. 25, n. 3, Jan 2020. ISSN 1025-496X (Print) 1025-496x.
- COWLING, B. J. et al. Aerosol transmission is an important mode of influenza A virus spread. **Nat Commun**, v. 4, p. 1935, 2013. ISSN 2041-1723.
- CROS, J. F.; GARCÍA-SASTRE, A.; PALESE, P. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. **Traffic**, v. 6, n. 3, p. 205-13, Mar 2005. ISSN 1398-9219 (Print) 1398-9219.
- CUI, H.; ZHANG, L. Key Components of Inflammasome and Pyroptosis Pathways Are Deficient in Canines and Felines, Possibly Affecting Their Response to SARS-CoV-2 Infection. **Front Immunol**, v. 11, p. 592622, 2020. ISSN 1664-3224.
- CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nat Rev Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 181-192, Mar 2019. ISSN 1740-1526 (Print) 1740-1526.
- CUNHA, L. D. et al. Inhibition of inflammasome activation by *Coxiella burnetii* type IV secretion system effector IcaA. **Nat Commun**, v. 6, p. 10205, Dec 21 2015. ISSN 2041-1723.
- \_\_\_\_\_. AIM2 Engages Active but Unprocessed Caspase-1 to Induce Noncanonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Rep**, v. 20, n. 4, p. 794-805, Jul 25 2017.
- D'AGNILLO, F. et al. Lung epithelial and endothelial damage, loss of tissue repair, inhibition of fibrinolysis, and cellular senescence in fatal COVID-19. **Sci Transl Med**, p. eabj7790, Oct 14 2021. ISSN 1946-6234.
- DANELISHVILI, L. et al. Inhibition of the Plasma-Membrane-Associated Serine Protease Cathepsin G by *Mycobacterium tuberculosis* Rv3364c Suppresses Caspase-1 and Pyroptosis in Macrophages. **Front Microbiol**, v. 2, p. 281, 2011. ISSN 1664-302x.
- DANIELS, R. et al. N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. **Mol Cell**, v. 11, n. 1, p. 79-90, Jan 2003. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765.
- DATASUS. TABNET. <https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>, 2022.
- DE CARVALHO, R. V. H. et al. Leishmania Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the Non-canonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Rep**, v. 26, n. 2, p. 429-437.e5, Jan 8 2019.
- \_\_\_\_\_. Leishmania RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 5273, Nov 21 2019. ISSN 2041-1723.
- \_\_\_\_\_. Endosymbiotic RNA virus inhibits Leishmania-induced caspase-11 activation. **iScience**, v. 24, n. 1, p. 102004, Jan 22 2021. ISSN 2589-0042.

\_\_\_\_\_. Macrophage priming is dispensable for NLRP3 inflammasome activation and restriction of *Leishmania amazonensis* replication. **J Leukoc Biol**, v. 106, n. 3, p. 631-640, Sep 2019. ISSN 0741-5400.

DE CASTRO MARTIN, I. F. et al. Influenza virus genome reaches the plasma membrane via a modified endoplasmic reticulum and Rab11-dependent vesicles. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 1396, Nov 9 2017. ISSN 2041-1723.

DE JONG, M. D. et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. **Nat Med**, v. 12, n. 10, p. 1203-7, Oct 2006. ISSN 1078-8956 (Print)  
1078-8956.

DE TREZ, C. et al. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania* major infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 6, p. e1000494, Jun 2009. ISSN 1553-7366 (Print)  
1553-7366.

DELOREY, T. M. et al. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. **Nature**, v. 595, n. 7865, p. 107-113, Jul 2021. ISSN 0028-0836.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 1, p. 35-41, Jan 2005. ISSN 1471-4922 (Print)  
1471-4922.

DING, J. et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 111-6, Jul 7 2016. ISSN 0028-0836.

DOLINAY, T. et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 11, p. 1225-34, Jun 1 2012. ISSN 1073-449X (Print)  
1073-449x.

DONOVAN, M. J. et al. *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. **Exp Parasitol**, v. 123, n. 1, p. 58-64, Sep 2009. ISSN 0014-4894 (Print)  
0014-4894.

DOSTERT, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 674-7, May 2 2008. ISSN 0036-8075 (Print)  
0036-8075.

DOTSON, R. J. et al. Repression of inflammasome by *Francisella tularensis* during early stages of infection. **J Biol Chem**, v. 288, n. 33, p. 23844-57, Aug 16 2013. ISSN 0021-9258 (Print)  
0021-9258.



DU, R. et al. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. In: (Ed.). **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, 2016. p.e0004545. ISBN 1935-2735 (Electronic)  
1935-2727 (Print)  
1935-2727 (Linking).

EISFELD, A. J. et al. RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. **J Virol**, v. 85, n. 13, p. 6117-26, Jul 2011. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

EISFELD, H. S. et al. Viral Glycoproteins Induce NLRP3 Inflammasome Activation and Pyroptosis in Macrophages. **Viruses**, v. 13, n. 10, Oct 15 2021. ISSN 1999-4915.

EVAVOLD, C. L. et al. Control of gasdermin D oligomerization and pyroptosis by the Regulator-Rag-mTORC1 pathway. **Cell**, v. 184, n. 17, p. 4495-4511.e19, Aug 19 2021. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

\_\_\_\_\_. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 35-44.e6, Jan 16 2018. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613.

FATOUX-ARDORE, M. et al. Large-scale investigation of Leishmania interaction networks with host extracellular matrix by surface plasmon resonance imaging. **Infect Immun**, v. 82, n. 2, p. 594-606, Feb 2014. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

FERREIRA, A. C. et al. SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. **Cell Death Discov**, v. 7, n. 1, p. 43, Mar 1 2021. ISSN 2058-7716 (Print) 2058-7716.

FINDLAY, R. C. et al. High-speed, three-dimensional imaging reveals chemotactic behaviour specific to human-infective Leishmania parasites. **Elife**, v. 10, Jun 28 2021. ISSN 2050-084x.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 11, p. 1812-25, Nov 2006. ISSN 1462-5814 (Print) 1462-5814.

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 2, p. 411-20, Feb 2006. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980.

FLERLAGE, T. et al. Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 425-441, 2021/07/01 2021. ISSN 1740-1534. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00542-7> >.

FRANCO, L. H. et al. Autophagy downstream of endosomal Toll-like receptor signaling in macrophages is a key mechanism for resistance to *Leishmania major* infection. **J Biol Chem**, v. 292, n. 32, p. 13087-13096, Aug 11 2017. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

FRÖHLICH, G. M. et al. Hospital outcomes of community-acquired COVID-19 versus influenza: Insights from the Swiss hospital-based surveillance of influenza and COVID-19. **Euro Surveill**, v. 27, n. 1, Jan 2022. ISSN 1025-496x.

FURUKAWA, S. et al. NLRP3 upregulation in A549 cells co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxia via deregulated TGF- $\beta$  signaling. **Exp Cell Res**, v. 383, n. 1, p. 111506, Oct 1 2019. ISSN 0014-4827.

GALANI, I. E. et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. **Nat Immunol**, v. 22, n. 1, p. 32-40, Jan 2021. ISSN 1529-2908.

GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol**, v. 167, n. 2, p. 893-901, Jul 15 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

GAZIT, R. et al. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. **Nat Immunol**, v. 7, n. 5, p. 517-23, May 2006. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908.

GLASS, G.; PAPIN, J. A.; MANDELL, J. W. SIMPLE: a sequential immunoperoxidase labeling and erasing method. **J Histochem Cytochem**, v. 57, n. 10, p. 899-905, Oct 2009. ISSN 0022-1554 (Print) 0022-1554.

GLUENZ, E. et al. Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. **Faseb j**, v. 24, n. 9, p. 3117-21, Sep 2010. ISSN 0892-6638 (Print) 0892-6638.

GODAERT, L. et al. COVID-19 versus Seasonal Influenza: Comparison of Profiles of Older Adults Hospitalized in a Short-Term Geriatric Ward in France. **Am J Trop Med Hyg**, v. 106, n. 1, p. 108-113, Dec 2 2021. ISSN 0002-9637.

GONZÁLEZ, I. J. et al. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 2, p. 161-72, Feb 2007. ISSN 0020-7519 (Print) 0020-7519.

GRAHAM, E. L. et al. Persistent neurologic symptoms and cognitive dysfunction in non-hospitalized Covid-19 “long haulers”. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 8, n. 5, p. 1073-1085, 2021. ISSN 2328-9503. Available at: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/acn3.51350> >.

- GRAILER, J. J. et al. Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. **J Immunol**, v. 192, n. 12, p. 5974-83, Jun 15 2014. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.
- GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130 Suppl, p. S27-35, 2005. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820.
- GUARDA, G. et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. **J Immunol**, v. 186, n. 4, p. 2529-34, Feb 15 2011. ISSN 0022-1767.
- GUILLIGAY, D. et al. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. **Nat Struct Mol Biol**, v. 15, n. 5, p. 500-6, May 2008. ISSN 1545-9985.
- GUPTA, P. et al. *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis and pro-inflammatory response through AKT-mediated regulation of  $\beta$ -catenin and FOXO-1. **Cell Death Differ**, v. 23, n. 11, p. 1815-1826, Nov 1 2016. ISSN 1350-9047 (Print) 1350-9047.
- GURUNG, P. et al. An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis. **J Clin Invest**, v. 125, n. 3, p. 1329-38, Mar 2 2015. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.
- GUTIÉRREZ-KOBEH, L. et al. Inhibition of dendritic cell apoptosis by *Leishmania mexicana* amastigotes. **Parasitol Res**, v. 112, n. 4, p. 1755-62, Apr 2013. ISSN 0932-0113.
- HADJADJ, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 718-724, Aug 7 2020. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.
- HAEBERLEIN, S. et al. IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 6, p. 1708-17, Jun 2010. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980.
- HAN, Y. et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 12, p. 11245-11258, Jun 24 2020. ISSN 1945-4589 (Electronic) 1945-4589 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32633729> >.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 8, p. 332-4, Aug 2002. ISSN 1471-4922 (Print) 1471-4922.
- HANSON, J. E. et al. Proton nuclear magnetic resonance studies of the binding of sialosides to intact influenza virus. **Virology**, v. 189, n. 2, p. 525-33, Aug 1992. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822.

HARIRI, L. P. et al. Lung Histopathology in Coronavirus Disease 2019 as Compared With Severe Acute Respiratory Syndrome and H1N1 Influenza: A Systematic Review. **Chest**, v. 159, n. 1, p. 73-84, Jan 2021. ISSN 0012-3692 (Print) 0012-3692.

HASHIMOTO, Y. et al. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. **J Immunol**, v. 178, n. 4, p. 2448-57, Feb 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

HAUENSTEIN, A. V.; ZHANG, L.; WU, H. The hierarchical structural architecture of inflammasomes, supramolecular inflammatory machines. **Curr Opin Struct Biol**, v. 31, p. 75-83, Apr 2015. ISSN 1879-033X (Electronic) 0959-440X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881155> >.

HE, W. T. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. **Cell Res**, v. 25, n. 12, p. 1285-98, Dec 2015. ISSN 1001-0602 (Print) 1001-0602.

HE, X. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nat Med**, v. 26, n. 5, p. 672-675, May 2020. ISSN 1078-8956.

HELMS, L. et al. Cross-validation of SARS-CoV-2 responses in kidney organoids and clinical populations. **JCI Insight**, v. 6, n. 24, Dec 22 2021. ISSN 2379-3708.

HENRY, B. M.; LIPPI, G. Chronic kidney disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. In: (Ed.). **Int Urol Nephrol**, v.52, 2020. p.1193-1194. ISBN 1573-2584 (Electronic) 0301-1623 (Print) 0301-1623 (Linking).

HERGUETA-REDONDO, M. et al. Gasdermin B expression predicts poor clinical outcome in HER2-positive breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56295-56308, Aug 30 2016. ISSN 1949-2553.

\_\_\_\_\_. Gasdermin-B promotes invasion and metastasis in breast cancer cells. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90099, 2014. ISSN 1932-6203.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, Apr 16 2020. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514-8, Mar 26 2009. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, Feb 15 2020. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736.

HUANG, K. J. et al. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. **J Med Virol**, v. 75, n. 2, p. 185-94, Feb 2005. ISSN 0146-6615 (Print) 0146-6615.

