

Aline Pacheco de Oliveira Lima

Vias moleculares envolvidas na resposta de astrócitos e
micróglia à infecção por *Trypanosoma cruzi*

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

São Paulo

2021

Aline Pacheco de Oliveira Lima

Vias moleculares envolvidas na resposta de astrócitos e
micróglia à infecção por *Trypanosoma cruzi*

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Karina Ramalho Bortoluci

Co-orientador: Ricardo Weinlich

Versão Original

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pacheco de Oliveira Lima, Aline
Vias moleculares envolvidas na resposta de
astrócitos e micróglia à infecção por *Trypanosoma*
cruzi / Aline Pacheco de Oliveira Lima; orientadora
Karina Ramalho Bortoluci; coorientador Ricardo
Weinlich. -- São Paulo, 2021.
108 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Glia. 2. *trypanosoma cruzi*. 3. NLRC4. 4.
RIPK3. 5. RIPK1. I. Ramalho Bortoluci, Karina,
orientador. II. Weinlich, Ricardo, coorientador.
III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Pacheco de Oliveira Lima

Título da Dissertação/Tese:

Orientador: Karina Ramalho Bortoluci

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou o (a) candidato (a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Arlete e Albertino (em memória) por tudo que fizeram para que fosse possível chegar até aqui hoje. Tudo que sou, tenho certeza que são frutos dos esforços e da dedicação de vocês em serem os pais mais amorosos, dedicados e batalhadores do mundo. Obrigada, e amo vocês, para sempre!

Ao Filipe meu companheiro da vida, de todas as jornadas principais e as “*side quests*” que passam por nosso caminho (incluindo me ajudar a revisar esta tese). Dividir com você as aventuras da vida foi a melhor decisão que já tomei. Esse compartilhar é o que torna tudo mais leve, mais valioso e mais feliz. Te amo!

A todos os amigos que o CTCMol me deu o prazer de conhecer e de receber a amizade de vocês como minha maior e melhor lembrança desse lugar. Em especial Barbara e Isaú por serem minhas risadas soltas, minhas músicas cantadas, minhas companhias (mesmo virtuais), meu trio. À Laura, Bianca, Camila, Gabriella, Carina e Silvia por serem grandes inspirações, exemplos de pessoas não só brilhantes intelectualmente, mas grandes corações, exemplo de seres humanos, excelentes amigas – verdadeiras inspirações de vida. Também aos amigos de bancada Marcelo, Luiza e Ingrid que além de minhas companhias perfeitas para um cafezinho, uma discussão de paper e um happy hour no tio-da-batata-e-maionese, também foram grandes aliados em todos os experimentos e em especial nesse momento de isolamento que foram minhas mãos e meus olhos quando não pude estar presente. Vocês são os melhores, amigos!

Aos amigos que mesmo não estando na bancada, me fizeram conseguir chegar aqui, com tantos outros suportes: à Verônica por toda sua companhia (pré e pós isolamentos), seu apoio, por me ajudar a revisar todo o conteúdo, por ser minha dupla e deixar eu ser da sua turma! À Suzana, Guilherme, Danilo, Luiza, Beatriz, Amanda e Veruska, que me trouxeram muitos momentos de alegria e leveza e também ouviram chororôs e não me deixaram desanimar. Muito obrigada, amigos!!

À minha orientadora Karina, por me aguentar todo esse tempo e por ter me feito crescer, amadurecer e não só no lado científico, mas também na vida. Obrigada por sempre ter me estimulado a dar meu melhor e sempre ter me ajudado a lapidar, nos momentos que eu não sabia como. Pela paciência e pela dedicação. Sou muito grata de ter feito parte deste laboratório tão rico – sem nenhuma menção a questão financeira, aqui.

Ao meu co-orientador Ricardo Weinlich por todo suporte teórico e moral neste período que por diversas vezes eu pude contar.

A todos os funcionários que passaram pelo CTCMol e nos ajudaram tanto na parte técnica, de manutenção e de logística do laboratório. Em especial a Beth: Betinha, sem você tudo teria sido 1000 vezes mais difícil, com metade da organização e o dobro do tempo.

Aos amigos da imuno, tanto da USP quanto da UNIFESP, em especial ao Paulo por ter sido minha companhia de perrengues de idas e vindas, entre outras aventuras nesse tempo.

Aos professores do programa de Imunologia especial ao Jean, Niels, Gustavo, Ricardo, e Otávio pelas aulas excepcionais que acrescentaram tanto no meu crescimento profissional. A todos os professores que já tive na vida, pois vocês são meus tesouros.

À Eni por toda paciência, parceria, por me explicar mil vezes sempre que necessário e pelo suporte e por estar sempre disponível! Ao João que também sempre foi muito atencioso e prestativo.

À banca examinadora por aceitar este convite e pela discussão científica que trará e agregará a este trabalho e à minha trajetória.

A todos os animais utilizados neste trabalho.

Às agências de fomento à pesquisa que tornam a ciência possível no Brasil: FAPESP, CAPES e CNPq.

A todos que de alguma forma torceram por mim, me trouxeram alegrias, distrações e boas risadas, meu muitíssimo obrigada!

A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada.
(Karl Popper)

Resumo

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que é amplamente descrito pela capacidade de invasão de células cardíacas, intestinais e do sistema imune inato, também pode invadir células do sistema nervoso central (SNC), causando lesões locais e transtornos neuropsiquiátricos. Micróglia e astrócitos têm funções distintas no SNC e ambos têm capacidade de responder a inflamações estéreis ou a infecções. Anteriormente, nosso grupo demonstrou a importância do inflamassoma NLRP3 para a produção de óxido nítrico (NO) e consequente controle da infecção nestas células. Ademais, tem sido descrito na literatura a participação da via da necroptose no controle de infecções e também colaborando para a ativação dos inflamassomas. Sabendo que tanto inflamassomas quanto moléculas da necroptose são expressas nas células do SNC, e ainda há poucos trabalhos descrevendo estas moléculas no controle da infecção por *T. cruzi*, sobretudo no tecido nervoso, nosso objetivo foi explorar estas duas vias e como elas influenciam a resistência de micróglia e astrócitos. **Métodos:** Micróglia e astrócitos obtidos de camundongos recém-nascidos (selvagens e nocautes para NLRC4 ou RIPK3) foram tratados ou não com inibidor de RIPK1 (Nec-1) e com inibidor de iNOS (aminoguanidina –AG) e infectados *in vitro* com tripomastigotas do *T. cruzi* cepa Y (MOI 5:1). No sobrenadante das culturas foram dosadas IL-1 β , NO, glutamato e lactato. A carga parasitária foi avaliada através da microscopia de fluorescência com intervalos de 2, 48 e 96 horas pós-infecção. **Resultados:** Foi possível notar que NLRC4 está envolvido com o controle da infecção por *T. cruzi* em micróglia e astrócitos. No entanto, enquanto NLRC4 tende a induzir a secreção de NO em micróglia, o seu efeito é oposto em astrócitos. Interessante, culturas de micróglia e astrócitos de animais NLRC4^{-/-} infectados com *T. cruzi* apresentam altos níveis de glutamato. Em contrapartida, micróglia mas não astrócitos de animais RIPK3^{-/-} são mais resistentes à infecção, por um mecanismo não relacionado à produção de NO. Já RIPK1 parece ter efeito inibidor do controle da infecção em micróglia e astrócitos por um mecanismo independente da secreção de NO e dos inflamassomas. **Conclusão:** De maneira geral, podemos concluir que NLRC4 está relacionado com a resistência e RIPK1 com a susceptibilidade de astrócitos e micróglia à infecção por *T. cruzi*. Ainda, a secreção de NO tem papel oposto no controle do *T. cruzi* por essas células gliais. Sendo assim, nossos dados ilustram a complexidade das vias citosólicas que atuam de modo peculiar em cada tipo celular para a resposta à infecção por *T. cruzi* e também secreção de metabólitos fundamentais para a comunicação celular no SNC.

Palavras-chave: Astrócito, Micróglia, *Trypanosoma cruzi*, NLRC4, RIPK1, RIPK3

Abstract

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), which is widely described for its ability to invade cardiac, intestinal and innate immune system cells, can also invade central nervous system (CNS) cells causing local lesions and neuropsychiatric disorders. Microglia and astrocytes have distinct functions in the CNS and both are capable of responding to sterile inflammation or infection. Previously, our group demonstrated the importance of the NLRP3 inflammasome for the production of nitric oxide (NO) and consequent control of infection in these cells. Furthermore, the participation of the necroptosis pathway in infection control and contribution to the activation of inflammasomes has also been described in the literature. Knowing that both inflammasomes and necroptosis molecules are expressed in CNS cells, and there are still few works describing these molecules in the control of *T. cruzi* infection (especially in nervous tissue) our objective was to explore these two pathways and how they influence resistance of microglia and astrocytes. **Methods:** Microglia and astrocytes obtained from newborn mice (wild and knockouts for NLRC4 or RIPK3) were treated or not with RIPK1 inhibitor (Nec-1) and with iNOS inhibitor (aminoguanidine –AG) and infected in vitro with trypomastigotes of the *T. cruzi* strain Y (MOI 5:1). In the culture supernatant, IL-1 β , NO, glutamate and lactate were measured. The parasite load was assessed using fluorescence microscopy at intervals of 2, 48 and 96 hours post-infection. **Results:** It was possible to note that NLRC4 is involved in the control of *T. cruzi* infection in microglia and astrocytes. However, while NLRC4 tends to induce NO secretion in microglia, its effect is opposite in astrocytes. Interestingly, microglia and astrocyte cultures from NLRC4^{-/-} animals infected with *T. cruzi* have high levels of glutamate. In contrast, microglia but not astrocytes from RIPK3^{-/-} animals are more resistant to infection, by a mechanism unrelated to NO production. On the other hand, RIPK1 seems to have an inhibitory effect on the control of infection in microglia and astrocytes through a mechanism independent of NO secretion and inflammasomes. **Conclusion:** Overall, we can conclude that NLRC4 is related to resistance and RIPK1 to the susceptibility of astrocytes and microglia to *T. cruzi* infection. Furthermore, NO secretion plays an opposite role in the control of *T. cruzi* by these glial cells. Therefore, our data illustrate the complexity of cytosolic pathways that act in a peculiar way in each cell type for the response to *T. cruzi* infection and also for the secretion of fundamental metabolites for cell communication in the CNS.