HURRELL, B. P. et al. Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 5, p. e1004929, May 2015. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

HÖGNER, K. et al. Macrophage-expressed IFN- $\beta$  contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 2, p. e1003188, Feb 2013. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

ICHINOHE, T. et al. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. **J Exp Med**, v. 206, n. 1, p. 79-87, Jan 16 2009. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007.

ICHINOHE, T.; PANG, I. K.; IWASAKI, A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 404-10, May 2010. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908.

ICHINOHE, T. et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 13, p. 5354-9, Mar 29 2011. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

\_\_\_\_\_. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 44, p. 17963-8, Oct 29 2013. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

ICTV. Current ICTV Taxonomy Release. <https://ictv.global/taxonomy>, 2021.

ICTV. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nat Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 536-544, Apr 2020. ISSN 2058-5276.

ISRAELOW, B. et al. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. **J Exp Med**, v. 217, n. 12, Dec 7 2020. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007.

IVES, A. et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. **Science**, v. 331, n. 6018, p. 775-8, Feb 11 2011. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

IWASAKI, A.; PILLAI, P. S. Innate immunity to influenza virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 315-328, 2014/05/01 2014. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://doi.org/10.1038/nri3665> >.

IYER, S. S. et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 48, p. 20388-93, Dec 1 2009. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

JANSEN, J. et al. SARS-CoV-2 infects the human kidney and drives fibrosis in kidney organoids. **Cell Stem Cell**, Dec 25 2021. ISSN 1934-5909 (Print) 1875-9777.

JARA, M. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of Leishmania (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 1826-33, Jun 2013. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137.

JEWELL, N. A. et al. Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo. **J Virol**, v. 81, n. 18, p. 9790-800, Sep 2007. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

Ji, J. et al. NLRP3 inflammasome activation in alveolar epithelial cells promotes myofibroblast differentiation of lung-resident mesenchymal stem cells during pulmonary fibrogenesis. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1867, n. 5, p. 166077, May 1 2021. ISSN 0925-4439.

JIANG, Y. et al. Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 8, p. 850-7, Apr 15 2005. ISSN 1073-449X (Print) 1073-449x.

JIMENEZ, A. J. et al. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. **Science**, v. 343, n. 6174, p. 1247136, Feb 28 2014. ISSN 0036-8075.

JORBA, N.; COLOMA, R.; ORTÍN, J. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 5, p. e1000462, May 2009. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

JORGENSEN, I. et al. The Chlamydia protease CPAF regulates host and bacterial proteins to maintain pathogen vacuole integrity and promote virulence. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 1, p. 21-32, Jul 21 2011. ISSN 1931-3128 (Print) 1931-3128.

\_\_\_\_\_. IL-1 $\beta$ , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. **Eur J Immunol**, v. 46, n. 12, p. 2761-2766, Dec 2016. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980.

JORGENSEN, I.; RAYAMAJHI, M.; MIAO, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 3, p. 151-164, Mar 2017. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733.

JORGENSEN, I. et al. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. **J Exp Med**, v. 213, n. 10, p. 2113-28, Sep 19 2016. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007.

JUNQUEIRA, C. et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. **Nature**, Apr 6 2022. ISSN 0028-0836.

KALLFASS, C. et al. Visualizing the beta interferon response in mice during infection with influenza A viruses expressing or lacking nonstructural protein 1. **J Virol**, v. 87, n. 12, p. 6925-30, Jun 2013. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

KASH, J. C. et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 578-81, Oct 5 2006. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

KASUGA, Y. et al. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. **Exp Mol Med**, v. 53, n. 5, p. 723-736, May 2021. ISSN 1226-3613 (Print) 1226-3613.

KAYAGAKI, N. et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. **Nature**, v. 591, n. 7848, p. 131-136, Mar 2021. ISSN 0028-0836.

\_\_\_\_\_. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666-71, Oct 29 2015. ISSN 0028-0836.

\_\_\_\_\_. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117-21, Oct 16 2011. ISSN 0028-0836.

KILLICK KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 66 Suppl 1, p. 71-4, 1991. ISSN 0003-4150 (Print) 0003-4150.

KOBASA, D. et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 319-23, Jan 18 2007. ISSN 0028-0836.

KOBAYASHI, T. et al. The *Shigella* OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 5, p. 570-583, May 15 2013. ISSN 1931-3128.

KOENIGKAM-SANTOS, M. et al. SARS-Cov-2 pneumonia phenotyping on imaging exams of patients submitted to minimally invasive autopsy. **Ann Transl Med**, v. 10, n. 3, p. 140, Feb 2022. ISSN 2305-5839 (Print) 2305-5839.

- KOLB, M. et al. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. **J Clin Invest**, v. 107, n. 12, p. 1529-36, Jun 2001. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.
- KOMMOSS, F. K. F. et al. The Pathology of Severe COVID-19-Related Lung Damage. **Dtsch Arztebl Int**, v. 117, n. 29-30, p. 500-506, Jul 20 2020. ISSN 1866-0452.
- KOVACS, S. B.; MIAO, E. A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. **Trends Cell Biol**, v. 27, n. 9, p. 673-684, Sep 2017. ISSN 0962-8924 (Print) 0962-8924.
- KROPF, P. et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 1920-8, Apr 2004. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.
- KUCIA, M. et al. An evidence that SARS-Cov-2/COVID-19 spike protein (SP) damages hematopoietic stem/progenitor cells in the mechanism of pyroptosis in Nlrp3 inflammasome-dependent manner. **Leukemia**, p. 1-4, Jun 23 2021. ISSN 0887-6924 (Print) 0887-6924.
- KUIDA, K. et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. **Science**, v. 267, n. 5206, p. 2000-3, Mar 31 1995. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.
- KUMAR, A. et al. Is diabetes mellitus associated with mortality and severity of COVID-19? A meta-analysis. **Diabetes Metab Syndr**, v. 14, n. 4, p. 535-545, Jul-Aug 2020. ISSN 1871-4021 (Print) 1871-4021.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. e KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press, v.1, 1987. p.1-120. ISBN 0-12-552101.
- LAKADAMYALI, M. et al. Visualizing infection of individual influenza viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 16, p. 9280-5, Aug 5 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.
- LARA, P. C.; MACÍAS-VERDE, D.; BURGOS-BURGOS, J. Age-induced NLRP3 Inflammasome Over-activation Increases Lethality of SARS-CoV-2 Pneumonia in Elderly Patients. **Aging Dis**, v. 11, n. 4, p. 756-762, Jul 2020. ISSN 2152-5250 (Print) 2152-5250 (Electronic) 2152-5250 (Linking).
- LEE, J. S. et al. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. **Sci Immunol**, v. 5, n. 49, Jul 10 2020. ISSN 2470-9468.



LEFÈVRE, L. et al. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 1038-49, May 23 2013. ISSN 1074-7613.

LETKO, M.; MARZI, A.; MUNSTER, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nat Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 562-569, Apr 2020. ISSN 2058-5276.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-31, Apr 2007. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613.

LI, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 450-4, Nov 27 2003. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

LI, Y. et al. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania* major-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? **Gene Ther**, v. 11, n. 11, p. 941-8, Jun 2004. ISSN 0969-7128 (Print) 0969-7128.

LIBBY, P.; LÜSCHER, T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. **Eur Heart J**, v. 41, n. 32, p. 3038-3044, Sep 1 2020. ISSN 0195-668X (Print) 0195-668x.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 12, p. 3424-34, Dec 2007. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-15, Jul 2013. ISSN 1078-8956.

\_\_\_\_\_. Dectin-1 Activation during *Leishmania amazonensis* Phagocytosis Prompts Syk-Dependent Reactive Oxygen Species Production To Trigger Inflammasome Assembly and Restriction of Parasite Replication. **J Immunol**, v. 199, n. 6, p. 2055-2068, Sep 15 2017. ISSN 0022-1767.

LIN, P. H. et al. N-terminal functional domain of Gasdermin A3 regulates mitochondrial homeostasis via mitochondrial targeting. **J Biomed Sci**, v. 22, n. 1, p. 44, Jun 24 2015. ISSN 1021-7770 (Print) 1021-7770.

LIN, R. W. et al. Naturally occurring mutations in PB1 affect influenza A virus replication fidelity, virulence, and adaptability. **J Biomed Sci**, v. 26, n. 1, p. 55, Jul 31 2019. ISSN 1021-7770 (Print) 1021-7770.

LIRA, R.; ROSALES-ENCINA, J. L.; ARGÜELLO, C. Leishmania mexicana: binding of promastigotes to type I collagen. **Exp Parasitol**, v. 85, n. 2, p. 149-57, Feb 1997. ISSN 0014-4894 (Print)  
0014-4894.

LISI, S. et al. Infection with Leishmania infantum Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. **J Eukaryot Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 211-7, May-Jun 2005. ISSN 1066-5234 (Print)  
1066-5234.

LIU, J. et al. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. In: (Ed.). **Cell Discov**, v.7, 2021. p.17. ISBN 2056-5968 (Print)  
2056-5968 (Electronic)  
2056-5968 (Linking).

LIU, X. et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 153-8, Jul 7 2016. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836.

LIU, Z. et al. Structures of the Gasdermin D C-Terminal Domains Reveal Mechanisms of Autoinhibition. **Structure**, v. 26, n. 5, p. 778-784.e3, May 1 2018. ISSN 0969-2126 (Print)  
0969-2126.

LU, X. et al. US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Emerg Infect Dis**, v. 26, n. 8, p. 1654-65, Aug 2020. ISSN 1080-6040 (Print)  
1080-6040.

LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463-469, Aug 2020. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836.

LUCAS, C. W., P. LKLEIN, J. ET AL. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, 2020.

MACINTOSH, B. J. et al. Brain structure and function in people recovering from COVID-19 after hospital discharge or self-isolation: a longitudinal observational study protocol. **CMAJ Open**, v. 9, n. 4, p. E1114-e1119, Oct-Dec 2021. ISSN 2291-0026.

MANCINI, M. et al. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. **J Cell Biol**, v. 140, n. 6, p. 1485-95, Mar 23 1998. ISSN 0021-9525 (Print)  
0021-9525.

MANICASSAMY, B. et al. Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 25, p. 11531-6, Jun 22 2010. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424.

MANZANARES-MEZA, L. D.; MEDINA-CONTRERAS, O. SARS-CoV-2 and influenza: a comparative overview and treatment implications. **Bol Med Hosp Infant Mex**, v. 77, n. 5, p. 262-273, 2020. ISSN 0539-6115.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-32, Mar 9 2006. ISSN 0028-0836.

MARTIN, K.; HELENIUS, A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. **J Virol**, v. 65, n. 1, p. 232-44, Jan 1991. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

MATROSOVICH, M. N. et al. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. **J Virol**, v. 78, n. 22, p. 12665-7, Nov 2004. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

MBOW, M. L.; DEKREY, G. K.; TITUS, R. G. Leishmania major induces differential expression of costimulatory molecules on mouse epidermal cells. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 5, p. 1400-9, May 2001. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980.

MCAULEY, J. L. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 5, p. e1003392, 2013. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

MELBY, P. C. et al. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 62, n. 3, p. 837-42, Mar 1994. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

MENEZES, M. J. et al. Immunomodulation of human monocytes following exposure to Lutzomyia intermedia saliva. **BMC Immunol**, v. 9, p. 12, Apr 10 2008. ISSN 1471-2172.

MIAO, E. A. et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nat Immunol**, v. 11, n. 12, p. 1136-42, Dec 2010. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908.

MISHARIN, A. V.; SCOTT BUDINGER, G. R.; PERLMAN, H. The lung macrophage: a Jack of all trades. In: (Ed.). **Am J Respir Crit Care Med**, v.184, 2011. p.497-8. ISBN 1535-4970 (Electronic) 1073-449X (Print) 1073-449X (Linking).

MOLL, H. et al. Langerhans cells transport Leishmania major from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **Eur J Immunol**, v. 23, n. 7, p. 1595-601, Jul 1993. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980.

MOMOSE, F. et al. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21123, 2011. ISSN 1932-6203.

MONTELEONE, M. et al. Interleukin-1 $\beta$  Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. **Cell Rep**, v. 24, n. 6, p. 1425-1433, Aug 7 2018.

MORIYAMA, M. et al. Influenza Virus-Induced Oxidized DNA Activates Inflammasomes. **iScience**, v. 23, n. 7, p. 101270, Jul 24 2020. ISSN 2589-0042.

MUNOZ, F. M. Influenza virus infection in infancy and early childhood. **Paediatr Respir Rev**, v. 4, n. 2, p. 99-104, Jun 2003. ISSN 1526-0542 (Print) 1526-0542.

MURAILLE, E. et al. Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2704-15, May 2003. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

NACY, C. A. et al. Macrophage activation to kill *Leishmania major*: activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon-gamma and non-interferon lymphokines. **J Immunol**, v. 135, n. 5, p. 3505-11, Nov 1985. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

NEWCOMB, L. L. et al. Interaction of the influenza a virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. **J Virol**, v. 83, n. 1, p. 29-36, Jan 2009. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

NIETO-TORRES, J. L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. **Virology**, v. 485, p. 330-9, Nov 2015. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822.

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **J Immunol**, v. 183, n. 12, p. 8088-98, Dec 15 2009. ISSN 0022-1767.

NS, A. L. et al. Venous thromboembolism in COVID-19: A meta-summary of cases. **Saudi Med J**, v. 43, n. 9, p. 979-990, Sep 2022. ISSN 0379-5284 (Print) 0379-5284.

NUOVO, G. J. et al. Endothelial cell damage is the central part of COVID-19 and a mouse model induced by injection of the S1 subunit of the spike protein. **Ann Diagn Pathol**, v. 51, p. 151682, Apr 2021. ISSN 1092-9134 (Print) 1092-9134.

O'NEILL, R. E. et al. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. **J Biol Chem**, v. 270, n. 39, p. 22701-4, Sep 29 1995. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

OGIWARA, H. et al. Histopathological evaluation of the diversity of cells susceptible to H5N1 virulent avian influenza virus. **Am J Pathol**, v. 184, n. 1, p. 171-83, Jan 2014. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440.

OKONDO, M. C. et al. DPP8 and DPP9 inhibition induces pro-caspase-1-dependent monocyte and macrophage pyroptosis. **Nat Chem Biol**, v. 13, n. 1, p. 46-53, Jan 2017. ISSN 1552-4450 (Print) 1552-4450.

OLAJIDE, O. A. et al. SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 Induces Neuroinflammation in BV-2 Microglia. **Mol Neurobiol**, v. 59, n. 1, p. 445-458, Jan 2022. ISSN 0893-7648 (Print) 0893-7648.

\_\_\_\_\_. Induction of Exaggerated Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by a Recombinant SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 and Its Inhibition by Dexamethasone. **Inflammation**, v. 44, n. 5, p. 1865-1877, Oct 2021. ISSN 0360-3997 (Print) 0360-3997.

OLIVARRIA, G. M. et al. Microglia Do Not Restrict SARS-CoV-2 Replication following Infection of the Central Nervous System of K18-Human ACE2 Transgenic Mice. **J Virol**, v. 96, n. 4, p. e0196921, Feb 23 2022. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

ORNING, P.; LIEN, E.; FITZGERALD, K. A. Gasdermins and their role in immunity and inflammation. **J Exp Med**, v. 216, n. 11, p. 2453-2465, Nov 4 2019. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007.

ORNING, P. et al. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. **Science**, v. 362, n. 6418, p. 1064-1069, Nov 30 2018. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

OSANYA, A. et al. Pathogen-derived oligosaccharides improve innate immune response to intracellular parasite infection. **Am J Pathol**, v. 179, n. 3, p. 1329-37, Sep 2011. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440.

PAHO/WHO. Leishmaniasis. <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>,

PAN, P. et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. **Nat Commun**, v. 12, n. 1, p. 4664, Aug 2 2021. ISSN 2041-1723.

PANG, I. K.; ICHINOHE, T.; IWASAKI, A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8<sup>+</sup> T cell responses to influenza A virus. **Nat Immunol**, v. 14, n. 3, p. 246-53, Mar 2013. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908.

PARK, H. S. et al. NS1 Protein of 2009 Pandemic Influenza A Virus Inhibits Porcine NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 Beta Production by Suppressing ASC Ubiquitination. **J Virol**, v. 92, n. 8, Apr 15 2018. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

PATTON, L. M. et al. Interleukin-1 beta-induced neutrophil recruitment and acute lung injury in hamsters. **Inflammation**, v. 19, n. 1, p. 23-9, Feb 1995. ISSN 0360-3997 (Print) 0360-3997.

PAUL, O. et al. Vascular Inflammation in Lungs of Patients with Fatal Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection: Possible role for the NLRP3 inflammasome. **medRxiv**, Mar 22 2021.

PEACOCK, W. F. et al. Real-World Analysis of Thromboembolic Events and Mortality of COVID-19 Outpatients in the United States. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 28, p. 10760296221120421, Jan-Dec 2022. ISSN 1076-0296 (Print) 1076-0296.

PEI, R. et al. Host metabolism dysregulation and cell tropism identification in human airway and alveolar organoids upon SARS-CoV-2 infection. **Protein Cell**, v. 12, n. 9, p. 717-733, Sep 2021. ISSN 1674-800X (Print) 1674-800x.

PEIRIS, J. S. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **Lancet**, v. 361, n. 9366, p. 1319-25, Apr 19 2003. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736.

\_\_\_\_\_. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. **Lancet**, v. 363, n. 9409, p. 617-9, Feb 21 2004. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736.

PERRONE, L. A. et al. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 8, p. e1000115, Aug 1 2008. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-4, Aug 15 2008. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

PETROPOLIS, D. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. **PeerJ**, v. 2, p. e317, 2014. ISSN 2167-8359 (Print) 2167-8359.

PINTO, L. H.; HOLSINGER, L. J.; LAMB, R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. **Cell**, v. 69, n. 3, p. 517-28, May 1 1992. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

PLOTCH, S. J. et al. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. **Cell**, v. 23, n. 3, p. 847-58, Mar 1981. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 111-29, 2015. ISSN 1746-0913.

POLAK, S. B. et al. A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression. **Mod Pathol**, v. 33, n. 11, p. 2128-2138, Nov 2020. ISSN 0893-3952 (Print) 0893-3952.

POLIDORO, R. B. et al. Overview: Systemic Inflammatory Response Derived From Lung Injury Caused by SARS-CoV-2 Infection Explains Severe Outcomes in COVID-19. **Front Immunol**, v. 11, p. 1626, 2020. ISSN 1664-3224.

PONTELLI, M. C. et al. SARS-CoV-2 productively infects primary human immune system cells in vitro and in COVID-19 patients. **J Mol Cell Biol**, v. 14, n. 4, Aug 17 2022. ISSN 1674-2788 (Print) 1759-4685.

POON, L. L. et al. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. **J Virol**, v. 73, n. 4, p. 3473-6, Apr 1999. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

POTHLICHET, J. et al. Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 4, p. e1003256, 2013. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clin Infect Dis**, v. 71, n. 15, p. 762-768, Jul 28 2020. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838.

RAGHU, G. et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 198, n. 5, p. e44-e68, Sep 1 2018. ISSN 1073-449x.

RAMOS DA SILVA, S. et al. Broad Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Cell Tropism and Immunopathology in Lung Tissues From Fatal Coronavirus Disease 2019. **J Infect Dis**, v. 223, n. 11, p. 1842-1854, Jun 4 2021. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899.

RAMOS-CASALS, M.; BRITO-ZERÓN, P.; MARIETTE, X. Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. **Nat Rev Rheumatol**, v. 17, n. 6, p. 315-332, Jun 2021. ISSN 1759-4790 (Print) 1759-4790.

RATAJCZAK, M. Z. et al. SARS-CoV-2 Entry Receptor ACE2 Is Expressed on Very Small CD45(-) Precursors of Hematopoietic and Endothelial Cells and in Response to Virus Spike Protein Activates the Nlrp3 Inflammasome. **Stem Cell Rev Rep**, v. 17, n. 1, p. 266-277, Feb 2021. ISSN 2629-3269 (Print) 2629-3277.

RATAJCZAK, M. Z.; KUCIA, M. SARS-CoV-2 infection and overactivation of Nlrp3 inflammasome as a trigger of cytokine "storm" and risk factor for damage of hematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 34, n. 7, p. 1726-1729, Jul 2020. ISSN 0887-6924 (Print) 0887-6924.

RATHKEY, J. K. et al. Live-cell visualization of gasdermin D-driven pyroptotic cell death. **J Biol Chem**, v. 292, n. 35, p. 14649-14658, Sep 1 2017. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

REGHUNATHAN, R. et al. Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **BMC Immunol**, v. 6, p. 2, Jan 18 2005. ISSN 1471-2172.

REICH, S. et al. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. **Nature**, v. 516, n. 7531, p. 361-6, Dec 18 2014. ISSN 0028-0836.

REITERER, M. et al. Hyperglycemia in acute COVID-19 is characterized by insulin resistance and adipose tissue infectivity by SARS-CoV-2. **Cell Metab**, v. 33, n. 11, p. 2174-2188.e5, Nov 2 2021. ISSN 1550-4131 (Print) 1550-4131.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 9, p. 581-96, Sep 2007. ISSN 1473-3099 (Print) 1473-3099.

RENNENBERG, A. et al. Exoerythrocytic Plasmodium parasites secrete a cysteine protease inhibitor involved in sporozoite invasion and capable of blocking cell death of host hepatocytes. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 3, p. e1000825, Mar 26 2010. ISSN 1553-7366 (Print) 1553-7366.

REVEL, M. P. et al. COVID-19 patients and the radiology department - advice from the European Society of Radiology (ESR) and the European Society of Thoracic Imaging (ESTI). **Eur Radiol**, v. 30, n. 9, p. 4903-4909, Sep 2020. ISSN 0938-7994 (Print) 0938-7994.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4454-62, Apr 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

RITTER, U. et al. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 6, p. 1542-50, Jun 2004. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980.



- ROBBINS-JUAREZ, S. Y. et al. Outcomes for Patients With COVID-19 and Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Kidney Int Rep**, v. 5, n. 8, p. 1149-1160, Aug 2020. ISSN 2468-0249.
- ROBINOT, R. et al. SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. **Nat Commun**, v. 12, n. 1, p. 4354, Jul 16 2021. ISSN 2041-1723.
- ROCHAEL, N. C. et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. **Sci Rep**, v. 5, p. 18302, Dec 17 2015. ISSN 2045-2322.
- RODRIGUES, T. S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **J Exp Med**, v. 218, n. 3, Mar 1 2021. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007.
- ROHOUSOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission. **Folia Parasitol (Praha)**, v. 53, n. 3, p. 161-71, Sep 2006. ISSN 0015-5683 (Print) 0015-5683.
- ROSSMAN, J. S.; LAMB, R. A. Influenza virus assembly and budding. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 229-36, Mar 15 2011. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822.
- ROTA, P. A. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1394-9, May 30 2003. ISSN 0036-8075.
- RUAN, J. et al. Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore. **Nature**, v. 557, n. 7703, p. 62-67, May 2018. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.
- RUHLAND, A.; LEAL, N.; KIMA, P. E. Leishmania promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 84-96, Jan 2007. ISSN 1462-5814 (Print) 1462-5814.
- RUST, M. J. et al. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. **Nat Struct Mol Biol**, v. 11, n. 6, p. 567-73, Jun 2004. ISSN 1545-9993 (Print) 1545-9985.
- RÜHL, S.; BROZ, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 10, p. 2927-36, Oct 2015. ISSN 0014-2980.
- RÜHL, S. et al. ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. **Science**, v. 362, n. 6417, p. 956-960, Nov 23 2018. ISSN 0036-8075.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417-9, Mar 30 1984. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

\_\_\_\_\_. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 34, n. 3, p. 456-9, May 1985. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637.

SAEKI, N. et al. GASDERMIN, suppressed frequently in gastric cancer, is a target of LMO1 in TGF-beta-dependent apoptotic signalling. **Oncogene**, v. 26, n. 45, p. 6488-98, Oct 4 2007. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

\_\_\_\_\_. Distinctive expression and function of four GSDM family genes (GSDMA-D) in normal and malignant upper gastrointestinal epithelium. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 48, n. 3, p. 261-71, Mar 2009. ISSN 1045-2257.

SAKAI, T. et al. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. **Sci Rep**, v. 7, p. 45043, Mar 27 2017. ISSN 2045-2322.