Keywords: Astrocyte, Microglia, *Trypanosoma cruzi*, NLRC4, RIPK1, RIPK3

Lista de Figuras

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 2 - Distribuição global dos casos da DC, baseado em estimativas oficiais (2018).....	19
Figura 3 -Domínios das proteínas NLRs e sua classificação.....	24
Figura 4 -ativação dos inflamassomas canônicos e seus respectivos estímulos	26
Figura 5- Vias iniciadoras da necroptose	33
Figura 6 - NLRC4 está envolvido na resposta da micróglia à infecção pelo <i>T. cruzi</i>	47
Figura 7 -RIPK3 participa do controle da infecção em micróglia por um mecanismo não relacionado à secreção de NO.....	49
Figura 8 - RIPK1 regula a capacidade tripanocida das micróglia de maneira independente de NLRC4 e NLRP3.....	51
Figura 9 - Vias metabólicas são impactadas pela expressão de moléculas dos inflamassomas, mas não por RIPK1, em micróglia.....	54
Figura 10- NLRC4 inibe a secreção de NO e tem papel no controle da infecção por <i>T. cruzi</i> em astrócitos	56
Figura 11 - RIPK3 não participa do controle da infecção em astrócitos	58
Figura 12 - RIPK1 tem papel no controle da infecção em astrócitos, por um mecanismo de inibição de NO e é capaz de modular ativação dos inflamassomas	60
Figura 13- Inflamassomas e RIPK1 modulam vias metabólicas em resposta a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	63

Lista de Abreviaturas

AD- do inglês, *acidic transactivation domain*

AIM2 – do inglês, *absent in melanoma 2*

ALS – do inglês, *Amyotrophic lateral sclerosis*

ASC – do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ATP – do inglês, *adenosine triphosphate*

AVC – acidente vascular cerebral

BBB – do inglês, *Blood Brain Barrier*

BIR – do inglês, *baculoviral inhibitory repeat-like domain*

CAPS – do inglês, *Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome*

CARD – do inglês, *caspase activation and recruitment domain*

cFLIP – do inglês, *cellular FLICE-like inhibitory protein*

CIAP – do inglês, *cellular inhibitor of apoptosis protein*

CLR – do inglês, *C-type lectin receptors*

CSF – do inglês, *cerebral spinal fluid*

DAMP – do inglês, *Damage-Associated molecular pattern*

DC - Doença de Chagas

DD – do inglês, *Death Domain*

DMSO – dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNDi – do inglês, *Drugs for Neglected Diseases initiative*

FADD – do inglês, *Fas-associated death domain*

FASL – do inglês, *Fas Ligand*

IRFs – do inglês, *IFN-responsive factors*

LPC – do inglês, *Lysophosphatidylcholine*

LRR – do inglês, *leucine-rich repeats*

MAPK – do inglês, *mitogen-activated protein kinase*

MAS – do inglês, *macrophage activation syndrome*

MLKL – do inglês, *mixed lineage kinase domain-like*

MSU – do inglês, *monosodium urate crystals*

mtDNA – do inglês, *mitochondrial DNA*

mtROS – do inglês, *mitochondrial reactive oxygen species*

MyD88 – do inglês, *myeloid differentiation primary-response protein 88*

NAIP – do inglês, *NLR Family Apoptosis Inhibitor Protein*

Nec-1 – necrostatina-1

NEK7 – do inglês, *NIMA [never in mitosis gene a]-related kinase 7*

NF- κ B – do inglês, *Nuclear factor kappa enhancer binding protein*

NLR – do inglês, *NOD and LRR domain containing receptors*

NO – do inglês, *Nitric Oxide*

NOD – do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain*

NOS2 – do inglês, *nitric oxide 2*

PAMP – do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PCD – do inglês, *programmed cell death*

PGAM5 – do inglês, *Phosphoglycerate mutase, an enzyme family member 5*

PPP – do inglês, *Pentose-Phosphate Pathway*

PRR – do inglês, *Pattern Recognition Receptors*

PYD – do inglês, *pyrin domain*

PYHIN – do inglês, *pyrin and HIN domain-containing*

RIPK1 – do inglês, *receptor-interacting serine-threonine kinase 1*

RIPK3 – do inglês, *receptor-interacting serine-threonine kinase 3*

RLR – do inglês, *RIG-I-like receptors*

ROS – do inglês, *reactive oxygen species*

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

SREBP – do inglês, *sterol regulatory element-binding proteins*

TCA – do inglês, *Tricarboxylic acid cycle*

TIRAP – do inglês, *TIR domain-containing adaptor protein*

TLR – do inglês, *Toll-like Receptors*

TNF- do inglês, *tumor necrosis factor*

TRADD – do inglês, *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain*

TRAF – do inglês, *TRIF-related adaptor molecule*

TRAIL – do inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TRIF – do inglês, *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β*

UVB – do inglês, ultravioleta B

WT – do inglês, Wild type

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
SUMÁRIO	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1.1. <i>Doença de Chagas: distribuição, transmissão, sintomas e tratamento</i>	17
1.1.2. <i>Impactos socioeconômicos da DC</i>	20
1.1.3. <i>Infecção do T. cruzi no SNC</i>	21
1.2. RESPOSTA IMUNE	23
1.2.1. <i>Imunidade inata e PRRs</i>	23
1.2.2. <i>Inflamassomas: formação, ativação e mecanismos efetores</i>	25
1.2.2.1. <i>NLRP3</i>	27
1.2.2.2. <i>NLRC4</i>	29
1.2.3. <i>Necroptose, RIPK1 e RIPK3</i>	31
1.2.4. <i>Inflamassomas e RIPKs na infecção por T. cruzi</i>	34
1.3. SNC, INFLAMASSOMAS E RIPKS	36
1.3.1. <i>Células da glia</i>	36
1.3.2. <i>Inflamassomas e RIPKs no SNC</i>	37
2. JUSTIFICATIVA	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. ANIMAIS E PARASITAS	42
3.2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS GLIAIS	42
3.3. INFECÇÃO DAS CÉLULAS GLIAIS	43
3.4. IMUNOFLORESCÊNCIA	43
3.5. DOSAGEM DE IL-1B, NO, LACTATO E GLUTAMATO	43
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4. RESULTADOS	45
4.1. MICRÓGLIA	46
4.1.1. <i>NLRC4 está envolvido na resposta da micróglia à infecção pelo T. cruzi</i>	46
4.1.2. <i>RIPK3 participa do controle da infecção em micróglia por um mecanismo não relacionado à secreção de NO</i>	48
4.1.3. <i>RIPK1 regula a capacidade tripanocida das micróglia de maneira independente de NLRC4 e NLRP3</i>	50
4.1.4. <i>Vias metabólicas são impactadas pelos inflamassomas, mas não por RIPK1, em micróglia</i>	53
4.2. ASTRÓCITO	55
4.2.1. <i>NLRC4 inibe a secreção de NO e tem papel no controle da infecção por T. cruzi em astrócitos</i>	55
4.2.2. <i>RIPK3 não participa do controle da infecção em astrócitos</i>	57
4.2.3. <i>RIPK1 inibe o controle da infecção por T. cruzi em astrócitos de maneira independente dos inflamassomas</i>	59
4.2.4. <i>Inflamassomas modulam vias metabólicas dos astrócitos em resposta à infecção pelo T. cruzi</i>	62

5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICES.....	103
LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	104
ANEXOS	105
<i>Anexo A – Certificado de aceite do Comitê de ética (ICB).....</i>	<i>106</i>
<i>Anexo B – Certificado de aceite do Comitê de ética (UNIFESP)</i>	<i>107</i>

1. Introdução

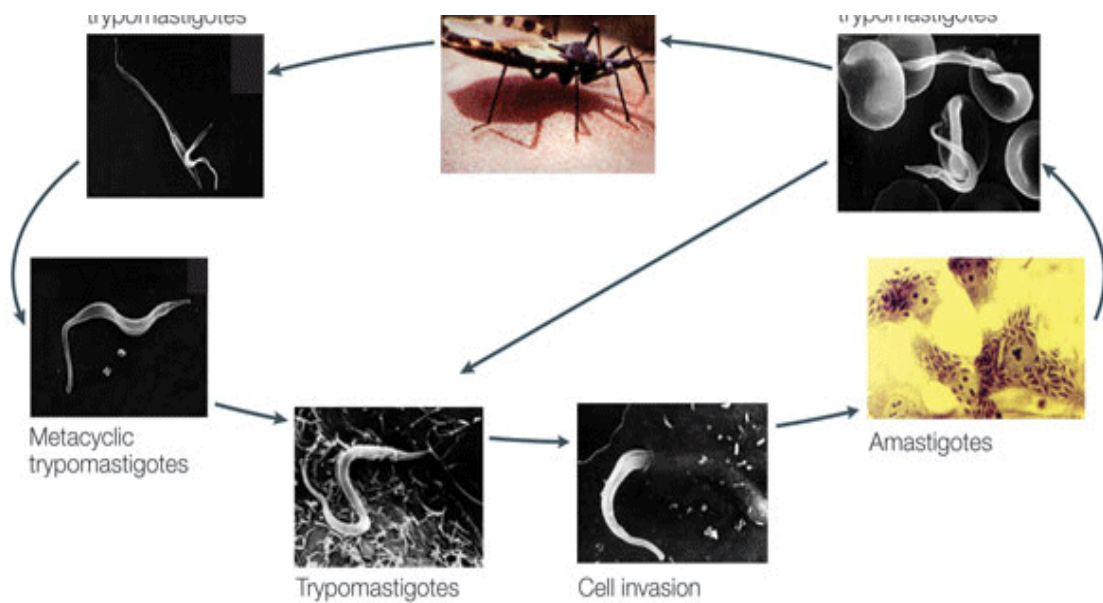
1.1. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

1.1.1. Doença de Chagas: distribuição, transmissão, sintomas e tratamento

Em 1908, o médico e cientista Carlos Chagas estudando insetos comuns na comunidade que ele estava alocado, em Minas Gerais, encontrou uma nova espécie de protozoário que parasitava estes insetos. Era uma nova espécie de *Trypanosoma* e ele escolheu homenagear seu companheiro de profissão, chefe e tutor Oswaldo Cruz, nomeando-a *cruzi*. No ano seguinte, em 1909, Carlos examinou uma menina de dois anos de idade que estava muito febril, e encontrou em suas amostras de sangue o mesmo protozoário que ele tinha observado no inseto triatomíneo. Logo em seguida, Carlos Chagas foi capaz de associar a presença daquele parasita com a doença da menina Berenice. Assim, se tornou o primeiro cientista a descrever o novo parasita, seu vetor de transmissão, e a doença causada pelo mesmo. A doença foi nomeada em sua homenagem: Doença de Chagas (DC). Além de um feito extraordinário para medicina mundial, Carlos Chagas também teve papel muito importante no entendimento da DC e também em outras doenças infecciosas como a malária e outras tripanossomíases (1).