SAMALI, A. et al. Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. **FEBS Lett**, v. 431, n. 2, p. 167-9, Jul 17 1998. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

SANCHEZ-CERRILLO, I. et al. Differential Redistribution of Activated Monocyte and Dendritic Cell Subsets to the Lung Associates with Severity of COVID-19. **medRxiv**, May 16 2020.

SARHAN, J. et al. Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 46, p. E10888-e10897, Nov 13 2018. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

SATO, N. et al. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **J Exp Med**, v. 192, n. 2, p. 205-18, Jul 17 2000. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007.

SAUER, J. D. et al. *Listeria monocytogenes* engineered to activate the Nlr4 inflammasome are severely attenuated and are poor inducers of protective immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 30, p. 12419-24, Jul 26 2011. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

SAUNDERS-HASTINGS, P. R.; KREWSKI, D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. **Pathogens**, v. 5, n. 4, Dec 6 2016. ISSN 2076-0817 (Print) 2076-0817.

SAUTER, J. L. et al. Insights into pathogenesis of fatal COVID-19 pneumonia from histopathology with immunohistochemical and viral RNA studies. **Histopathology**, v. 77, n. 6, p. 915-925, Dec 2020. ISSN 0309-0167 (Print) 0309-0167.

SBORGI, L. et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. **Embo j**, v. 35, n. 16, p. 1766-78, Aug 15 2016. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189.

SCHAMBER-REIS, B. L. et al. UNC93B1 and nucleic acid-sensing Toll-like receptors mediate host resistance to infection with *Leishmania major*. **J Biol Chem**, v. 288, n. 10, p. 7127-36, Mar 8 2013. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

SCHIMMEL, L. et al. Endothelial cells are not productively infected by SARS-CoV-2. **Clin Transl Immunology**, v. 10, n. 10, p. e1350, 2021. ISSN 2050-0068 (Print) 2050-0068.

SCHMITZ, N. et al. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. **J Virol**, v. 79, n. 10, p. 6441-8, May 2005. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

SCHOCH, C. L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database (Oxford)**, v. 2020, Jan 1 2020. ISSN 1758-0463.

SEFIK, E. et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. **bioRxiv**, p. 2021.09.27.461948, 2022. Available at: <<http://biorxiv.org/content/early/2022/04/01/2021.09.27.461948.abstract>>.

SHAMAN, J.; KOHN, M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 9, p. 3243-8, Mar 3 2009. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

SHI, C. S. et al. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. **Cell Death Discov**, v. 5, p. 101, 2019. ISSN 2058-7716 (Print) 2058-7716.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 660-5, Oct 29 2015. ISSN 0028-0836.

SILVA, B. M. et al. Acute kidney injury outcomes in covid-19 patients: systematic review and meta-analysis. **J Bras Nefrol**, Jul 15 2022. ISSN 0101-2800.

SILVEIRA, T. N.; ZAMBONI, D. S. Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 1403-13, Mar 2010. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

- SIMONSEN, L. The global impact of influenza on morbidity and mortality. **Vaccine**, v. 17 Suppl 1, p. S3-10, Jul 30 1999. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410x.
- SINHA, P.; MATTHAY, M. A.; CALFEE, C. S. Is a "Cytokine Storm" Relevant to COVID-19? In: (Ed.). **JAMA Intern Med**. United States, v.180, 2020. p.1152-1154. ISBN 2168-6114 (Electronic) 2168-6106 (Linking).
- SIU, K. L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC. **FASEB j**, v. 33, n. 8, p. 8865-8877, Aug 2019. ISSN 0892-6638 (Print) 0892-6638.
- SOLLBERGER, G. et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. **Sci Immunol**, v. 3, n. 26, Aug 24 2018. ISSN 2470-9468.
- SONG, E. et al. Divergent and self-reactive immune responses in the CNS of COVID-19 patients with neurological symptoms. **Cell Rep Med**, v. 2, n. 5, p. 100288, May 18 2021. ISSN 2666-3791.
- SPOSITO, B. et al. The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 19, p. 4953-4968.e16, Sep 16 2021. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.
- SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Exp Parasitol**, v. 99, n. 2, p. 97-103, Oct 2001. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894.
- SRIVASTAV, S. et al. *Leishmania donovani* prevents oxidative burst-mediated apoptosis of host macrophages through selective induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins. **J Biol Chem**, v. 289, n. 2, p. 1092-105, Jan 10 2014. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, Feb 15 2017. ISSN 1756-3305.
- STOKES, E. K. et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance - United States, January 22-May 30, 2020. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 69, n. 24, p. 759-765, Jun 19 2020. ISSN 0149-2195 (Print) 0149-2195.
- STOUT-DELGADO, H. W. et al. Age-Dependent Susceptibility to Pulmonary Fibrosis Is Associated with NLRP3 Inflammasome Activation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 55, n. 2, p. 252-63, Aug 2016. ISSN 1044-1549 (Print) 1044-1549.
- SUN, Q. et al. Expression of GSDML Associates with Tumor Progression in Uterine Cervix Cancer. **Transl Oncol**, v. 1, n. 2, p. 73-83, Jul 2008. ISSN 1936-5233.

TAKEDA, M. et al. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 25, p. 14610-7, Dec 9 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

TAN, W.; ABOULHOSN, J. The cardiovascular burden of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with a focus on congenital heart disease. **Int J Cardiol**, v. 309, p. 70-77, Jun 15 2020. ISSN 0167-5273 (Print) 0167-5273.

TANIGUCHI, Y. et al. Comparison of patient characteristics and in-hospital mortality between patients with COVID-19 in 2020 and those with influenza in 2017-2020: a multicenter, retrospective cohort study in Japan. **Lancet Reg Health West Pac**, v. 20, p. 100365, Mar 2022. ISSN 2666-6065.

TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. The pathology of influenza virus infections. **Annu Rev Pathol**, v. 3, p. 499-522, 2008. ISSN 1553-4006 (Print) 1553-4006.

TAYLOR, F. B., JR. et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 5, p. 1327-30, Nov 2001. ISSN 0340-6245 (Print) 0340-6245.

THEOBALD, S. J. et al. Long-lived macrophage reprogramming drives spike protein-mediated inflammasome activation in COVID-19. **EMBO Mol Med**, p. e14150, Jun 16 2021. ISSN 1757-4676.

THOMAS, P. G. et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 566-75, Apr 17 2009. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613.

TOLDO, S. et al. Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. **Inflamm Res**, v. 70, n. 1, p. 7-10, Jan 2021. ISSN 1023-3830 (Print) 1023-3830.

VAN LAER, L. et al. DFNA5: hearing impairment exon instead of hearing impairment gene? **J Med Genet**, v. 41, n. 6, p. 401-6, Jun 2004. ISSN 0022-2593 (Print) 0022-2593.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **J Immunol**, v. 173, n. 11, p. 6521-5, Dec 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

VARGA, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1417-1418, May 2 2020. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736.

VEIT, M.; THAA, B. Association of influenza virus proteins with membrane rafts. **Adv Virol**, v. 2011, p. 370606, 2011. ISSN 1687-8639 (Print) 1687-8639.

VON MOLTKE, J. et al. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 107-11, Oct 4 2012. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. ISSN 3.

WANG, C. C. et al. Airborne transmission of respiratory viruses. **Science**, v. 373, n. 6558, Aug 27 2021. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

WANG, K. et al. Structural Mechanism for GSDMD Targeting by Autoprocessed Caspases in Pyroptosis. **Cell**, v. 180, n. 5, p. 941-955.e20, Mar 5 2020. ISSN 0092-8674.

WANG, P.; PALESE, P.; O'NEILL, R. E. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. **J Virol**, v. 71, n. 3, p. 1850-6, Mar 1997. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

WANG, Y. et al. Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. **Oncol Rep**, v. 35, n. 4, p. 2053-64, Apr 2016. ISSN 1021-335x.

\_\_\_\_\_. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. **J Hepatol**, v. 73, n. 4, p. 807-816, Oct 2020. ISSN 0168-8278 (Print) 0168-8278.

WARD, S. E. et al. Von Willebrand factor propeptide in severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): evidence of acute and sustained endothelial cell activation. **Br J Haematol**, v. 192, n. 4, p. 714-719, Feb 2021. ISSN 0007-1048.

WATABE, K. et al. Structure, expression and chromosome mapping of MLZE, a novel gene which is preferentially expressed in metastatic melanoma cells. **Jpn J Cancer Res**, v. 92, n. 2, p. 140-51, Feb 2001. ISSN 0910-5050 (Print) 0910-5050.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab Invest**, v. 12, p. 131-55, Feb 1963. ISSN 0023-6837 (Print) 0023-6837.

WEINHEIMER, V. K. et al. Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. **J Infect Dis**, v. 206, n. 11, p. 1685-94, Dec 1 2012. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899.

WEIS, W. et al. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. **Nature**, v. 333, n. 6172, p. 426-31, Jun 2 1988. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum. **Nat Commun**, v. 6, p. 8964, Dec 15 2015. ISSN 2041-1723.

WHITE, J.; HELENIUS, A.; GETHING, M. J. Haemagglutinin of influenza virus expressed from a cloned gene promotes membrane fusion. **Nature**, v. 300, n. 5893, p. 658-9, Dec 16 1982. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

WHO. <https://covid19.who.int/>: World Health Organization 2020a.

\_\_\_\_\_. Data on Leishmaniasis (Global Health Observatory). [https://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html](https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html), 2020b.

\_\_\_\_\_. Origin of SARS-CoV-2. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332197/WHO-2019-nCoV-FAQ-Virus\\_origin-2020.1-eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332197/WHO-2019-nCoV-FAQ-Virus_origin-2020.1-eng.pdf), 2020c.

\_\_\_\_\_. Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update and Weekly Operational Update. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>, 2022a.

\_\_\_\_\_. *Influenza (Seasonal)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) 2022b.

WITKOWSKI, M. et al. Untimely TGF $\beta$  responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. **Nature**, v. 600, n. 7888, p. 295-301, Dec 2021. ISSN 0028-0836.

WOO, P. C. et al. Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. **J Virol**, v. 80, n. 14, p. 7136-45, Jul 2006. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

WU, C. et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Intern Med**, v. 180, n. 7, p. 934-943, Jul 1 2020. ISSN 2168-6106 (Print) 2168-6106.

\_\_\_\_\_. Inflammasome Activation Triggers Blood Clotting and Host Death through Pyroptosis. **Immunity**, v. 50, n. 6, p. 1401-1411.e4, Jun 18 2019. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613.

WU, H. et al. Genetic variation in ORM1-like 3 (ORMDL3) and gasdermin-like (GSDML) and childhood asthma. **Allergy**, v. 64, n. 4, p. 629-35, Apr 2009. ISSN 0105-4538 (Print) 0105-4538.

XIANG, M. et al. Hemorrhagic shock activation of NLRP3 inflammasome in lung endothelial cells. **J Immunol**, v. 187, n. 9, p. 4809-17, Nov 1 2011. ISSN 0022-1767 (Print)  
0022-1767.

XU, H. et al. SARS-CoV-2 viroporin encoded by ORF3a triggers the NLRP3 inflammatory pathway. In: (Ed.). **Virology**: © 2022 Published by Elsevier Inc., 2022. ISBN 0042-6822 (Print)  
1096-0341 (Electronic).

XU, P. et al. Hemorrhagic shock augments Nlrp3 inflammasome activation in the lung through impaired pyrin induction. **J Immunol**, v. 190, n. 10, p. 5247-55, May 15 2013. ISSN 0022-1767 (Print)  
0022-1767.

XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 4, p. 420-422, Apr 2020. ISSN 2213-2600 (Print)  
2213-2600.

YALCINKAYA, M. et al. Modulation of the NLRP3 inflammasome by Sars-CoV-2 Envelope protein. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 24432, Dec 24 2021. ISSN 2045-2322.

YANG, J. et al. Mechanism of gasdermin D recognition by inflammatory caspases and their inhibition by a gasdermin D-derived peptide inhibitor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 26, p. 6792-6797, Jun 26 2018. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424.

\_\_\_\_\_. Hemorrhagic shock primes for lung vascular endothelial cell pyroptosis: role in pulmonary inflammation following LPS. **Cell Death Dis**, v. 7, n. 9, p. e2363, Sep 8 2016.

YANG, X. et al. A beneficiary role for neuraminidase in influenza virus penetration through the respiratory mucus. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110026, 2014. ISSN 1932-6203.

\_\_\_\_\_. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 5, p. 475-481, May 2020. ISSN 2213-2600 (Print)  
2213-2600.

YORK, A. et al. Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a negative-strand RNA virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 45, p. E4238-45, Nov 5 2013. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424.

YOSHIMURA, A.; OHNISHI, S. Uncoating of influenza virus in endosomes. **J Virol**, v. 51, n. 2, p. 497-504, Aug 1984. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538x.

ZAKI, A. M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **N Engl J Med**, v. 367, n. 19, p. 1814-20, Nov 8 2012. ISSN 0028-4793.



- ZALILA, H. et al. Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 1, p. 222-39, Jan 2011. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382x.
- ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunol Rev**, v. 265, n. 1, p. 156-71, May 2015. ISSN 0105-2896.
- ZHANG, J. et al. Pyroptotic macrophages stimulate the SARS-CoV-2-associated cytokine storm. In: (Ed.). **Cell Mol Immunol**, v.18, 2021. p.1305-1307. ISBN 2042-0226 (Electronic) 1672-7681 (Print) 1672-7681 (Linking).
- ZHANG, Y. et al. Inflammasome activation promotes venous thrombosis through pyroptosis. **Blood Adv**, v. 5, n. 12, p. 2619-2623, Jun 22 2021. ISSN 2473-9529 (Print) 2473-9529.
- ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, Mar 28 2020. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736.
- ZHOU, M.; ZOU, J. A dynamical overview of droplets in the transmission of respiratory infectious diseases. **Phys Fluids (1994)**, v. 33, n. 3, p. 031301, Mar 1 2021. ISSN 1070-6631 (Print) 1070-6631.
- ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, Mar 2020. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.
- ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221-5, Jan 13 2011. ISSN 0028-0836.
- ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, v. 382, n. 8, p. 727-733, Feb 20 2020. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793.
- ZIEGLER, C. G. K. et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1016-1035.e19, May 28 2020. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.
- ZOU, X. et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Front Med**, v. 14, n. 2, p. 185-192, Apr 2020. ISSN 2095-0217 (Print) 2095-0217.

## 18. Anexo 1: Trabalhos de primeira autoria

### 18.1 Artigo em revisão:

**Gasdermin-D activation in response to *Leishmania* infection induce a transient cell permeabilization and promote NLRP3 activation and host resistance to infection**

Keyla S.G. de Sá<sup>1</sup>, Luana A. Amaral<sup>1</sup>, Tamara S. Rodrigues<sup>1</sup>, Adriene Y. Ishimoto<sup>1</sup>,  
Warrison A.C. de Andrade<sup>1</sup>, Leticia de Almeida<sup>1</sup>, Felipe Freitas-Castro<sup>1</sup>, Sabrina S.  
Batah<sup>2</sup>, Sergio C. Oliveira<sup>3</sup>, Mônica T. Pastorello<sup>2</sup>, Alexandre T. Fabro<sup>2,4</sup>, Dario S.  
Zamboni<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

<sup>4</sup> Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900 Brazil.

\*Correspondence:

Dario S. Zamboni, Ph.D.

Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. Av.

Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900 Brazil.

Tel: (55) (16) 3602-3265.

Fax: (55) (16) 3633-1786.

E-mail: [dszamboni@fmrp.usp.br](mailto:dszamboni@fmrp.usp.br)

Inflammasome activation and pulmonary viral loads define two distinct clinical outcomes in COVID-19.

Keyla S.G. de Sá<sup>1</sup>, Luana A. Amaral<sup>1</sup>, Camila C.S. Caetano<sup>1</sup>, Amanda Becerra<sup>1</sup>, Sabrina S. Batah<sup>2</sup>, Isadora M. de Oliveira<sup>1</sup>, Leticia S. Lopes<sup>1</sup>, Leticia Almeida<sup>1</sup>, Samuel Oliveira<sup>1</sup>, Danilo Tadao Wada<sup>3</sup>, Marcel Koenigkam-Santos<sup>3</sup>, Ronaldo B. Martins<sup>1</sup>, Roberta R. C. Rosales<sup>1</sup>, Eurico Arruda<sup>1</sup>, Alexandre T Fabro<sup>2</sup>, Dario S. Zamboni<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

\*Correspondence:

Email: [dszamboni@fmrp.usp.br](mailto:dszamboni@fmrp.usp.br)

## 19. Anexo 2: Trabalhos de colaboração

19.1 Artigo publicado: DOI: [10.1084/jem.20201707](https://doi.org/10.1084/jem.20201707)



### BRIEF DEFINITIVE REPORT

# Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients

Tamara S. Rodrigues<sup>1</sup>, Keyla S.G. de Sá<sup>1</sup>, Adriene Y. Ishimoto<sup>1</sup>, Amanda Becerra<sup>1</sup>, Samuel Oliveira<sup>1</sup>, Leticia Almeida<sup>1,2</sup>, Augusto V. Gonçalves<sup>1</sup>, Debora B. Perucello<sup>1</sup>, Warrison A. Andrade<sup>1</sup>, Ricardo Castro<sup>3</sup>, Flavio P. Veras<sup>4</sup>, Juliana E. Toller-Kawahisa<sup>4</sup>, Daniele C. Nascimento<sup>4</sup>, Mikhael H.F. de Lima<sup>4</sup>, Camila M.S. Silva<sup>4</sup>, Diego B. Caetite<sup>4</sup>, Ronaldo B. Martins<sup>1</sup>, Italo A. Castro<sup>1</sup>, Marjorie C. Pontelli<sup>1</sup>, Fabio C. de Barros<sup>5,6</sup>, Natália B. do Amaral<sup>7</sup>, Marcela C. Giannini<sup>7</sup>, Leticia P. Bonjorno<sup>7</sup>, Maria Isabel F. Lopes<sup>7</sup>, Rodrigo C. Santana<sup>7</sup>, Fernando C. Vilar<sup>7</sup>, Maria Auxiliadora-Martins<sup>8</sup>, Rodrigo Luppino-Assad<sup>7</sup>, Sergio C.L. de Almeida<sup>7</sup>, Fabiola R. de Oliveira<sup>7</sup>, Sabrina S. Batah<sup>9</sup>, Li Siyuan<sup>9</sup>, Maira N. Benatti<sup>9</sup>, Thiago M. Cunha<sup>2,4</sup>, José C. Alves-Filho<sup>2,4</sup>, Fernando Q. Cunha<sup>2,4</sup>, Larissa D. Cunha<sup>1</sup>, Fabiani G. Frantz<sup>3</sup>, Tiana Kohlsdorf<sup>3</sup>, Alexandre T. Fabro<sup>9</sup>, Eurico Arruda<sup>1</sup>, Renê D.R. de Oliveira<sup>7</sup>, Paulo Louzada-Junior<sup>7</sup>, and Dario S. Zamboni<sup>1,2</sup>

Severe cases of COVID-19 are characterized by a strong inflammatory process that may ultimately lead to organ failure and patient death. The NLRP3 inflammasome is a molecular platform that promotes inflammation via cleavage and activation of key inflammatory molecules including active caspase-1 (Casp1p20), IL-1 $\beta$ , and IL-18. Although participation of the inflammasome in COVID-19 has been highly speculated, the inflammasome activation and participation in the outcome of the disease are unknown. Here we demonstrate that the NLRP3 inflammasome is activated in response to SARS-CoV-2 infection and is active in COVID-19 patients. Studying moderate and severe COVID-19 patients, we found active NLRP3 inflammasome in PBMCs and tissues of postmortem patients upon autopsy. Inflammasome-derived products such as Casp1p20 and IL-18 in the sera correlated with the markers of COVID-19 severity, including IL-6 and LDH. Moreover, higher levels of IL-18 and Casp1p20 are associated with disease severity and poor clinical outcome. Our results suggest that inflammasomes participate in the pathophysiology of the disease, indicating that these platforms might be a marker of disease severity and a potential therapeutic target for COVID-19.

## Introduction

COVID-19 is an inflammatory disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which can manifest as a broad spectrum of symptoms ranging from few or no symptoms to severe pneumonia that may evolve to acute respiratory distress syndrome and death (Merad and Martin, 2020). While the molecular mechanisms driving disease severity remain unclear, the clinical association of inflammatory mediators such as IL-6 and lactate dehydrogenase (LDH) with severe cases suggests that excessive inflammation is central to a

poor clinical outcome (Chen et al., 2020; Han et al., 2020; Huang et al., 2020). The induction of inflammatory processes in the host cell often requires the engagement of inflammasomes, which are protein platforms that aggregate in the cytosol in response to different stimuli (Broz and Dixit, 2016). The NLRP3 inflammasome, the most studied one of such platforms, comprises the NLRP3 receptor, the adaptor molecule apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (ASC), and caspase-1. Caspase-1 is

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>2</sup>Center of Research in Inflammatory Diseases, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>4</sup>Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>5</sup>Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>6</sup>Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, Brazil; <sup>7</sup>Divisão de Imunologia Clínica, Emergência, Doenças Infecciosas e Unidade de Terapia Intensiva, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>8</sup>Divisão de Medicina Intensiva, Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>9</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Correspondence to Dario S. Zamboni: [dszamboni@fmrp.usp.br](mailto:dszamboni@fmrp.usp.br).

© 2020 Rodrigues et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



## Heparin prevents *in vitro* glycoalyx shedding induced by plasma from COVID-19 patients

Simone R. Potje<sup>a,b,1</sup>, Tiago J. Costa<sup>b,1</sup>, Thais F.C. Fraga-Silva<sup>c</sup>, Ronaldo B. Martins<sup>d</sup>, Maira N. Benatti<sup>e</sup>, Carlos E.L. Almado<sup>f</sup>, Keyla S.G. de Sá<sup>d</sup>, Vânia L.D. Bonato<sup>c</sup>, Eurico Arruda<sup>d</sup>, Paulo Louzada-Junior<sup>e</sup>, Rene D.R. Oliveira<sup>e</sup>, Dario S. Zamboni<sup>d</sup>, Christiane Becari<sup>f</sup>, Maria Auxiliadora-Martins<sup>f</sup>, Rita C. Tostes<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry and Physics, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>d</sup> Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>e</sup> Department of Clinical Medicine, Division of Internal Medicine, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>f</sup> Department of Surgery and Anatomy, Division of Intensive Care, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
COVID-19  
Glycoalyx  
Heparan sulfate proteoglycans  
Low molecular weight heparin  
Vascular dysfunction  
Endothelial cells

### ABSTRACT

The severe forms and worsened outcomes of COVID-19 (coronavirus disease 19) are closely associated with hypertension and cardiovascular disease. Endothelial cells express Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), which is the entrance door for the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The hallmarks of severe illness caused by SARS-CoV-2 infection are increased levels of IL-6, C-reactive protein, D-dimer, ferritin, neutrophilia and lymphopenia, pulmonary intravascular coagulopathy and microthrombi of alveolar capillaries. The endothelial glycoalyx, a proteoglycan- and glycoprotein-rich layer covering the luminal side of endothelial cells, contributes to vascular homeostasis. It regulates vascular tonus and permeability, prevents thrombosis, and modulates leukocyte adhesion and inflammatory response. We hypothesized that cytokine production and reactive oxygen species (ROS) generation associated with COVID-19 leads to glycoalyx degradation. A cohort of 20 hospitalized patients with a confirmed COVID-19 diagnosis and healthy subjects were enrolled in this study. Mechanisms associated with glycoalyx degradation in COVID-19 were investigated. Increased plasma concentrations of IL-6 and IL1- $\beta$ , as well as increased lipid peroxidation and glycoalyx components were detected in plasma from COVID-19 patients compared to plasma from healthy subjects. Plasma from COVID-19 patients induced glycoalyx shedding in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and disrupted redox balance. Treatment of HUVECs with low molecular weight heparin inhibited the glycoalyx perturbation. In conclusion, plasma from COVID-19 patients promotes glycoalyx shedding and redox imbalance in endothelial cells, and heparin treatment potentially inhibits glycoalyx disruption.

### 1. Introduction

The correlation between viral infection and cardiovascular disease gained strength in the last year with the emergence of the new  $\beta$ -coronavirus disease 2019 (COVID-19) [1]. The severe forms and worsened outcomes of COVID-19 are closely associated with hypertension and cardiovascular disease [2] and up to February 2021 the COVID-19

pandemic has affected more than one hundred and eleven million people worldwide [3].

Caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), COVID-19 may trigger intense and diffuse lung injury, that may progress to acute respiratory distress syndrome (ARDS), leading to respiratory failure and death [4,5]. SARS-CoV-2 [6] activates the immune system and increases cytokines production such as IL-1 $\beta$ , IL-

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Av. Bandeirantes, 3900, Bairro Monte Alegre, Ribeirao Preto, SP CEP: 14049-900, Brazil.

E-mail address: [rtostes@usp.br](mailto:rtostes@usp.br) (R.C. Tostes).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to the manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119376>

Received 22 December 2020; Received in revised form 7 March 2021; Accepted 8 March 2021

Available online 27 March 2021

0024-3205/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1002/JLB.MA1118-471R



## ARTICLE

## Macrophage priming is dispensable for NLRP3 inflammasome activation and restriction of *Leishmania amazonensis* replication

Renan V. H. de Carvalho | Alexandre L. N. Silva | Leonardo L. Santos |  
Warrison A. Andrade | Keyla S. G. de Sá | Dario S. Zamboni

Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Correspondence  
Dario S. Zamboni, Department of Cell Biology, University of São Paulo, Medical School Ribeirão Preto, FMRP/USP, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil  
Email: dszamboni@fmrp.usp.br

## Abstract

The NLRP3 inflammasome is activated in response to multiple stimuli and triggers activation of caspase-1 (CASP1), IL-1 $\beta$  production, and inflammation. NLRP3 activation requires two signals. The first leads to transcriptional regulation of specific genes related to inflammation, and the second is triggered when pathogens, toxins, or specific compounds damage cellular membranes and/or trigger the production of reactive oxygen species (ROS). Here, we assess the requirement of the first signal (priming) for the activation of the NLRP3 inflammasome in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) infected with *Leishmania amazonensis*. We found that BMDMs express the inflammasome components NLRP3, ASC, and CASP1 at sufficient levels to enable the assembly and activation of NLRP3 inflammasome in response to infection. Therefore, priming was not required for the formation of ASC specks, CASP1 activation (measured by fluorescent dye FAM-YVAD), and restriction of *L. amazonensis* replication via the NLRP3 inflammasome. By contrast, BMDM priming was required for CASP1 cleavage (p20) and IL-1 $\beta$  secretion, because priming triggers robust up-regulation of pro-IL-1 $\beta$  and CASP11 that are important for efficient processing of CASP1 and IL-1 $\beta$ . Taken together, our data shed light into the cellular and molecular processes involved in activation of the NLRP3 in macrophages by *Leishmania*, a process that is important for the outcome of Leishmaniasis.

## KEYWORDS

Leishmaniasis, caspase-1, innate immunity

## 1 | INTRODUCTION

The innate immune system is equipped with a wide variety of immune sensors that are activated by damage signals or microbe-associated molecular patterns (MAMPs).<sup>1,2</sup> Among them is the family of nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing proteins (NLRs)<sup>3</sup> and TLRs.<sup>4,5</sup> TLRs and NLRs are possibly the most studied families of pattern recognition receptors (PRR) and are implicated in a wide variety of diseases that range from infectious to autoimmune disorders.<sup>6,7</sup>

NLRs are cytosolic immune sensors that are activated under situations of stress and tissue damage, often related to infectious processes. Among NLRs, NLRP3 (NLR Family, pyrin domain containing 3) is the most studied sensor.<sup>8</sup> Upon activation, NLRP3 oligomerizes and recruits the adaptor protein ASC (Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD), which enables caspase-1 (CASP1) activation and the formation of a cytosolic platform, called

the NLRP3 inflammasome.<sup>7,9</sup> It is well established in the literature that two signals are required to induce NLRP3 activation: the first is provided by TLR ligands or cytokines, such as TNF- $\alpha$ , which leads to transcriptional regulation of many inflammatory genes, including cytokines and inflammasome components. The second signal is triggered when the macrophage is exposed to toxins, pathogenic microbes, or particles that damage the macrophage membranes. A wide variety of molecules can trigger the second signal for activation of the NLRP3 inflammasome, including ATP, reactive oxygen species (ROS), crystals, and pathogens that induce rupture in the host cell membranes. These processes lead to the so-called canonic pathway for NLRP3 inflammasome activation.<sup>9,10</sup> Alternatively, intracellular sensing of oxidized lipids,<sup>11</sup> bacterial LPS,<sup>12,13</sup> or *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG)<sup>14</sup> induces CASP11 activation, leading to membrane damage and potassium efflux, the so-called non-canonic NLRP3 activation.<sup>15</sup> The assembly of this multimolecular complex induces efficient processing and cleavage of both CASP1 and the

Received: 7 January 2019 | Revised: 10 April 2019 | Accepted: 14 April 2019

*J Leukoc Biol.* 2019;106:631–640.

[www.jleukbio.org](http://www.jleukbio.org)

©2019 Society for Leukocyte Biology | 631



## Mitochondrial DNA and TLR9 activation contribute to SARS-CoV-2-induced endothelial cell damage

Tiago J. Costa<sup>a,i,1</sup>, Simone R. Potje<sup>a,k,1</sup>, Thais F.C. Fraga-Silva<sup>b</sup>, Júlio A. da Silva-Neto<sup>a</sup>, Paula R. Barros<sup>a</sup>, Daniel Rodrigues<sup>a</sup>, Mirele R. Machado<sup>a</sup>, Ronaldo B. Martins<sup>c</sup>, Rosângela A. Santos-Eichler<sup>d</sup>, Maira N. Benatti<sup>e</sup>, Keyla S.G. de Sá<sup>f</sup>, Carlos Eduardo L. Almado<sup>h</sup>, Ítalo A. Castro<sup>c</sup>, Marjorie C. Pontelli<sup>c</sup>, Leonardo La Serra<sup>c</sup>, Fernando S. Carneiro<sup>a</sup>, Christiane Becari<sup>g</sup>, Paulo Louzada-Junior<sup>e</sup>, Rene D.R. Oliveira<sup>e</sup>, Dario S. Zamboni<sup>f</sup>, Eurico Arruda<sup>c</sup>, Maria Auxiliadora-Martins<sup>g</sup>, Fernanda R.C. Giachini<sup>h</sup>, Vânia L.D. Bonato<sup>b</sup>, Natasha E. Zachara<sup>i</sup>, Gisele F. Bomfim<sup>j</sup>, Rita C. Tostes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>c</sup> Virology Research Center, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>d</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>e</sup> Department of Clinical Medicine, Division of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>f</sup> Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>g</sup> Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Brazil

<sup>h</sup> Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso – UFMT, Brazil

<sup>i</sup> Department of Biological Chemistry, The Johns Hopkins University School of Medicine, USA

<sup>j</sup> Institute of Health Sciences, Federal University of Mato Grosso – UFMT, Brazil

<sup>k</sup> Minas Gerais State University - UEMG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

SARS-CoV-2  
Mitochondria  
Endothelial dysfunction  
Toll like receptor 9

### ABSTRACT

**Background and purpose:** Mitochondria play a central role in the host response to viral infection and immunity, being key to antiviral signaling and exacerbating inflammatory processes. Mitochondria and Toll-like receptor (TLR) have been suggested as potential targets in SARS-CoV-2 infection. However, the involvement of TLR9 in SARS-CoV-2-induced endothelial dysfunction and potential contribution to cardiovascular complications in COVID-19 have not been demonstrated. This study determined whether infection of endothelial cells by SARS-CoV-2 affects mitochondrial function and induces mitochondrial DNA (mtDNA) release. We also questioned whether TLR9 signaling mediates the inflammatory responses induced by SARS-CoV-2 in endothelial cells.

**Experimental approach:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were infected by SARS-CoV-2 and immunofluorescence was used to confirm the infection. Mitochondrial function was analyzed by specific probes and mtDNA levels by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Inflammatory markers were measured by ELISA, protein expression by western blot, intracellular calcium ( $Ca^{2+}$ ) by FLUOR-4, and vascular reactivity with a myography.

**Key results:** SARS-CoV-2 infected HUVECs, which express ACE2 and TMPRSS2 proteins, and promoted mitochondrial dysfunction, i.e. it increased mitochondria-derived superoxide anion, mitochondrial membrane potential, and mtDNA release, leading to activation of TLR9 and NF- $\kappa$ B, and release of cytokines. SARS-CoV-2 also decreased nitric oxide synthase (eNOS) expression and inhibited  $Ca^{2+}$  responses in endothelial cells. TLR9 blockade reduced SARS-CoV-2-induced IL-6 release and prevented decreased eNOS expression. mtDNA increased vascular reactivity to endothelin-1 (ET-1) in arteries from wild type, but not TLR9 knockout mice. These events

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail addresses: [tjcosta@usp.br](mailto:tjcosta@usp.br) (T.J. Costa), [rtostes@usp.br](mailto:rtostes@usp.br) (R.C. Tostes).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to the manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106946>

Received 3 October 2021; Accepted 15 November 2021

Available online 25 November 2021

1537-1891/© 2021 Published by Elsevier Inc.

Received: 13 September 2021 | Revised: 24 October 2021 | Accepted: 30 October 2021

DOI: 10.1002/ctm2.648



WILEY

## LETTER TO EDITOR

## COVID-19 bimodal clinical and pathological phenotypes

Dear Editor,

For the first time to our knowledge, we describe a bimodal phenotype of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients provided by clinical and pathological correlation and multidisciplinary discussion, characterized by thrombotic and fibrotic poles (Figure 1).

Patients with COVID-19 may present various symptoms leading to different clinical complications and outcomes, ranging from mild to severe.<sup>1,2</sup> Differences in these outcomes can be attributed to a differential host response to infection with variable viral load, age, gender, comorbidities, genetic and immune background. While different studies have stratified heterogeneous COVID-19 patients based on different strategies,<sup>3</sup> the characterization of histopathological patterns in association with clinical outcome of patients who died from COVID-19 remains largely unreported. We hypothesized that COVID-19 could lead to different lung injury/repair mechanisms related to different clinical and ventilatory manifestations. Therefore, we aimed to assess whether a clinical and pathological correlation could explain the different clinical outcomes among COVID-19 patients with commonly associated long-term lung dysfunction.

To answer our question, we performed 47 consecutive COVID-19 patients minimally invasive autopsies followed by lung morphological analysis and clinical and radiological evaluation (Supporting information Tables S1–S4). A detailed description of the methodology can be found in the Supporting information. After a multidisciplinary discussion and data integration, we discovered a bimodal clinical and pathological phenotype presented as poles, not groups (Figure 1A; Supporting information Tables S5–S9): (1) Fibrotic phenotype (N = 5)—characterized by a progressive decline in PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio (Figure 1B) with low compliance levels during hospitalization (Supporting information Table S5) and alveolar septal thickening with myxoid fibrosis typical to an organizing phase of diffuse alveolar damage (DAD) (Figure 1C; Supporting information Table S6); and (2) Thrombotic phenotype (N = 10)—characterized by a progressive increase in PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio (Figure 1D) with high pulmonary compliance levels dur-

ing hospitalization (Supporting information Table S5) and recovery of the acute/sub-acute lung injury or slight distortion of the underlying lung parenchyma architecture with a high frequency of thrombosis (80%) (Figure 1E; Supporting information Table S6). Additionally, although symptoms, signs, demographics, or comorbidities did not correlate to the phenotypes (Supporting information Table S7), D-dimer and platelets count was higher in these thrombotic patients than fibrotic ones (Supporting information Figure S1A and B and Table S8).