Também chamada de tripanossomíase americana, a DC é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo todo, sendo aproximadamente 5,7 milhões apenas na América Latina (2). Este protozoário é um parasita intracelular obrigatório e em seu ciclo de vida apresenta 3 diferentes morfologias que variam de acordo com a fase do ciclo que está. A transmissão acontece na maior parte dos casos através do inseto vetor triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro. Durante sua picada, esse inseto deposita sobre a pele do animal (ou pessoa) suas fezes e urina que estão contaminadas pela forma infectante do *T. cruzi*, a forma flagelada, tripomastigota. Uma vez dentro das células do hospedeiro, o *T. cruzi* passa para sua forma replicativa que é aflagelada, chamada amastigota. A forma amastigota, após sua replicação, pode voltar para a forma tripomastigota, levando à lise da célula do hospedeiro. Com o rompimento da célula, o parasita é liberado para a corrente sanguínea do hospedeiro. Quando este hospedeiro é novamente picado por outro inseto triatomíneo, ele suga junto com o sangue os tripomastigotas. Ao longo do sistema digestivo do inseto, o parasita pode passar para sua forma epimastigota, que é a forma que se reproduz sexuadamente. No final do tubo digestivo do inseto o parasita volta para a forma infectante tripomastigota e fecha o ciclo de vida, infectando novas células hospedeiras. (Figura 1)

Figura 1- Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

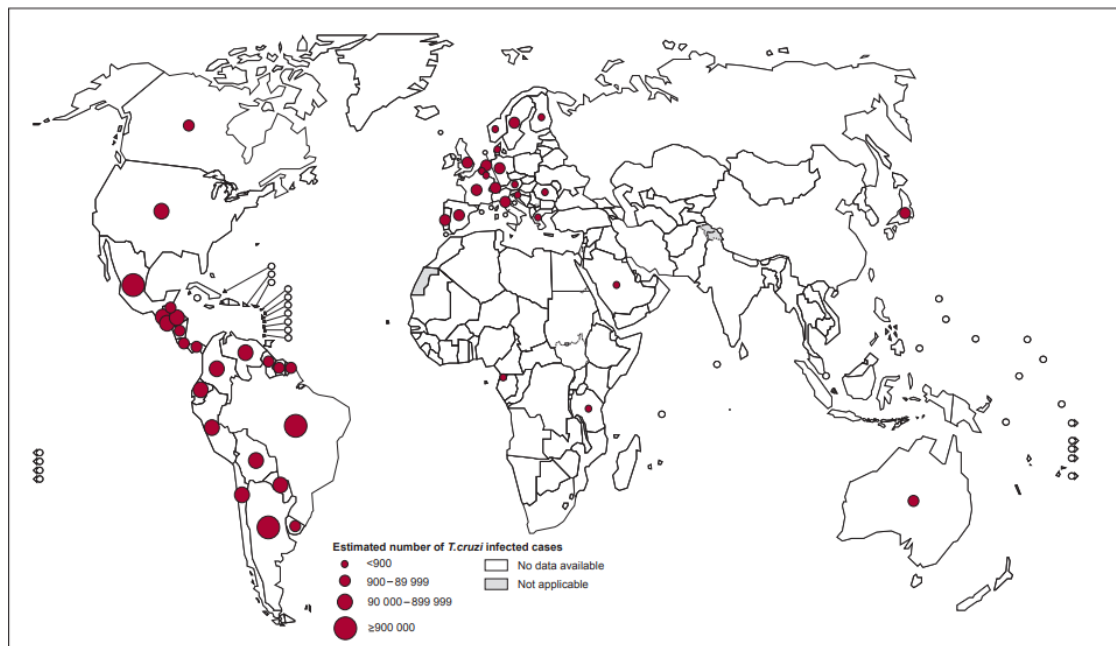


Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

O inseto vetor deposita o protozoário na sua forma infectante, tripomastigota, na pele do hospedeiro. Essa forma é capaz de invadir a célula hospedeira e, uma vez intracelular, o parasita passa para sua forma amastigota que se replica assexuadamente. O parasita retorna à forma tripomastigota e, após causar a lise da célula hospedeira, é liberado para corrente sanguínea do hospedeiro. Nesse momento se um inseto vetor forragear por alimento e absorver o sangue com essas formas tripomastigotas, no seu intestino o parasita passa para sua forma epimastigota. Essa forma pode se reproduzir sexuadamente e mais uma vez voltar para sua forma infectante e infectar novas células hospedeiras, fechando o ciclo de vida do parasita. Fonte: Andrade e Andrews, 2005 (3).

Há ainda outras formas de transmissão que não necessitam do inseto vetor, tais como: o consumo de alimentos diretamente contaminados pelo *T. cruzi* (como o consumo de açaí ou bagaço da cana-de-açúcar ao serem processados juntos do barbeiro, sem esterilização); a transmissão vertical entre mãe contaminada e feto; através de doação de órgãos ou transfusão sanguínea de doadores infectados; e em acidentes biológicos em laboratórios (4). A partir de meados 2010, a OMS tem apontado o aumento significativo dos casos da DC em regiões não-endêmicas do inseto, como Estados Unidos, Canadá, alguns países da África, da Europa, e até mesmo do leste do Pacífico. Isso se deve majoritariamente ao aumento das migrações urbanas e principalmente à falta de conhecimento sobre a DC nesses locais não-endêmicos do inseto, que, no geral, não fazem o teste para *T. cruzi* antes de transfusões ou transplantes (Figura 2) (5–7).

Figura 2 - Distribuição global dos casos da DC, baseado em estimativas oficiais (2018)



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Mapa mundi sobre a distribuição e o número de casos (aproximado) para cada país. Fonte: adaptado de Organização Mundial da Saúde, 2018 (8)

A doença apresenta duas fases: a fase aguda em que o contato com o parasita é recente (no máximo 8 semanas). Neste primeiro momento, o parasita é encontrado em grande quantidade na circulação (parasitemia alta) mas os sintomas são muitos leves, inespecíficos e muitas vezes até assintomáticos. Na fase crônica, o parasita dificilmente é encontrado na circulação, mas está presente em alguns tecidos. Esta fase se subdivide em dois momentos: a fase intermediária, na qual o parasita está alojado nos tecidos de forma latente; e a fase de reativação - que pode acontecer anos após o primeiro contato - em que o parasita sai do estado de latência, causando danos nos tecidos em que estava alojado. Nesta última fase, os danos causados pelo parasita são mais graves e geralmente são irreversíveis, ou até mesmo fatais. Em cerca de 30% dos casos há acometimento cardíaco e 10% apresentam distúrbios neurológicos, intestinais ou ambos.

Atualmente, o tratamento para pacientes da DC é feito com benzonidazol ou com nifurtimox. Apesar da comprovada capacidade tripanocida destes fármacos, existem muitos dados na literatura sobre seus efeitos colaterais, suas restrições para gestantes e suas limitações de efetividade de acordo com a fase da doença e a idade do paciente (9). Para mais, o

tratamento com benzonidazol, por exemplo, pode se estender por semanas, o que leva uma baixa aderência de seguir com o mesmo até o fim (9).

1.1.2. Impactos socioeconômicos da DC

Mesmo com o número alto de pessoas infectadas e com muito tempo desde sua primeira descrição, a DC ainda é uma das doenças tropicais negligenciadas. Esforços internacionais têm ganhado força a fim de aumentar a conscientização sobre a doença, não só nos países latinos, mas também no mundo todo. Em 2019, ano do 110º aniversário desde a primeira vez que o *T. cruzi* foi isolado por Carlos Chagas (em 1909), decidiu-se que 14 de abril seria celebrado o “*Dia Internacional da Doença de Chagas*” e em 2020 foi sua primeira celebração (5). O intuito de instituir esta data comemorativa é aumentar a conscientização da população e de agentes de saúde, e também dar visibilidade para esta doença que atinge principalmente pessoas em áreas pobres e marginalizadas, tentando diminuir o estigma social associado à doença (5).

Mesmo que a maior parte dos casos de pessoas afetadas com DC não sejam casos fatais, as comorbidades - relacionadas principalmente aos casos crônicos da doença - têm grande impacto social e econômico para a pessoa acometida e também para sua família e comunidade. Casos de comorbidades afetam diretamente a disponibilidade, o tipo e o tempo de trabalho no qual a pessoa pode envolver-se, o que conseqüentemente afeta significativamente seu orçamento familiar. Também do ponto de vista de saúde pública, o investimento para manter os cuidados das pessoas com a forma crônica da doença, no geral, são muito maiores do que os gastos com a detecção e tratamento na fase aguda inicial da doença.

Estima-se que dentro da população de risco, apenas 10% das pessoas são testadas e diagnosticadas e apenas 1% recebe os medicamentos necessários para o tratamento. Um estudo da Dra. Eileen Stillwaggon da Faculdade Nacional de Medicina Tropical no Texas, EUA, estimou que se o teste para DC fosse feito com eficácia nas mulheres grávidas que têm origem nas regiões de risco, a prevalência da doença cairia pela metade e a redução de custos dos cuidados somariam, em média, 400 milhões de dólares ao ano (naquele estado) (10). Em 2015, na Colômbia, um dos países endêmicos da DC, foi iniciado um programa piloto, advindo da parceria entre a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) e o governo Colombiano, que buscou aumentar o acesso ao diagnóstico e ao tratamento da DC. O programa conseguiu expandir a testagem, diagnóstico e o tratamento da DC na região e teve grande impacto socioeconômico nestes municípios (11). O aumento do número de casos diagnosticados foi de

aproximadamente 400% ainda no segundo ano do projeto. Consequentemente a maior parte eram de casos na fase inicial da doença, e também casos dentro da faixa etária em que o tratamento com benzonidazol tem maior efetividade. A análise mais recente deste projeto avaliou um cenário sem estes diagnósticos – no qual fosse preciso administrar suas futuras complicações - resultaria no gasto de U\$9,7 milhões, enquanto o valor de testagem, diagnóstico e tratamento desses casos foi de U\$5,5 milhões, portanto economizando U\$4,2 milhões para o sistema de saúde local (11).

1.1.3. Infecção do *T. cruzi* no SNC

Desde 1911, Carlos Chagas já estudava casos do acometimento do Sistema Nervoso Central (SNC) pelo *T. cruzi* (12). Ele e outros autores se debruçaram sobre esse assunto tentando relacionar a presença do parasita neste tecido com os sintomas observados em alguns pacientes (13). Além disso, há muitos autores que buscaram descrever quais células do sistema nervoso poderiam ser infectadas pelo *T. cruzi* (12,14), como este tecido responde em casos experimentais da infecção (15,16) e como os casos de infecção em animais e pacientes podem variar devido a pluralidade de fontes de infecção, das variações genéticas e das cepas do protozoário e também das variações genéticas dos organismos hospedeiros (17).

Mesmo em baixa frequência (cerca de 5 a 10% entre os casos da fase aguda), o parasita pode levar ao desenvolvimento de gravidades como meningoencefalite combinados ou não com cardiopatias, que acabam sendo fatais na maior parte das vezes (18). Esses casos são mais propensos a acometer crianças abaixo de 2 anos, adultos acima de 60 anos, ou pessoas imunodeprimidas ou imunocomprometidas (13). Cerca de 30% das pessoas que desenvolvem a forma crônica da DC desenvolvem estas complicações mais graves da doença, relacionadas ao sistema cardíaco, digestivo, nervoso ou ambos. Os casos mais graves, relacionados com maior mortalidade da DC são os casos de co-infecção com *T. cruzi* e HIV. Nesses casos, o *T. cruzi* se comporta como uma infecção oportunista e passa a ser reativado, principalmente nos casos de HIV⁺ antes do tratamento com retrovirais. Uma vez diagnosticada a reativação, o tratamento passa a ser como nos casos agudos e é administrado o antiparasitário (benzonidazol ou nifurtimox). Também deve-se iniciar o tratamento antirretroviral o mais rápido possível. A mortalidade nestes casos de co-infecção é consideravelmente alta, sendo relatada entre 70% até 100% dependendo do estudo (19). Apesar de não ser tão prevalente a co-infecção com *T. cruzi* e HIV (entre 1,3 a 7,1 % dos casos de DC, ou 5% dos casos de HIV) (20), a severidade é sempre alta: cerca de 70 a 90% dos casos de co-infecção trazem danos ao SNC e cerca de 10 a

55% tem danos cardíacos (18). Apesar dessa alta gravidade, a co-infecção *T. cruzi* e HIV ainda não foi sistematicamente analisada nos países em que a DC é endêmica. Uma revisão sistemática desta co-infecção entre os anos de 1980 e 2010 mostrou que, dos casos registrados, 76% eram no Brasil, 19% na Argentina, 1,7% nos Estados Unidos, 1,7% no Chile e 1% na Espanha (21).

Além da co-infecção *T. cruzi* e HIV, a mais recente preocupação de saúde global - a COVID-19, causada pelo SARS-Cov2 - também tem sido alvo de atenção para os pacientes da DC. Devido às comorbidades que a DC traz (principalmente cardiopatologias), esses pacientes têm sido colocados nos grupos de risco para a COVID-19. Existem relatos na literatura em que a co-infecção *T. cruzi* e SARS-Cov2 foi fatal (22,23). Nestes trabalhos é discutido que, assim como no caso do HIV, a COVID-19 pode resultar em linfopenia, e assim o *T. cruzi* age como uma infecção oportunista e pode acabar levando a quadros graves e geralmente fatais a esses pacientes.

Nos casos de meningoencefalite o diagnóstico pode acontecer ao ser observado nódulos ou granulomas no SNC derivados dos ninhos de replicação do parasita, ou também quando é encontrado a presença do *T. cruzi* no líquido cefalorraquidiano (*cerebral spinal fluid*; CSF) (21,24). Geralmente a presença do parasita no tecido nervoso é percebida nos casos de reativação do parasita, anos após seu contato, em pessoas imunossuprimidas ou imunocomprometidas quando estas começam a notar sintomas mais agudos como febre, perda de consciência, letargia, convulsões, déficits sensoriais, entre outros (24) e podem até ser o motivo pelo qual o quadro de AIDS é diagnosticado e passa-se a iniciar seu tratamento para ambas infecções (25,26). Há ainda, casos crônicos da doença que podem envolver outros sintomas como isquemia cerebral, encefalopatia, desmielinização e transtornos neuropsiquiátricos (24). Tais transtornos relacionados à depressão e mudanças comportamentais podem acometer os pacientes crônicos da DC, independente da presença do parasita no parênquima do tecido nervoso, mas apenas pelo ambiente inflamatório persistente (27). Apesar dos relatos de anormalidades no SNC advindos da infecção por *T. cruzi* ser descrito há muitos anos, ainda há pouco aprofundamento nestes casos do ponto de vista clínico-patológico e também do ponto de vista celular e molecular. Somado à inespecificidade dos sintomas existe também a possibilidade de outras infecções mais comumente encontradas no SNC, como por exemplo o *Toxoplasma gondii* (28,29), que aumentam a dificuldade do diagnóstico e, conseqüentemente, o entendimento mais aprofundado desta infecção no SNC e suas conseqüências para a vida do paciente.

1.2. Resposta Imune

1.2.1. Imunidade inata e PRRs

A imunidade inata é quem primeiramente responde a infecções ou sinais de perigo ao hospedeiro. Através de diversos receptores (*Pattern Recognition Receptors*; PRRs) cujo papel é reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*; PAMPs) ou a dano celular (*Damage-Associated molecular pattern*; DAMPs), a imunidade inata é acionada e desencadeia as respostas imunes mais completas e adequadas para cada situação. Existem diversos tipos de PRRs, que podem ser categorizados principalmente em: 1) PRRs ancorados às membranas (celular ou endossomal) que são, por exemplo, os receptores do tipo Toll (*Toll-like Receptors*; TLRs) e os receptores de lectina tipo-C (*C-type lectin receptors*; CLR); e 2) PRRs citoplasmáticos como os receptores NLR (*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) leucine-rich repeats (LRR) domain containing receptors*); do tipo PYHIN (*pyrin and HIN domain-containing*), do tipo RIG (*RIG-I-like receptors*; RLRs), e um crescente número de receptores citosólicos sensores de ácidos nucleicos que vêm sendo descritos (30,31).

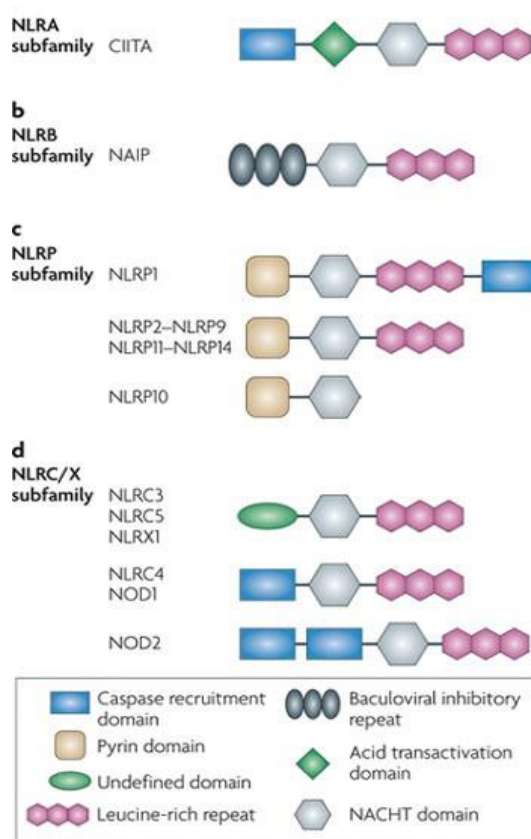
Os TLRs estão dentre os PRRs melhor descritos na literatura. Eles são receptores do tipo transmembrânicos e portanto estão sempre ancorados ou a membrana citoplasmática ou às membranas de endossomos, e também por esta razão reconhecem PAMPs extracelulares ou dentro destes endossomos (32). De modo geral, após a ligação com seu respectivo ligante, os TLRs se dimerizam e disparam uma cascata de sinalização intracelular. Na ativação desses receptores, recrutam proteínas adaptadoras que podem ser: MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β*) ou TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). Dependendo da proteína adaptadora ativa, a via de sinalização se difere mas, por fim, levam à ativação de fatores de transcrição importantes como o NF- κ B (*Nuclear factor kappa enhancer binding protein*) e IRFs (*IFN-responsive factors*), que induzem a transcrição de diversos genes pró-inflamatórios como Interferon do tipo I (IFN-I), óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*; TNF), entre outras citocinas (33).

Os NLRs formam o maior grupo dentre os PRRs citosólicos. Nesta família, estas proteínas são geralmente formadas por três domínios: um domínio central de oligomerização (NOD), que dá nome ao grupo; um domínio na região carboxi-terminal (LRR); e um domínio na região amino-terminal variável que determina as interações homotípicas que este receptor terá após sua ativação. Esta região variável é utilizada para agrupar essas proteínas em subfamílias: NLRA que tem domínio AD (*acidic transactivation domain*), também chamado CIITA; NLRP para os que tem

domínio PYD (*pyrin domain*); NLRC para os que possuem domínio CARD (*caspase activation and recruitment domain*); e NLRB para os que tem domínio BIR (*baculoviral inhibitory repeat-like domain*) que também são chamados NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory proteins*) (34,35) (Figura 3).

Os primeiros receptores desse grupo a serem descritos foram o NOD1 e NOD2 (NLRC1 e NLRC2 respectivamente). Estes reconhecem peptideoglicanos presente na parede celular de bactérias (36) e de maneira semelhante aos TLRs, sua ativação ativa fatores de transcrição como NF- κ B e proteínas da via de sinalização das MAP kinases (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) (37,38). Alguns anos mais tarde se observou que certos membros dos NLRs conseguiam clivar uma protease inflamatória, a Caspase-1, e induzir a secreção das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18, além de induzir uma morte celular programada, através da formação de uma plataforma denominada inflamassoma (39).

Figura 3 - Domínios das proteínas NLRs e sua classificação



Nature Reviews | Drug Discovery

Proteínas NLR possuem um domínio central NACHT, um domínio LRR na região C-terminal e um domínio variável na região N-terminal, sendo que a partir deste, as proteínas são alocadas em subfamílias. **A)** NLRAs contendo o domínio de transativação (AD); **B)** NLRBs (também chamados de NAIPs) contendo o

domínio BIR; **C**) NLRPs contendo o domínio PYD; **D**) NLRCs contendo o domínio CARD. Fonte: Geddes e colaboradores, 2009 (34)

1.2.2. Inflamassomas: formação, ativação e mecanismos efetores

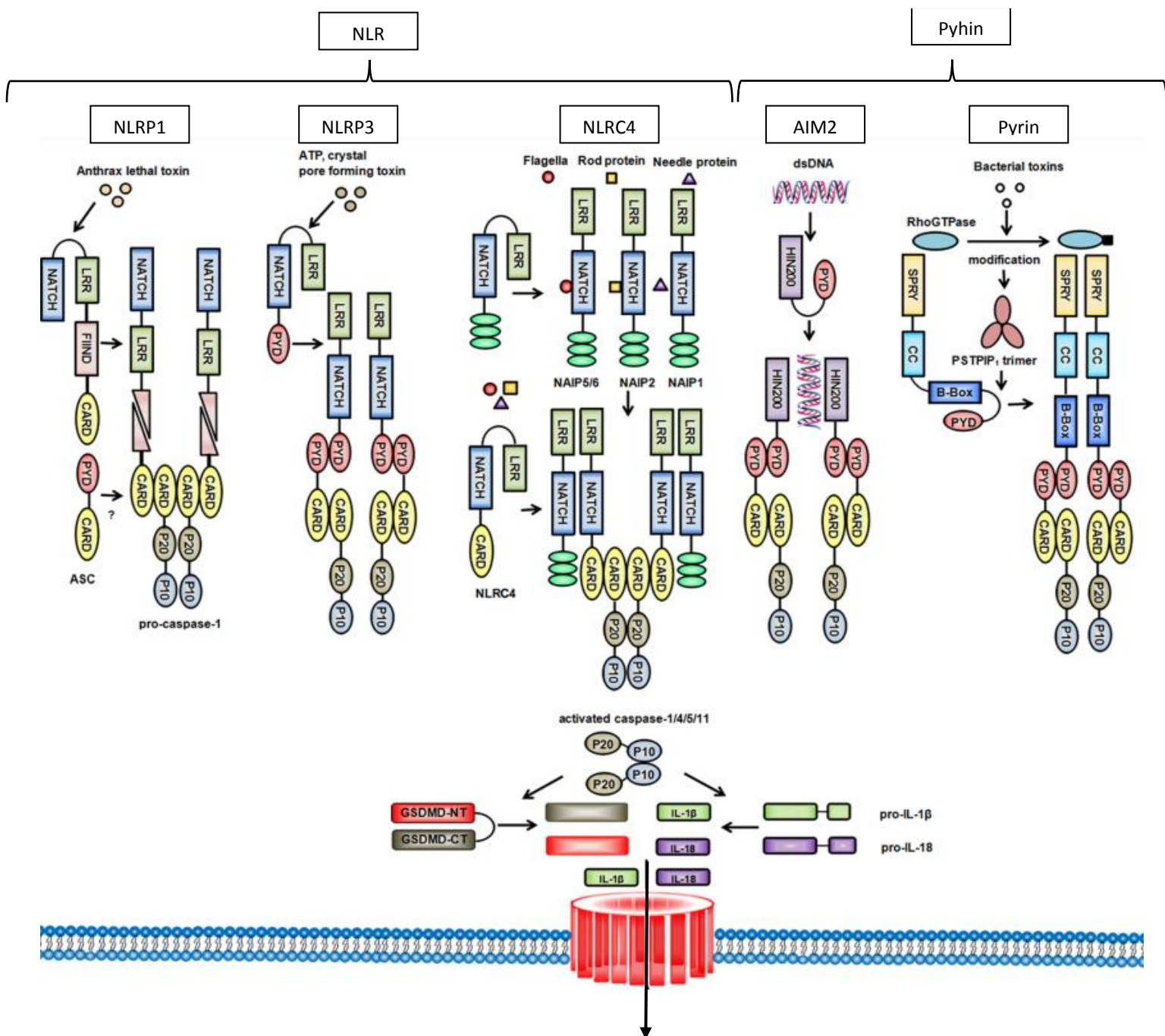
Alguns anos antes da descrição dos inflamassomas, já se sabia que a caspase-1 era a caspase inflamatória responsável por clivar as pró-formas das citocinas pró-IL-1 β e pró-IL18 nas suas respectivas formas ativas IL-1 β e IL-18. Também já se tinha observado que a caspase-1 era responsável por causar um tipo de morte celular altamente inflamatória. Até que em 2002, pela primeira vez, Martinon, Burns e Tschopp descreveram o processo celular que causava a ativação da caspase-1 e, conseqüentemente, a ativação da IL-1 β e IL-18. Esse processo dependia de um complexo protéico, formado por uma proteína do tipo NLR mais a proteína adaptadora ASC (na época chamada de Pycard) e a pró-caspase-1 e/ou 11 (caspase 11 em camundongos e caspase 4/5 em humanos). A este complexo de proteínas os autores chamaram “Inflamassomas”. Este nome veio a partir da semelhança do complexo “apoptossoma” adicionado ao prefixo “inflama” sugerindo sua ação altamente inflamatória (39). Este trabalho em específico observou a formação do complexo com a proteína NLRP1, mas eram recém descritas à época NLRP2, e NLRP3 sobre os quais os autores discutiam que, semelhante ao funcionamento dos TLRs, cada receptor reconheceria determinado estímulo molecular.