The fibrotic phenotype results from the imbalance between myofibroblastic activation and further deposition/degradation of the collagen and elastic fibers to cause alveolar septal thickening (Figure 2), as reported in other studies.<sup>4,5</sup> All these features were highlighted in fibrotic phenotype compared to thrombotic one, as follows: (1) higher active myofibroblasts  $\alpha$ -SMA area fraction (Figure 2A and B); (2) higher  $\alpha$ -SMA and MMP-2 expression (Figure 2C and D); (3) increased extracellular matrix deposition by types I and III collagen fibers by Picrosirius Red staining (Figure 2E and F); and (4) reduced elastic fibers area fraction by Verhoeff staining (Figure 2G and H), correlating negatively to  $\alpha$ -SMA ( $r = -0.57$ ;  $p = 0.035$ ; Supporting information Figure S2A). This dysfunctional alveolar septal thickening in the fibrotic phenotype impairs adequate lung function and gas exchange, which is reflected by the suggestive correlation between collagen fibers deposition and PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio ( $r = -0.64$ ;  $p = 0.019$ ; Supporting information Figure S2B and C) and significant negative correlation between compliance and drive pressure ( $r = -0.67$ ;  $p = 0.001$ ; Supporting information Figure 2D). According to other studies,<sup>6,7</sup> these patients presented a progressive decline in PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio (Figure 1B) and low compliance levels during hospitalization (Supporting information Table S5), suggesting a poor clinical outcome. Moreover, fibrotic phenotype patients showed neutrophil extracellular traps to a significantly greater extent throughout lung parenchyma compared to thrombotic phenotype patients ( $p = 0.0004$ ) (Supporting information Figure S3), which is a crucial response during the acute COVID-19 phase and a potential contributory factor

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Clinical and Translational Medicine* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Shanghai Institute of Clinical Bioinformatics

*Clin. Transl. Med.* 2022;12:e648.  
<https://doi.org/10.1002/ctm2.648>

wileyonlinelibrary.com/journal/ctm2 | 1 of 6



limitations due to our sample size, as 47 cases are too few to establish ground rules for COVID-19 outcomes. Nevertheless, our samples are exceptional and should be valued. In conclusion, we believe that the categorization of patients based on these two phenotypes can be used to develop prognostic tools and potential therapies since the PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio and D-dimer correlate with the underlying fibrotic or thrombotic pathophysiologic process, which may indicate the possible clinical outcome of the patient.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the institutional support of the University Hospital of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil-HCFMRP/USP.

#### CONFLICT OF INTEREST


The authors declare no conflict of interest.

#### STUDY APPROVAL

The procedures followed in the study were approved by the National Ethics Committee-Brazil (CAAE: 32475220.5.0000.5440). The written informed consent was waived.

#### AVAILABILITY OF METHODOLOGY

Additional supporting information for methodology may be found online in the Supporting File.

Sabrina S. Batah<sup>1</sup>   
 Maira N. Benatti<sup>2</sup>  
 Li Siyuan<sup>3</sup>  
 Wagner M. Telini<sup>1</sup>  
 Jamile O. Barboza<sup>1</sup>  
 Marcelo B. Menezes<sup>2</sup>  
 Tales R. Nadai<sup>4</sup>  
 Keyla S. G. Sá<sup>5</sup>  
 Chirag M. Vaswani<sup>6,7</sup>  
 Sahil Gupta<sup>7,8,9</sup>  
 Dario S. Zamboni<sup>5</sup>  
 Danilo T. Wada<sup>10</sup>  
 Rodrigo T. Calado<sup>10</sup>  
 Renê D. R. Oliveira<sup>11</sup>  
 Paulo Louzada-Junior<sup>11</sup>  
 Maria Auxiliadora-Martins<sup>12</sup>  
 Flávio P. Veras<sup>13</sup>  
 Larissa D. Cunha<sup>5</sup>  
 Thiago M. Cunha<sup>13</sup>  
 Rodrigo Luppino-Assad<sup>14</sup>  
 Marcelo L. Balancin<sup>15</sup>  
 Sirlei S. Morais<sup>1</sup>  
 Ronaldo B. Martins<sup>5</sup>

Eurico Arruda<sup>5</sup>  
 Fernando Chahud<sup>1</sup>  
 Marcel Koenigk Santos<sup>10</sup>  
 Andrea A. Cetlin<sup>2</sup>  
 Fernando Q. Cunha<sup>13</sup>  
 Claudia dos Santos<sup>7,16</sup>  
 Vera L. Capelozzi<sup>15</sup>  
 Junya Fukuoka<sup>17</sup>  
 Rosane Duarte Achar<sup>18,\*</sup>  
 Alexandre T. Fabro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology and Legal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Pulmonary Division, Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup> Department of Surgery, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup> Hospital Estadual de Baurux, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup> Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>6</sup> Department of Physiology, Temerty Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

<sup>7</sup> Keenan Research Centre for Biomedical Science, St. Michael's Hospital, Toronto, Ontario, Canada

<sup>8</sup> Temerty Faculty of Medicine, Institute of Medical Science University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

<sup>9</sup> Department of Critical Care Medicine, St. Michael's Hospital, Toronto, Ontario, Canada

<sup>10</sup> Department of Medical Images, Hematology and Oncology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>11</sup> Division of Clinical Immunology, Emergency, Infectious Diseases and Intensive Care Unit, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>12</sup> Division of Intensive Care Medicine, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>13</sup> Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>14</sup> Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>15</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>16</sup> Interdepartmental Division of Critical Care Medicine, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

<sup>17</sup> Department of Pathology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

<sup>18</sup> National Jewish Health, Department of Medicine, Pathology Division, Denver, Colorado, USA

## SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE

## CORONAVIRUS

# Identification of immunomodulatory drugs that inhibit multiple inflammasomes and impair SARS-CoV-2 infection

Leticia de Almeida<sup>1</sup>, Alexandre L. N. da Silva<sup>1</sup>, Tamara S. Rodrigues<sup>1</sup>, Samuel Oliveira<sup>1</sup>, Adriene Y. Ishimoto<sup>1</sup>, Amanda A. Seribelli<sup>1</sup>, Amanda Becerra<sup>1</sup>, Warrison A. Andrade<sup>1</sup>, Marco A. Ataíde<sup>1</sup>, Camila C. S. Caetano<sup>1</sup>, Keyla S. G. de Sá<sup>1</sup>, Natália Pelisson<sup>1</sup>, Ronaldo B. Martins<sup>1</sup>, Juliano de Paula Souza<sup>1</sup>, Eurico Arruda<sup>1</sup>, Sabrina S. Batah<sup>2</sup>, Ricardo Castro<sup>3</sup>, Fabiani G. Frantz<sup>3</sup>, Fernando Q. Cunha<sup>4</sup>, Thiago M. Cunha<sup>4</sup>, Alexandre T. Fabro<sup>2</sup>, Larissa D. Cunha<sup>1</sup>, Paulo Louzada-Junior<sup>5</sup>, Rene D. R. de Oliveira<sup>5</sup>, Dario S. Zamboni<sup>1\*</sup>

Copyright © 2022  
The Authors, some rights reserved;  
exclusive licensee  
American Association  
for the Advancement  
of Science. No claim to  
original U.S. Government  
Works. Distributed  
under a Creative  
Commons Attribution  
NonCommercial  
License 4.0 (CC BY-NC).

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) induces mild or asymptomatic COVID-19 in most cases, but some patients develop an excessive inflammatory process that can be fatal. As the NLRP3 inflammasome and additional inflammasomes are implicated in disease aggravation, drug repositioning to target inflammasomes emerges as a strategy to treat COVID-19. Here, we performed a high-throughput screening using a 2560 small-molecule compound library and identified FDA-approved drugs that function as pan-inflammasome inhibitors. Our best hit, niclosamide (NIC), effectively inhibits both inflammasome activation and SARS-CoV-2 replication. Mechanistically, induction of autophagy by NIC partially accounts for inhibition of NLRP3 and AIM2 inflammasomes, but NIC-mediated inhibition of NAIP/NLRC4 inflammasome are autophagy independent. NIC potently inhibited inflammasome activation in human monocytes infected *in vitro*, in PBMCs from patients with COVID-19, and *in vivo* in a mouse model of SARS-CoV-2 infection. This study provides relevant information regarding the immunomodulatory functions of this promising drug for COVID-19 treatment.

## INTRODUCTION

Human coronavirus infections are typically mild and rarely associated with a severe clinical outcome, but a few highly pathogenic human betacoronaviruses were previously identified: severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) in 2003 and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in 2012 (1). In 2019, a novel human-infecting betacoronavirus named as SARS-CoV-2 was identified as responsible for the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic (2). SARS-CoV-2 infection may be asymptomatic or cause a broad spectrum of symptoms, varying from mild upper respiratory tract symptoms in most individuals to a life-threatening disease (3). Severe and critical COVID-19 cases are associated with pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and respiratory failure (4). Poor clinical outcome correlates with the overactivation and dysfunctional immune response, along with cytokine storm (2, 3, 5).

The inflammasomes are multiprotein signaling platforms that assemble in the cytosol in response to microbial infections and cell stress. They are recognized by their important role not only for the defense against infections but also for their participation in the genesis of many human inflammatory disorders (6). Among the proinflammatory

cytokines, active interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 are hallmarks of the inflammatory response mediated by the inflammasomes (3). Recent reports suggest a critical role of the inflammasomes in the progression of COVID-19 to severe outcomes. It was initially shown that the inflammatory cytokine IL-6 is associated with COVID-19 severity (7). Notably, increased plasma levels of IL-6 are associated with elevated serum levels of lactate dehydrogenase, a cytosolic protein that is released from dying cells during inflammatory processes (8). Furthermore, an elegant longitudinal study performed in patients with COVID-19 revealed a correlation between the late-stage pathology in COVID-19 and cytokines linked to the inflammasome pathway, including IL-1 $\beta$  and IL-18 (9). Agreeing to these findings, we and others have demonstrated that SARS-CoV-2 infection triggers the activation of the NLRP3 inflammasome and that the magnitude of inflammasome activation in patients with COVID-19 correlates with the disease outcome (10–12), indicating that inflammasomes are activated by SARS-CoV2 and worsen the clinical outcome of patients with COVID-19.

Immunomodulatory agents that antagonize IL-6 have shown weak effects on the COVID-19 disease, possibly because of the dual functions of IL-6 during infection (13, 14). Although a clinical trial using an anti-IL-1 $\beta$  failed to meet primary end point for efficacy in patients with severe COVID-19 patients (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04362813>), studies using a recombinant IL-1 receptor antagonist commonly used to treat autoinflammatory disorders demonstrated clinical improvement in most patients with COVID-19 (15–18), indicating that the inflammasome is as a potential therapeutic target for COVID-19. Because repositioning of existing drugs for new indications is an effective strategy to quickly respond to emerging infectious diseases, we developed a quick and efficient high-content screening to identify approved drugs that can target multiple inflammasomes.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup>Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. <sup>5</sup>Divisão de Imunologia Clínica, Emergência, Doenças Infecciosas e Unidade de Terapia Intensiva, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

\*Corresponding author. Email: dszamboni@fmrp.usp.br

1 **CASP4/11 contributes to pulmonary inflammation and disease**  
2 **exacerbation in COVID-19**

3  
4 Tamara S. Rodrigues<sup>1#</sup>, Camila C.S. Caetano<sup>1#</sup>, Keyla S.G. de Sá<sup>1</sup>, Leticia  
5 Almeida<sup>1</sup>, Amanda Becerra<sup>1</sup>, Augusto V. Gonçalves<sup>1</sup>, Leticia de Sousa Lopes<sup>1</sup>,  
6 Samuel Oliveira<sup>1</sup>, Danielle P.A. Mascarenhas<sup>1</sup>, Sabrina S. Batah<sup>2</sup>, Bruna M.  
7 Silva<sup>3</sup>, Giovanni F. Gomes<sup>3</sup>, Ricardo Castro<sup>4</sup>, Ronaldo B. Martins<sup>1</sup>, Jonathan  
8 Avila<sup>5</sup>, Fabiani G. Frantz<sup>4</sup>, Thiago M. Cunha<sup>3</sup>, Eurico Arruda<sup>1</sup>, Fernando Q  
9 Cunha<sup>3</sup>, Helder Nakaya<sup>5</sup>, Larissa D. Cunha<sup>1</sup>, Alexandre T Fabro<sup>2</sup>, Paulo  
10 Louzada-Junior<sup>6</sup>, Renê D.R. de Oliveira<sup>6</sup>, Dario S. Zamboni<sup>1\*</sup>.

11 #, These authors contributed equally for this work.

12

13 <sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos,  
14 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão  
15 Preto, SP, 14049-900, Brazil.

16 <sup>2</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina de  
17 Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900,  
18 Brazil.

19 <sup>3</sup>Departamento de Farmacologia e Centro de Pesquisa em Doenças  
20 Inflamatórias CRID, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de  
21 São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

22 <sup>4</sup>Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatologia, Faculdade  
23 de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,  
24 Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

25 <sup>5</sup>Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP 05620-900, Brazil.

26 <sup>6</sup>Divisão de Imunologia Clínica, Emergência, Doenças Infecciosas e Unidade  
27 de Terapia Intensiva, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade  
28 de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

29 \*Corresponding author: Email: [dszamboni@fmrp.usp.br](mailto:dszamboni@fmrp.usp.br)

NOTE: This preprint reports new research that has not been certified by peer review and should not be used to guide clinical practice.

## 20. Anexo 3: Trabalho voluntário



### DECLARAÇÃO DE CUMPRIMENTO DE TRABALHO VOLUNTÁRIO

A Fundação Instituto Polo Avançado da Saúde de Ribeirão Preto, CNPJ 04.755.519/0001-30, responsável pelo SUPERA Parque de Tecnologia e Inovação de Ribeirão Preto, e Startups envolvidas no projeto SUPERA AÇÃO COVID 19, declaram, para os devidos fins, que o(a) presente voluntário(a) está trabalhando, voluntariamente, em parceria com as agências acima expostas, para a realização de testes de covid 19 para Ribeirão Preto e região.

O projeto consiste na realização de 5000 testes de forma gratuita para hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS) de Ribeirão Preto e região como meio de aumentar a quantidade de testes realizados e, conseqüentemente, reduzir a velocidade de propagação do vírus. O trabalho realizado é de caráter voluntário e a verba para compra dos materiais necessários provém de doações e de parcerias com outras instituições.

Visto essa proposta:

Declaramos que Keyla Santos Guedes de Sá, de CPF 01327306263, dedicou 98 horas para esse projeto, com envolvimento nas atividades da etapa Extração (vide descrição abaixo). As atividades ocorreram de 18/04/2020 à 01/06/2020.

Descrição da(s) etapa(s):

*Etapa Extração: A etapa de extração do RNA viral é uma etapa delicada e manual onde duplas de voluntários seguirão o protocolo de extração, supervisionados por um coordenador. A extração será realizada de acordo com protocolos estabelecidos pelos fabricantes de insumos laboratoriais e previamente validados durante a etapa de P&D. Ao receber a amostra total do pré-analítico, os voluntários da extração separam amostras para a contra-prova, para uma nova possível etapa de P&D e também para o protocolo de extração propriamente dito. Ao final do processo, os voluntários da extração obterão o RNA viral que será encaminhado para a próxima etapa, o PCR em tempo real.*

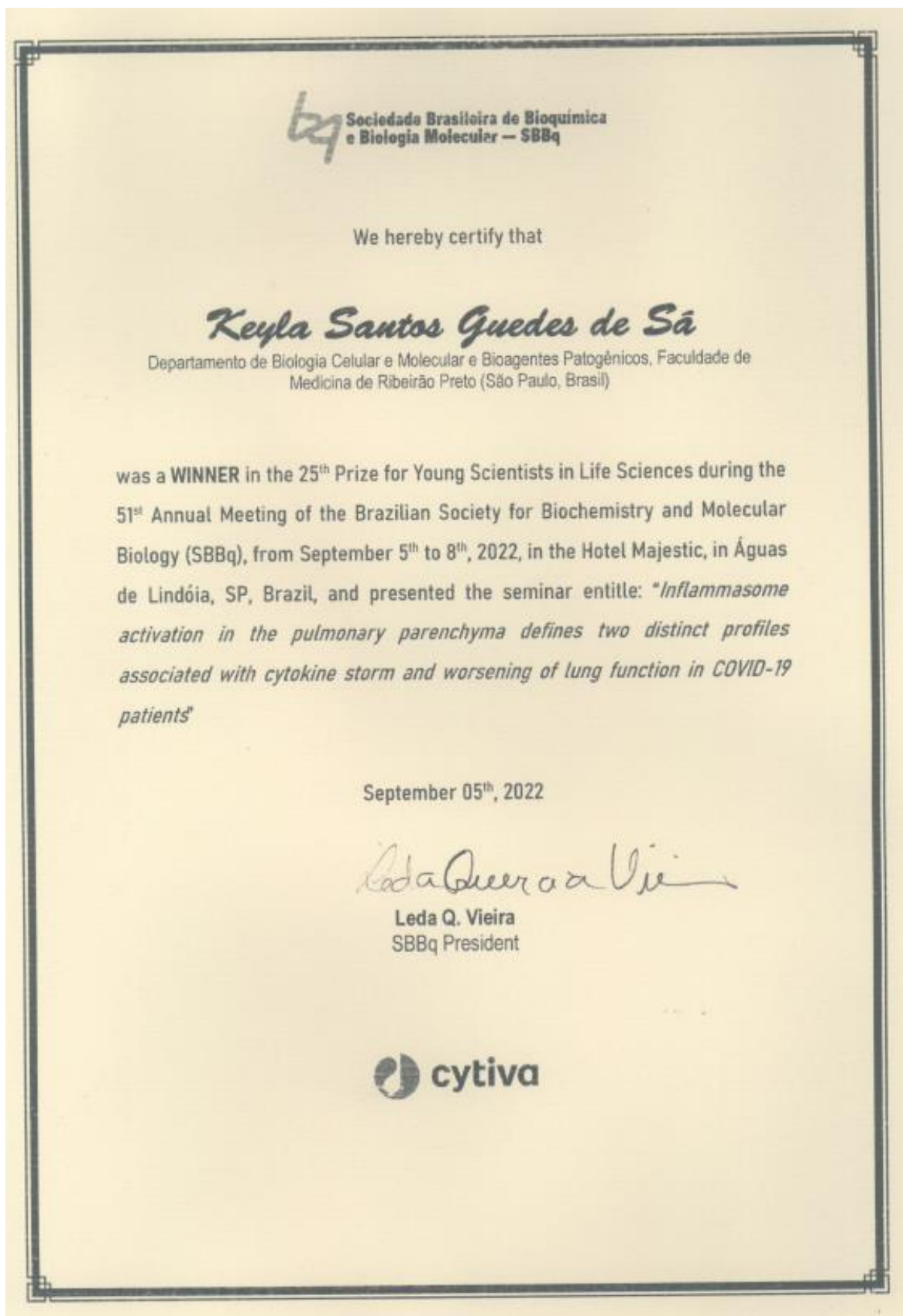
Ribeirão Preto, 18 de junho de 2020.

  
 \_\_\_\_\_  
 Saulo de Souza Rodrigues  
 Gerente de Fomento e Negócios

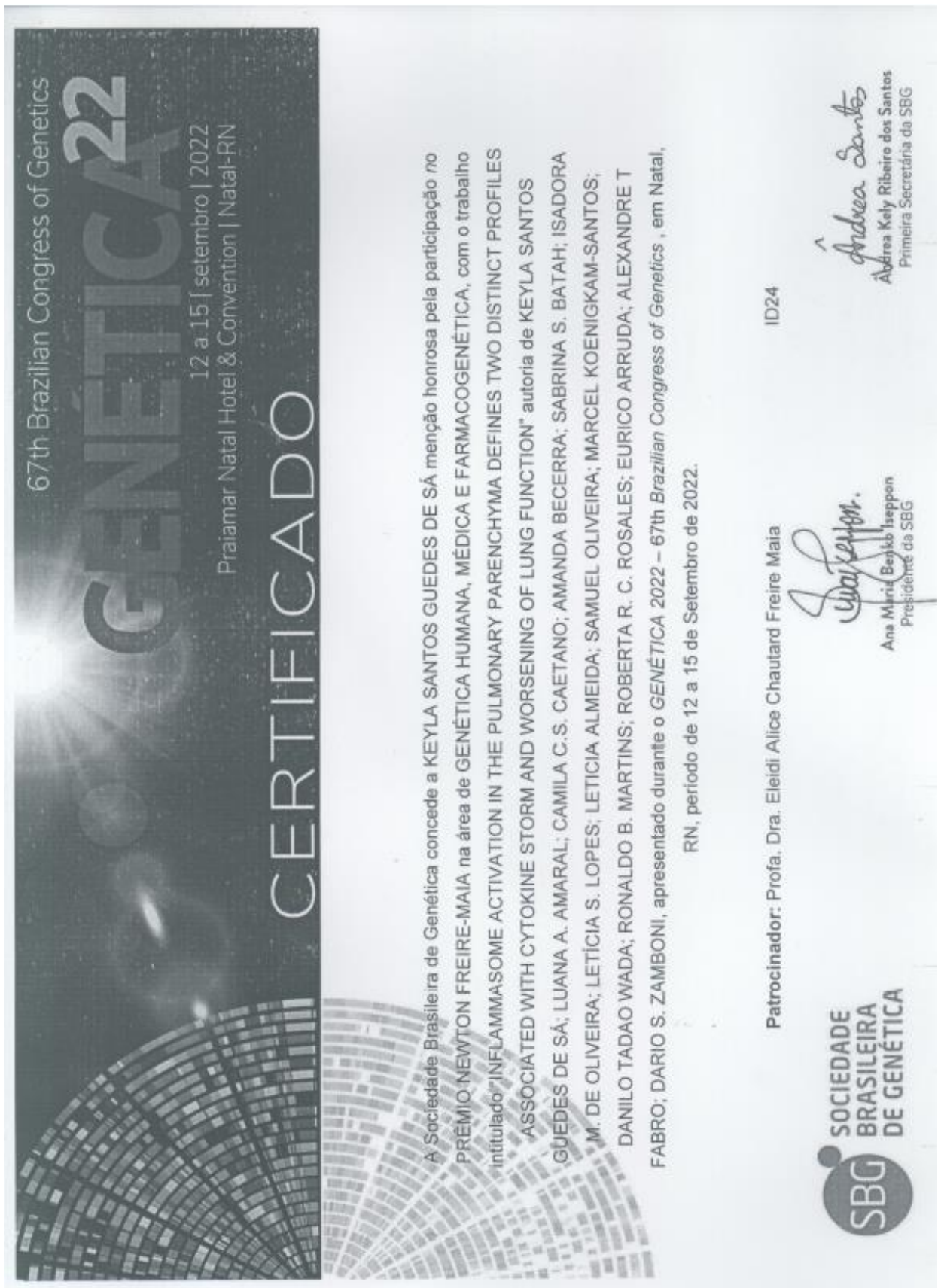
**04.755.519/0001-30**  
 FUNDAÇÃO INSTITUTO  
 POLO AVANÇADO DA SAÚDE  
 DE RIBEIRÃO PRETO  
 AV. DRA. NADIR AGUIAR, 1805  
 JD. DR. PAULO GOMES ROMEO - CEP 14.056-680  
 RIBEIRÃO PRETO-SP

## 21. Anexo 5: Prêmios

21.1 Prêmio Jovem Cientista em Ciências da Vida –  
Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)  
e Cytiva.



21.2 Menção Honrosa no Prêmio Newton Freire-Maia – Genética Humana e Médica e Farmacogenética – Sociedade Brasileira de Genética (SBG)



67th Brazilian Congress of Genetics

# GENÉTICA 22

12 a 15 | setembro | 2022  
Praiamar Natal Hotel & Convention | Natal-RN

## CERTIFICADO

A Sociedade Brasileira de Genética concede a KEYLA SANTOS GUEDES DE SÁ menção honrosa pela participação no PRÊMIO NEWTON FREIRE-MAIA na área de GENÉTICA HUMANA, MÉDICA E FARMACOGENÉTICA, com o trabalho intitulado "INFLAMMASOME ACTIVATION IN THE PULMONARY PARENCHYMA DEFINES TWO DISTINCT PROFILES ASSOCIATED WITH CYTOKINE STORM AND WORSENING OF LUNG FUNCTION" autoria de KEYLA SANTOS GUEDES DE SÁ; LUANA A. AMARAL; CAMILA C.S. CAETANO; AMANDA BECERRA; SABRINA S. BATAH; ISADORA M. DE OLIVEIRA; LETÍCIA S. LOPES; LETÍCIA ALMEIDA; SAMUEL OLIVEIRA; MARCEL KOENIGKAM-SANTOS; DANILO TADAO WADA; RONALDO B. MARTINS; ROBERTA R. C. ROSALES; EURICO ARRUDA; ALEXANDRE T FABRO; DARIO S. ZAMBONI, apresentado durante o GENÉTICA 2022 – 67th Brazilian Congress of Genetics, em Natal, RN, período de 12 a 15 de Setembro de 2022.

SBG  
SOCIEDADE  
BRASILEIRA  
DE GENÉTICA

Patrocinador: Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia ID24

Ana Maria Benjko Izeppon  
Presidente da SBG

Andreea Santos  
Primeira Secretária da SBG