Hoje já se sabe que os inflamassomas canônicos são compostos por: um sensor citosólico, a proteína adaptadora ASC somada à pró-caspase-1, sendo que esse sensor citosólico pode ser da família NLR ou da família dos Pyhin. Os inflamassomas mais estudados atualmente são os formados pelos sensores NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 e Pypin (revisado em (40,41)) onde, em linhas gerais, NLRP1 responde à toxina letal de *B. anthracis* e também ao protozoário *Toxoplasma gondii*; NLRC4 responde a estímulos como a flagelina e ao complexo secretório de bactérias; o AIM2 reconhece fragmentos de DNA citoplasmáticos (tanto do próprio hospedeiro como DNA exógenos) e o Pypin (também conhecido como TRIM20) consegue reconhecer modificações na proteína Rho, geralmente desencadeadas pela toxina de algumas bactérias como a *Clostridium difficile* e a *Clostridium botulinum* (40) (Figura 4).

As proteínas sensoras estão dispostas no citoplasma na sua forma inativa e, ao se ligarem aos seus respectivos estímulos, mudam sua conformação e então passam a ter a capacidade de se oligomerizar e recrutar a proteína ASC. Esta última, através do domínio CARD, consegue recrutar a caspase-1 na sua forma inativa (pró-caspase-1). Nesse estado, as caspases recrutadas no complexo conseguem se auto-clivar e tornam-se ativas. Assim, têm a habilidade de clivar tanto as citocinas IL-1 β e IL-18 como também a proteína Gasdermina D (39,42) (Figura

4). Apenas em 2015 se entendeu como os inflamassomas participam da morte celular chamada piroptose (prefixo 'pyro' – do grego fogo/inflamação + sufixo 'ptose' - do grego falência/morte celular). Após ser clivada pela caspase-1, na sua região N-terminal, a Gasdermina D é capaz de formar poros na membrana celular, que causam rápido influxo de água e desequilíbrio osmótico da célula, levando à sua lise (43,44) (Figura 4). Esse processo libera o conteúdo citoplasmático da célula para o meio extracelular, o que permite restringir a replicação de parasitas intracelulares e também acentua a ativação das células ao redor e do processo inflamatório como um todo, favorecendo a resolução da infecção naquele determinado ponto (43,44).

Figura 4 -ativação dos inflamassomas canônicos e seus respectivos estímulos



Os inflamassomas são formados por proteínas da família NLR ou Pyhin. Os inflamassomas melhor conhecidos são aqueles formados por NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 e Pyrin. Em termos gerais, NLRP1 responde à toxina letal de *B. anthracis* e também ao protozoário *Toxoplasma gondii*; NLRP3 responde a diversos estímulos incluindo ATP, toxinas formadoras de poros, entre outros; NLRC4 responde a flagelina, a proteína Rod e a proteína Needle, presentes no complexo secretório de bactérias; o AIM2 reconhece fragmentos de DNA citoplasmáticos; e o Pyrin reconhece modificações na proteína Rho, geralmente desencadeadas pela toxina de algumas bactérias. Após sua ativação, esta proteína passa a se oligomerizar e então recruta a proteína adaptadora ASC, que por sua vez recruta a pró-caspase-1. Esse complexo permite a caspase-1 se auto clivar. Em sua forma ativa, esta proteína pode clivar seus substratos pró-IL-1 β , pró-IL-18 e a Gasdermina-D. Esta última, é levada até a membrana formando poros na mesma, causando a morte por piroptose e facilitando a secreção das formas maduras de IL-1 β e IL-18 (Fonte: Adaptado de Lu e colaboradores (35)).

Desde sua descrição até hoje, os inflamassomas vem sendo estudados em diversos contextos, desde doenças infecciosas até patologias inflamatórias estéreis, como doenças autoimunes (45), doenças metabólicas (46), câncer (47,48), Alzheimer (49), entre muitas outras. Uma doença que passou a ser melhor entendida foi a CAPS (*Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome*), em que, por mutações genéticas no gene do NLRP3, o indivíduo tem esse sensor constitutivamente ativo e assim possui uma altíssima ativação dos inflamassomas. Consequentemente, apresenta processos inflamatórios persistentes que causam lesões teciduais muito severas (50). Nesse caso e em outros casos, principalmente relacionados a doenças crônicas reumáticas ou gota, o tratamento é feito com bloqueadores da ação da IL-1 β (51–53).

1.2.2.1 NLRP3

Atualmente o inflamassoma composto por NLRP3 é o inflamassoma mais estudado e descrito na literatura. Para a ativação canônica existem duas fases: 1- um primeiro sinal, chamado *priming*, que geralmente é um estímulo dos TLRs (mas pode ser também vias IL-1R ou TNF) que leva à ativação de NF κ B. Este fator de transcrição aumenta a indução das pró-formas das citocinas IL-1 β e IL-18, da pró-caspase-1 e também aumenta a transcrição do próprio NLRP3; 2- o segundo sinal que ativa o NLRP3, permite sua oligomerização e todo o recrutamento das proteínas que formam a plataforma do inflamassoma. No caso do segundo sinal do inflamassoma formado por NLRP3 existe uma particularidade que diferente dos outros inflamassomas, uma vez que diversos estímulos de natureza completamente distinta são capazes de ativa-lo. Desde indicadores de estresse metabólico, como glicose extracelular elevada (54), cristais de ácido úrico (MSU) (55,56), ATP extracelular (57), até estressores ambientais como sílica (58), amianto (59) e radiação UVB (60). Além disso, diversas infecções acionam a

participação de NLRP3 como infecções bacterianas (61), virais (62), fúngicas (63) e por protozoários (64–66).

Uma vez que esses estímulos são tão diferentes estruturalmente entre si, tem-se proposto que NLRP3 não se ligue em cada um deles, mas que todos estes estímulos ativem algum mecanismo convergente e que NLRP3 seria o sensor deste mecanismo. Ou seja, de maneira geral, NLRP3 poderia ser entendido como um sensor da homeostase celular (67). Dentre os mecanismos propostos de ativação de NLRP3, os mais aceitos atualmente são: 1- o efluxo de Potássio (K^+); 2- o influxo de Cálcio (Ca^{2+}); 3- danos mitocondriais; e 4- a ruptura do lisossoma.

- 1) O efluxo de íons de K^+ é a via que primeiro surgiu como um mecanismo comum para os diversos estímulos de NLRP3, incluindo a nigericina que é um ativador clássico deste inflamassoma, o ATP e cristais de MSU (68). Alteração da concentração do íon K^+ está relacionada com alterações conformacionais do NLRP3 que permitem sua ativação (69). Estudos mais recentes têm apontado a proteína NEK7 como tendo papel importante na regulação da ativação de NLRP3 e alguns grupos já mostraram como a dissociação de NEK7-NLRP3 é dependente da concentração deste íon (70). Todavia, ainda não há consenso na literatura sobre o mecanismo de ação pelo qual NLRP3 perceberia a alteração nos níveis de K^+ e ainda é algo a ser elucidado se essa percepção aconteceria diretamente pelo receptor ou se existem outras moléculas que intermediam este processo.
- 2) A mobilização do Ca^{2+} está envolvida com diversos processos celulares onde o Ca^{2+} tem papel de segundo mensageiro (71). Grande parte dos estimuladores de NLRP3 induzem juntamente com a saída do K^+ , a mobilização rápida dos íons de Ca^{2+} . Inibidores destas mobilizações induzem a inibição do inflamassoma NLRP3 (72,73). Nesse contexto, a mobilização dos íons de Ca^{2+} poderia estar relacionada com a desestabilização da membrana mitocondrial, o que permitiria o rompimento e liberação de outros ativadores do NLRP3, tais como mtDNA e cardiopilina (73). Outro grupo observou que a mobilização de Ca^{2+} dependente do receptor CASR (*calcium-sensing receptor*) não só ativou NLRP3 como também induziu a diminuição dos níveis de AMPc (AMP cíclico), um dos reguladores negativos da ativação de NLRP3 (74). No entanto, como o Ca^{2+} está envolvido em diversas vias de sinalização celular (71) e além disso, as reservas intracelulares de Ca^{2+} estão distribuídas em diversas organelas (como lisossomos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e também mitocôndrias) (75,76), é difícil correlacionar a ativação de NLRP3 com a

mobilização do Ca²⁺ diretamente. Há a hipótese de que essa ativação aconteça de maneira indireta, decorrente dos distúrbios que a mobilização de Ca²⁺ causa no ambiente intracelular.

- 3) Assim como os modelos propostos anteriormente, a produção de ROS (*reactive oxygen species*) é observada após diversos estímulos ativadores de NLRP3 e, da mesma forma, inibidores de ROS inibem a atividade deste inflamassoma (77). Além disso, especificamente ROS advindos de danos mitocondriais, portanto mtROS já foram descritos como ativadores de NLRP3 (42,78). Além da produção de mtROS, a ruptura da organela libera seu DNA (mtDNA) que também parece ativar NLRP3 (79). De fato, Zhou e colaboradores observaram que após sua estimulação, NLRP3 está colocalizado com as mitocôndrias na região próxima ao núcleo celular (80). A localização espacial de NLRP3 está diretamente ligada à sua ativação (81) e poderia ser a ligação entre esta via de sinalização e NEK7 (82). No entanto, assim como esse mecanismo de ação parece acontecer na maioria dos ativadores de NLRP3, há estudos que sugerem que ele aconteceria de maneira secundária à ativação do inflamassoma, potencializando sua ativação, mas não sendo sua causa primária (77,83).
- 4) Sabe-se que a maneira pela qual alguns cristais ativam os inflamassomas é intermediada pela ruptura dos lisossomas (49,55,84–86). Durante este processo de ruptura, algumas proteases contidas nessas organelas são liberadas para o citosol. Um tipo de protease que é liberada e está associada com a ativação de NLRP3 são as catepsinas (84). Alguns estudos mostraram que a secreção de IL-1 β foi inibida após o uso de um inibidor farmacológico das catepsinas, o CA-074 Me (87–89). No entanto não se pode descartar o efeito da ruptura dos lisossomos sobre as alterações iônicas, como de K⁺ (68). Também já foi observado que essas proteases poderiam atuar como o sinal de *priming* do inflamassoma, uma vez que seus inibidores reduziram a transcrição da pro-IL-1 β (90).

1.2.2.2 NLRC4

O inflamassoma formado por NLRC4 também tem sua peculiaridade quando comparado aos outros inflamassomas: para se formar ele precisa de outra proteína NLR da subfamília dos NLRB, também chamados de NAIPs. A ligação direta com o ligante é feita pela molécula do NAIP, que então se liga ao NLRC4 e permite a oligomerização deste. A seguir, podem ligar a molécula adaptadora ASC, recrutar e ativar a pro-caspase-

1 e passam a clivar as citocinas IL-1 β e IL-18 (91). Como NLRC4 possui um domínio amino-terminal do tipo CARD, tem a capacidade de se ligar diretamente à caspase-1 sem a necessidade da proteína ASC. Atualmente se sabe que ao formar o complexo sem a proteína ASC, este inflamassoma induz piroptose, com baixa secreção de IL-1 β e IL-18. Por outro lado, o complexo que contém ASC tem capacidade de induzir a secreção destas citocinas e também induzir a morte piroptose (92).

A ativação melhor entendida de NAIP/NLRC4 é em resposta a estímulos bacterianos. Em camundongos, NAIP1 e NAIP2 são os ligantes de proteínas do complexo secretório do tipo 3 e 4 (respectivamente)(93) enquanto que NAIP5 e NAIP6 reconhecem flagelina (94). Em humanos só há um gene que codifica o NAIP e essa mesma proteína é responsável por reconhecer e ativar o inflamassoma em resposta à flagelina e ao complexo secretório (95,96). A ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4 já foi descrita como sendo importante mecanismo de defesa em resposta a infecções bacterianas, como bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Citrobacter* e *Legionella* (97,98). Em contraste, sua ativação pode ser prejudicial em resposta a *Helicobacter pylori*, onde a inflamação crônica pode levar ao desenvolvimento de úlceras e até mesmo adenocarcinomas (99).

Além da ativação em resposta a infecções bacterianas, é crescente na literatura os casos de ativação de NLRC4 em outros contextos não bacterianos. Desde sua participação em outras infecções como a do fungo *Candida albicans* (100), até sua ativação em contextos estéreis como em progressões tumorais (101–103), na hiperalgesia aguda (104) e na síndrome da ativação de macrófagos (*macrophage activation syndrome*; MAS), onde mutações de ganho de função no gene do NLRC4 resultam em inflamações crônicas, em muitos casos correlacionado com doenças auto-imunes (105,106).

Por fim, como consequência da ativação dos inflamassomas, além das funções convencionais relacionadas à morte celular piroptose e à secreção de IL-1 β e IL-18, existem outras funções chamadas de não convencionais (107). Essas funções são menos elucidadas com relação às vias moleculares, mas seus efeitos são observados e descritos em diversos estudos. Um desses efeitos é a “tempestade de eicosanoides”, que são mediadores inflamatórios de origem lipídica (como os leucotrienos e prostaglandinas), descrita por Moltke e colaboradores. Essa tempestade acontece de maneira dependente de caspase-1, após estímulos ativadores dos

inflamassomas como flagelina e a toxina letal do anthrax (108). Outra atividade celular que também é modulada pela atividade dos inflamassomas tem a ver com o metabolismo. Nas últimas décadas o assunto de imunometabolismo tem ganhado relevância nas análises sobre a magnitude das respostas inflamatórias. Nesse contexto, os inflamassomas já foram descritos tendo importante papel de modular a via da glicólise através de vias dependentes de IL-1 β e também através da participação da caspase-1 que pode clivar diversos substratos da via glicolítica (109). Além de modular o metabolismo de carboidratos, os inflamassomas também podem estar envolvidos com o metabolismo de lipídios: a caspase-1 ativa já foi observada sendo importante na síntese de proteínas de ligação ao elemento regulador de esteroide (*sterol regulatory element-binding proteins*; SREBPs) (110) bem como na regulação da absorção de triglicerídeos no intestino (111). Ainda, uma das funções não convencionais desencadeadas pela atividade dos inflamassomas, é a produção de óxido nítrico (NO). Nosso grupo descreveu a dependência de caspase-1 para a regulação da transcrição de NOS2 (*nitric oxide 2*) em resposta à flagelina (112,113). Nesse contexto, a caspase-1 é responsável por clivar PARP-1, uma proteína reguladora da transcrição, liberando a cromatina e permitindo a transcrição do gene NOS2. A secreção de NO é uma importante resposta para a resistência do hospedeiro nas infecções por *S. typhimurium* e *L. pneumophila*. O mecanismo de secreção de NO também é de suma importância para a resistência à infecção por *T. cruzi* (114) e também foi descrito por nosso grupo que o NO dependente de NLRP3 foi importante para controlar esta infecção em macrófagos (65) e micróglia (115).

1.2.3. Necroptose, RIPK1 e RIPK3

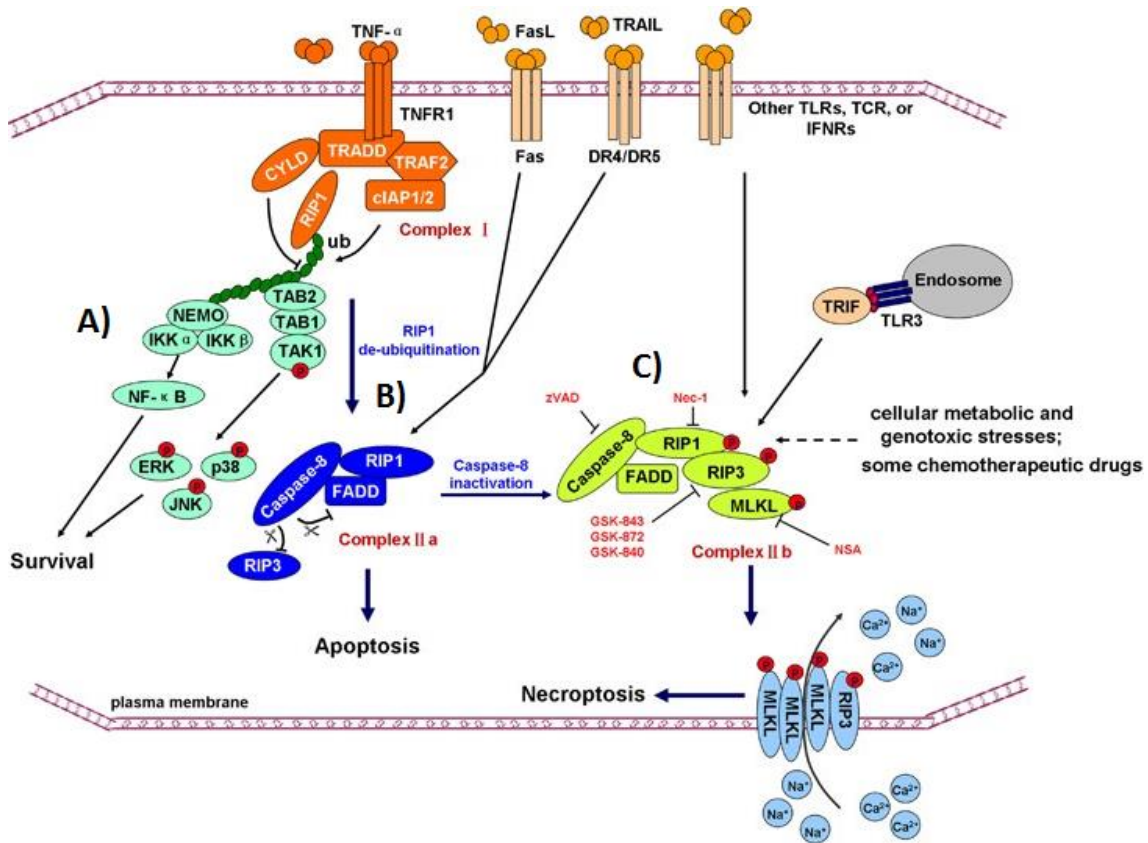
Outro tipo de morte celular muito importante para o sistema imune inato é a necroptose. Juntamente com a piroptose e a apoptose, elas compõem o grupo de morte celular programada (*programmed cell death*; PCD). Atualmente, já se entende que mesmo mortes celulares cujo fenômeno morfológico é o oposto ao observado na apoptose (que é silenciosa, sem rompimento da membrana e sem secreção de citocinas), acontece de maneira altamente orquestrada por mecanismos celulares específicos. Em 2005, um grupo de pesquisadores conseguiu demonstrar que a necrose observada após a estimulação por TNF ou FasL na presença de inibidores de caspases era mediada por uma via bioquímica controlada por uma quinase denominada RIPK1 (*receptor-interacting serine-threonine kinase 1*). A este tipo de morte deram o nome de necroptose. Este tipo de morte celular, assim como a piroptose, causa aumento brusco do volume celular, lise da membrana plasmática, destruição de organelas e liberação do conteúdo intracelular (116). Apesar das semelhanças morfológicas com a piroptose (117), a

necroptose não depende da ativação de caspases, na verdade a supressão de caspases potencializa a indução da necroptose, e é mediada pelas quinases RIPK1 e RIPK3 e pela pseudoquinase MLKL (116,118).

Diferentes moléculas foram descritas como indutores de necroptose, tais como os ligantes de morte TNF (*tumor necrosis factor*), FASL (*Fas Ligand*) e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), moléculas estas também descritas como iniciadoras da via de apoptose (119). Além destas, mais recentemente sabe-se que também moléculas citosólicas como RIG-I e STING são capazes de induzir esta morte celular, uma vez que são capazes de estimular IFN-I e TNF- α (120,121). Esta indução acontece da seguinte maneira: após a ativação do receptor, por exemplo o TNFR1 pelo TNF, ocorre a formação de um complexo proteico, chamado complexo I. Esse complexo inicia a partir do recrutamento de TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain*) que se liga ao domínio de morte (DD) (*Death Domain*) do TNFR. TRADD, por sua vez, recruta RIPK1, cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 1*), cIAP2, TRAF2 (*TNF receptor associated fator 2*) e TRAF5. Este complexo I então induz a ativação da via canônica de NF- κ B (*nuclear fator kappa B*) que leva à transcrição de genes relacionados à sobrevivência e proliferação, incluindo cIAPs e também cFLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*), molécula inibidora da apoptose (122). A maneira que este complexo é formado permite que RIPK1 esteja disponível para ser ubiquitinado pelas cIAPs. Essa ubiquitinação é importante para manter a estabilidade do complexo I e RIPK1 é poliubiquitinado. Quando a intensidade ou a duração da estimulação do receptor TNFR1 é aumentada há diminuição desta ubiquitinação feita pelas cIAPs e/ou a ação direta de proteínas desubiquitinases e então este complexo se torna instável e passa a formar o complexo II. O complexo II é formado pelas moléculas de RIPK1 e TRADD que se desassociaram do primeiro complexo e agora se ligam a FADD (*Fas-associated death domain*) no citosol e que por sua vez recruta a pró-caspase-8. Esta caspase passa a ser ativada e, além de inativar RIPK1 e RIPK3 (123,124), inicia uma cascata de ativação de caspases, que culmina na morte por apoptose. Porém, na ausência ou inibição de FADD ou caspase-8, um complexo II alternativo é formado (complexo IIb). Neste contexto, RIPK1 se auto-fosforila e recruta uma segunda quinase, chamada RIPK3 (125,126) através de interações homotípicas entre os respectivos domínios RHIM. Uma vez recrutado, RIPK3 se auto-fosforila de modo a recrutar e fosforilar outra molécula, a pseudoquinase MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*) (127,128). Depois de ativada, MLKL se oligomeriza e transloca para a membrana plasmática onde interage com fosfatidilinositol, especialmente PIP3 (128–130). Apesar de não ter atividade de quinase intrínseca, esta proteína é essencial para a execução do sinal necroptótico, pois é responsável

pela desestabilização e ruptura da membrana celular através de um mecanismo ainda não elucidado completamente (131,132)(Figura 5).

Figura 5- Vias iniciadoras da necroptose



Após sinalização pelos receptores três vias distintas podem ser ativadas dependendo da disponibilidade de interações intracelulares e das modificações pós-traducionais (como ubiquitinação) de certas moléculas. Temos: **A)** sinalização pró-sobrevivência celular, via NF-κB; **B)** sinalização pró-apoptótica e **C)** sinalização para a morte necroptose. Fonte: adaptado de Su e colaboradores, 2016. (133)

Estas mortes não-apoptóticas, como a necroptose e a piroptose, expõem os microorganismos invasores ao meio extracelular, uma vez que causam ruptura da célula e eliminam o nicho de replicação do microorganismo, fazendo que o mesmo fique sem substratos de sobrevivência e de multiplicação. Além disso, ainda liberam no meio extracelular fatores com alto potencial inflamatório como citocinas e DAMPs. Neste sentido, diversos estudos têm investigado a importância da morte celular para o controle de infecções. Por exemplo, Young e colaboradores observaram que camundongos deficientes para RIPK3 não controlam eficientemente a infecção por vírus da Vaccinia (125). Talvez uma das maiores evidências de que a necroptose é importante no controle de infecções vem da identificação de moléculas

expressas pelos patógenos que são inibidoras de diferentes pontos desta via. Por exemplo, vírus da família herpesvirus possuem moléculas que interagem com o domínio RHIM de RIPK3, impedindo que esta proteína interaja com MLKL e assim impedindo a necroptose. Vírus mutados que perdem a capacidade de interagir com RIPK3 causam uma virulência muito atenuada nos animais selvagens, que não é observada nos animais deficientes em RIPK3 (134). Resultado similar foi visto na infecção com o vírus herpes simples (HSV-1), que também expressa proteínas que se ligam diretamente à RIPK3 e induzem sua ativação (135). Animais deficientes em RIPK3 apresentam elevada sensibilidade ao HSV-1, reforçando a hipótese de que RIPK3 possui um papel central no controle desta infecção. Notavelmente, também é através destas interações entre as formas homólogas de proteínas de vírus-hospedeiro que a indução de necroptose pode ter efeito deletério ao hospedeiro, levando à morte daquelas células responsáveis por controlar a infecção. Isto pode ser exemplificado pelo vírus HIV, que ao infectar o linfócito TCD4⁺, leva esta célula à morte por necroptose através do aumento da sensibilidade ao TNF e da diminuição da atividade da caspase-8 (136).

Ainda, a necroptose também é descrita tendo envolvimento nos casos de infecções bacterianas, mostrando-se benéfica para o hospedeiro, como no caso da infecção por *Yersinia*, onde animais deficientes em RIPK3 e FADD ou caspase-8, mostraram-se bem mais suscetíveis a replicação desta bactéria (137,138). Já a bactéria *E. coli* possui um mecanismo efetor de patogenicidade que, ao infectar a célula, consegue modificar resíduos de arginina do domínio de morte das proteínas FADD e RIPK3, impedindo assim que a célula morra por apoptose ou por necroptose (139). Alguns outros estudos com bactérias, como *Salmonella typhimurium* (140), *Clostridium perferingees* (141) e *Mycobacterium tuberculosis* (142) indicam que estas são capazes de induzir necroptose *in vitro*.

1.2.4. Inflamassomas e RIPKs na infecção por *T. cruzi*

A resposta desencadeada pela infecção por *T. cruzi* conta tanto com componentes da imunidade inata como da imunidade adaptativa. Ambas as linhas precisam estar muito bem ajustadas para que sejam efetivas. Da parte da imunidade inata estudos prévios mostraram o envolvimento de TLR2 (143,144), TLR4 (145,146), TLR7 (147), TLR9 (144) e MyD88 (148) no controle do *T. cruzi*, sendo que os animais deficientes para estas moléculas se mostraram suscetíveis a infecção. Além dos TLRs, outro receptor da imunidade inata que já foi descrito como importante em resposta ao *T. cruzi*, foi NOD1. Este receptor tem sua ativação similar aos TLRs, ativando NFκB, mas foi visto que apesar da sua ausência não alterar a produção de

citocinas pró-inflamatórias em resposta ao *T. cruzi*, as células tiveram pior controle desta infecção (149). Neste contexto, as moléculas do parasita que ativam estes receptores são: glicosilfosfatidilinositol (GPIs), glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) e material genético parasitário.

O reconhecimento do *T. cruzi* pelos inflamassomas ainda não é um mecanismo totalmente elucidado. Nosso grupo, paralelamente ao grupo do Dr. João Santana, descreveu a participação do inflamassoma NLRP3 e da caspase-1 no controle da infecção do *T. cruzi* em macrófagos peritoneais (65,150). Nestes trabalhos foi mostrado que o tratamento com inibidor da catepsina-B, o Ca-074Me, inibiu o efeito protetor da ativação dos inflamassomas, sugerindo que o mecanismo pelo qual o *T. cruzi* é capaz de ativar esta plataforma, provavelmente tem relação com a ruptura do lisossoma. Além disso, neste trabalho nosso grupo mostrou que a secreção de NO dependente da ativação de NLRP3 foi essencial para o controle da replicação destes parasitas em macrófagos. Mais recentemente, nosso grupo também descreveu a importância desse mecanismo de secreção de NO dependente de NLRP3 para o controle da infecção em micróglia (115). Um estudo em humanos observou que mutações nos genes de proteínas NLR e caspase-1 estavam associados a casos de cardiopatias desencadeada pela infecção com *T. cruzi* (151) e mais recentemente outro grupo mostrou em experimentos *ex-vivo* que pacientes com cardiopatias têm maior expressão de IL-1 β , NLRP3 e caspase-1 (152).

Já o papel da necroptose e das suas proteínas na infecção por outros organismos como fungos e protozoários ainda não é amplamente explorado. O grupo da Dra. Katherine Fitzgerald mostrou o papel da caspase-8 no controle da infecção fúngica por *Candida albicans*, mas também reportaram que a ação de caspase-8 estaria associada à ativação da via dos inflamassomas e a secreção de IL-1 β , mostrando que em muitos casos essas vias de morte interagem e se modulam dependendo do seu contexto (153). Da mesma forma, o grupo do Dr. Igor Brodsky observou que animais duplo-nocautes para RIPK3 e Caspase-8 (DKO) sucumbiram à infecção por *Toxoplasma gondii*, porém os animais simples-nocautes para RIPK3 sobreviviam como os selvagens. Portanto, o efeito observado foi independente de RIPK3 e dependente de caspase-8, sugerindo outros papéis de atividade além do seu envolvimento na maquinaria de morte (apoptótica e necroptótica) (154). Por fim, análises sobre o papel da necroptose, RIPK1 e RIPK3 mostraram que essas moléculas participam do controle da infecção por *Leishmania* (155,156) e que casos graves da forma cutânea desta infecção tinham diminuição da transcrição dos genes da necroptose, sugerindo que a baixa expressão desses genes pode estar relacionada com a infecção não controlada naquele local sendo um possível mecanismo induzido pelo parasita para evadir a resposta imune (157). Até o momento atual não se tem estudos sobre RIPK1, RIPK3 ou a necroptose no contexto da infecção por *T. cruzi*.

1.3. SNC, inflamassomas e RIPKs

1.3.1. Células da glia

Durante muitos anos pensou-se que o sistema nervoso do ser humano era composto por cem bilhões de neurônios e que para cada neurônio tinha-se 10 células da glia com a função de dar suporte e proteção, mecânica apenas, a estes neurônios. Atualmente, já se sabe que nem a quantidade nem a função designada para estas células estavam corretas. Estudos mais recentes mostram que a proporção neurônio/células gliais é de 1:1 (158) e as funções dessas células gliais, além de bastante diversas, são também bastante dinâmicas. No SNC temos 3 tipos celulares compondo o grupo de células da glia: oligodendrócitos (responsáveis pela formação da bainha de mielina que envolvem neurônios), astrócitos (células abundantes com funções diversas para a fisiologia do SNC) e micróglia (representantes do Sistema Mononuclear Fagocitário) (159). De maneira geral, todas estas células contribuem para a homeostase do tecido nervoso, sendo que em muitos casos de doenças neuroinflamatórias, vê-se o papel de cada uma destas células no desequilíbrio da homeostase do tecido relacionado com a doença.

A micróglia faz parte das células residentes do sistema imune no SNC. Sabe-se que a origem embriológica destas células está relacionada com macrófagos do saco vitelínico que migram nos primeiros dias do feto e se distribuem homogeneamente no tecido nervoso e se diferenciam fenotipicamente nas micróglia (160). Em ratos e camundongos têm sido caracterizadas as sub-populações de micróglia. A distribuição dessas populações também tem ampla relação com sua capacidade de se proliferar, sendo a região hipotalâmica, cortical e cerebelar com taxas menores de proliferação do que a região do hipocampo (161,162). Sua função inclui fagocitose do parênquima nervoso, englobando células apoptóticas e possíveis invasores e participação da poda sináptica dos neurônios, formatando as ligações nervosas (163–165). Morfologicamente essas células no estado inativo possuem longos processos que, após alguma lesão do tecido nervoso, ela concentra para a região lesionada e ativa vias inflamatórias a fim de conter a lesão (166,167). Elas podem induzir também as outras células gliais a secretar citocinas inflamatórias e assim promover um ambiente inflamatório que, se sustentado por muito tempo, pode resultar em doenças neurodegenerativas ou neuropsiquiátricas (168).

Os astrócitos representam de 20 a 40% do total das células gliais, sendo de 2 a 4 vezes mais abundantes que as micróglia (158). Estas células contribuem para a manutenção do tecido nervoso de diversas maneiras: controlam o fluxo de íons e água disponível no meio extracelular (169), fornecem metabólitos importantes para os neurônios obterem energia (169,170), regulam a passagem de substâncias advindas da circulação através da formação da barreira

hematoencefálica (*Blood Brain Barrier; BBB*) (171) e também contribuem para a fluidez do líquido cefalorraquidiano (*Cerebral Spinal Fluid; CSF*) e para a formação/plasticidade das sinapses neurais (172). Além disso, essas células também são imunocompetentes e participam na resposta de diversos estímulos de infecção ou inflamação no SNC, secretando citocinas, quimiocinas e também ativando a resposta imune adaptativa (173). Justamente por desempenharem tantas tarefas no SNC e também por estarem presentes no órgão inteiro, existem diversos contextos em que a ativação em excesso ou em falta, ou deficiências no transporte de glutamato entre outras mutações, levam ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas ou neuropsiquiátricas (174,175)

1.3.2. Inflamassomas e RIPKs no SNC

Devido sua função imunológica conhecida, há muitos relatos da ativação dos inflamassomas nas células microgliais em diversos contextos. E, assim como em qualquer tecido, o engajamento dos inflamassomas no SNC pode estar relacionado com efeitos positivos ou efeitos negativos decorrentes da sua ativação. Alguns casos de infecção como pela bactéria *Staphylococcus aureus* a resposta desencadeada pelo inflamassoma AIM2 é essencial para controlar esta infecção. A ineficácia do controle da replicação desta bactéria pode causar lesões no tecido nervoso, podendo levar a abscessos cerebrais (176). Também foi observado a participação essencial do inflamassoma NLRC4 em resposta à infecção por *Legionella pneumophila*, uma bactéria causadora da pneumonia e que em casos graves tem diversos sintomas neurológicos como quadro de confusões e epilepsias (177). Por outro lado, a resposta do inflamassoma pode ser deletéria em outros contextos como por exemplo na doença de Alzheimer, onde a presença constante dos cristais de β -amilóide ativa cronicamente os inflamassomas na micróglia e está relacionada com o agravamento destes casos (178,179).

Os astrócitos também podem responder a estímulos ativadores dos inflamassomas tanto em infecções como em contextos estéreis (180). Samartino e colaboradores mostraram o astrócito respondendo a bactéria *Brucella abortus*, além de secretar citocinas pró-inflamatórias, e aumentar a expressão de GFAP, um marcador celular de “astrócito reativo”. Após esta ativação, o astrócito sofre apoptose, participando do controle da replicação desta bactéria (181). Outro grupo também estudando a infecção por *Brucella*, viu que o controle dependia da ação conjunta de NLRP3 e AIM2 (182). Apesar de ser capaz de responder a estímulos de diversos inflamassomas (AIM2, NLRP3, NLRP2, NLRC4), o astrócito parece expressar maiores níveis de NLRC4, como visto após estímulo com a lipoproteína LPC que também é ativadora de NLRP3

(183). Neste estudo Freeman mostra que a resposta ao LPC necessita tanto de NLRP3 quanto NLRC4. Ainda, a expressão de NLRC4 se mostrou maior nos astrócitos do que nas micróglia (183).

A participação de RIPK1 na isquemia seguida do acidente vascular cerebral (AVC) foi o primeiro relato da necroptose nas células do SNC, bem como também o primeiro relato do efeito do inibidor farmacológico de RIPK1, a necrostatina-1 (Nec-1) (184). Atualmente existem alguns estudos que avaliam o papel da necroptose, RIPK1 e RIPK3 em doenças neurodegenerativas e infecções do SNC (185,186). No modelo de isquemia e reperfusão, a necrose de regiões cerebrais advém da necroptose em resposta a TNF, de maneira dependente de RIPK1 (184). No entanto, apesar da morte celular ser dependente de RIPK1, outros grupos têm sugerido o papel de RIPK1, induzindo morte celular (astrócitos e neurônios) da região que sofreu isquemia, mas através de outras vias moleculares que não RIPK3 e MLKL. Nesse contexto, um estudo sobre a ativação especificamente dos astrócitos, mostrou que a ativação de RIPK1 era dependente de uma proteína amplamente expressa nos astrócitos, associado a proliferação e diferenciação, NDRG2 (187). Outro grupo mostrou a participação de RIPK1 na ativação da via da autofagia, tanto em astrócitos como neurônios e a inibição desse mecanismo diminuiu a área do tecido nervoso que sofreu necrose (188).

Por fim, RIPK1 e RIPK3 parecem agir também de maneira independente da necroptose (189). Além disso, é crescente na literatura a observação que as vias de PCD muitas vezes convergem para certas moléculas comuns. Há até mesmo uma proposta de PANoptosis (*pyroptosis, apoptosis, necroptosis*) que sugere que os mecanismos de PCD convergem e se somam. As moléculas que regulam cada um dos processos de morte celular inflamatória podem, inclusive, atuar de maneira redundante (190).

Diante do exposto, fica clara a complexidade das interações entre vias citosólicas ativadas em resposta a infecções, as quais somam-se a mecanismos desenvolvidos pelos próprios patógenos para evadir o controle imune. No presente trabalho, pretendemos explorar o papel dessas vias na ativação de mecanismos efetores desenvolvidos por micróglia e astrócitos em resposta ao *T. cruzi*.

2. Justificativa

Uma vez que: 1) RIPK1 e RIPK3 na via da necroptose e NLRC4 na via dos inflamassomas são importantes moléculas para controle de infecções ocasionadas por diversos patógenos e são pouco exploradas no contexto do controle do *T. cruzi*; 2) Além de induzir necroptose, existem evidências de que RIPK3 e RIPK1 tem capacidade de modular algumas respostas mediadas pelos inflamassomas, sugerindo uma relação entre as duas vias de sinalização; 3) O papel dessas vias em células do SNC ainda necessita ser melhor elucidado; o presente estudo visa entender o papel de NLRC4, RIPK1 e RIPK3 no controle da infecção por *T. cruzi* bem como avaliar a possível interação entre a via dos inflamassomas e dos RIPKs durante esta infecção em micróglias e astrócitos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais e parasitas

Camundongos C57BL/6 wild type (WT), RIPK3^{-/-} e NLRC4^{-/-} mantidos em condições “*Specific Pathogen Free*”, foram fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais) da Universidade Federal de São Paulo. Os procedimentos realizados nos animais estão de acordo com os manuais do CONCEA e foram submetidos à aprovação da CEUA/UNIFESP (n°CEUA: 2967120117) e do CEUA/Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (n° do protocolo3/2017). Tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y foram obtidos de infecções *in vivo* em animais Balb/C e passados para infecções *in vitro* em cultura de células epiteliais LLCM/K2 até a quarta passagem. Então foram congelados em solução 90% soro fetal bovino (SFB) e 10% DMSO em ultra freezer a -70°C até que fossem usados nos experimentos. No momento do experimento os parasitas foram descongelados, centrifugados e contados e foram diluídos em meio de cultura de acordo com a quantidade necessária e volume necessário para cada experimento.

3.2. Obtenção de células gliais

O método de extração celular utilizado foi o de Brewer e Torricelli (191), com pequenas modificações: Foram utilizados animais com até 3 dias pós-natal. Para a extração das células foram utilizados meio Hanks com 10% SFB e 1% penicilina/streptomina e Hanks sem soro (25ml de cada para cada animal). Os animais foram anestesiados por inalação do anestésico Isoflurano (Cristália) e então foram eutanasiados por decapitação rapidamente, tendo em seguida, o cérebro removido. Os córtex foram colocados em uma placa de petri (2mL) contendo meio Hanks com SFB. O tecido cerebral foi cortado em pedaços pequenos e transferidos para tubos Falcon 15mL. Seguidas lavagens foram realizadas (3 vezes para cada solução), adicionando-se 3mL da solução em cada tubo e após o material decantar a solução foi descartada, onde primeiramente usando-se Hanks com SFB seguido de Hanks sem soro. Adicionou-se tripsina e então levou-se para banho maria a 37° C submetendo a uma gentil agitação manual a cada 5 min até que atingisse 25 min totais. Em seguida repetiu-se o processo de lavagens citado anteriormente, sendo repetido por 3 vezes com a solução de Hanks com soro e depois 3 vezes com a solução Hanks sem soro. Adicionou-se 3ml de solução de Hanks sem soro submetido a sucessivas passagens através de pipetas Pasteur polidas de diâmetros decrescentes (três pipetas). As células foram centrifugadas (1500 rpm por 5 min) e ressuspensas em 4 mL de Hanks com soro, e colocadas em uma garrafa de cultura média (Costar 75cm²). Após 30 min acrescentou-se 10 mL de meio DMEM/F12 10% SFB. O meio foi trocado por completo 2 dias depois e a cada 2 dias metade do volume do meio era retirado e novo volume era adicionado até que chegasse ao final de 14 dias. No 14° dia a cultura é formada por astrócitos aderidos na

garrafa em confluência de aproximadamente 100% e micróglia aderidas nos astrócitos em confluência aproximadamente de 50%. Para separar as populações celulares, a cultura foi submetida a agitação circular em *shaker* orbital a 240 rpm, 37°C, overnight. Após esse procedimento, a micróglia desprendida localiza-se no sobrenadante e os astrócitos encontram-se aderidos. Retirou-se o sobrenadante (micróglia) e tripsinou-se a garrafa para retirada dos astrócitos. Em seguida, as populações celulares separadas (micróglia e astrócitos) foram centrifugados a 1500 rpm por 4 min. O pellet de ambos foram ressuspensos em DMEM/F12 10% SFB para contagem das células em câmara de Neubauer. Em seguida as células foram plaqueadas conforme densidade planejada para cada experimento.

3.3. Infecção das células gliais

Micróglia e astrócitos de animais C57BL/6 wild type (WT), RIPK3^{-/-} e NLRC4^{-/-} foram plaqueadas em placas de 96 wells (Costar) na concentração de 3×10^4 células por poço. As células foram mantidas por 48h em meio de cultura (37°C em atmosfera com 5% de CO₂) para aderência. Então, as células foram infectadas com MOI 5 (5 tripomastigotas para cada célula), permaneceram em co-cultura durante 2h. Após isto, as culturas tiveram os meios retirados e foram lavadas com DMEM/F12 10% SFB, para remoção total dos parasitas não aderidos às células. Finalmente, as células ficaram 2h, 48h ou 96h em cultura (conforme tempo de infecção). Após este período foram tratadas com metanol, para serem fixadas e em seguida foram lavadas com e coradas para análise de imunofluorescência.

3.4. Imunofluorescência

Para avaliar a taxa de infecção, as células fixadas com metanol foram incubadas com o anticorpo anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Alexa Fluor® 647 – Abcam) na concentração de 1:500 diluído em PBS, o qual marca a proteína de citoesqueleto dos astrócitos e com o corante DAPI (1:1000), a fim de marcar o DNA dos dois tipos celulares (astrócito e micróglia) bem como do parasita. As placas foram transferidas para o microscópio automático IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare) onde as imagens foram adquiridas. A contagem de parasitas e células hospedeiras destas imagens foi realizada manualmente pelo software Image-J, e a apresentação dos dados foi feita pela proporção de número de parasitas por 100 células totais (taxa de infecção). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5. Dosagem de IL-1 β , NO, lactato e glutamato.

Micróglia e astrócitos de animais C57BL/6 WT, RIPK3^{-/-} e NLRc4^{-/-} foram plaqueadas em placas de 48 wells (Costar) na concentração de 3×10^5 células por poço e infectadas como descrito anteriormente. A produção de IL-1 β nos sobrenadantes das culturas foi determinada por ELISA sandwich de captura utilizando kits comerciais provenientes da BD Bioscience,

utilizando-se 100µL do sobrenadante destas culturas, e seguindo as instruções do fabricante. A produção de NO foi avaliada através do método de Griess, utilizando 50µl do sobrenadante de cultura e incubando-os com 50 µl do reagente de Griess por 5 min em temperatura ambiente. A concentração de NO foi determinada pela leitura da densidade óptica a 540nm em referência a uma solução padrão de NaNO₂. As dosagens foram realizadas em triplicatas. A produção de lactato foi dosada utilizando-se 2µL de uma diluição 1:10 do sobrenadante destas culturas. A dosagem utilizou-se do kit enzimático para Lactato (Labtest) seguindo as recomendações do fabricante. Por último, a dosagem do glutamato utilizou-se 50 µL do sobrenadante das culturas foi determinada pelo kit comercial Glutamate-Assay Kit (Sigma/Merck) seguindo todas as recomendações do fabricante.

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do teste two-way Anova e pós teste Tukey, quando comparados mais de um grupo e teste T-student para apenas um grupo. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) e $p < 0,001$ (***)).

4. Resultados

4.1. Micróglia

4.1.1. NLRC4 está envolvido na resposta da micróglia à infecção pelo *T. cruzi*

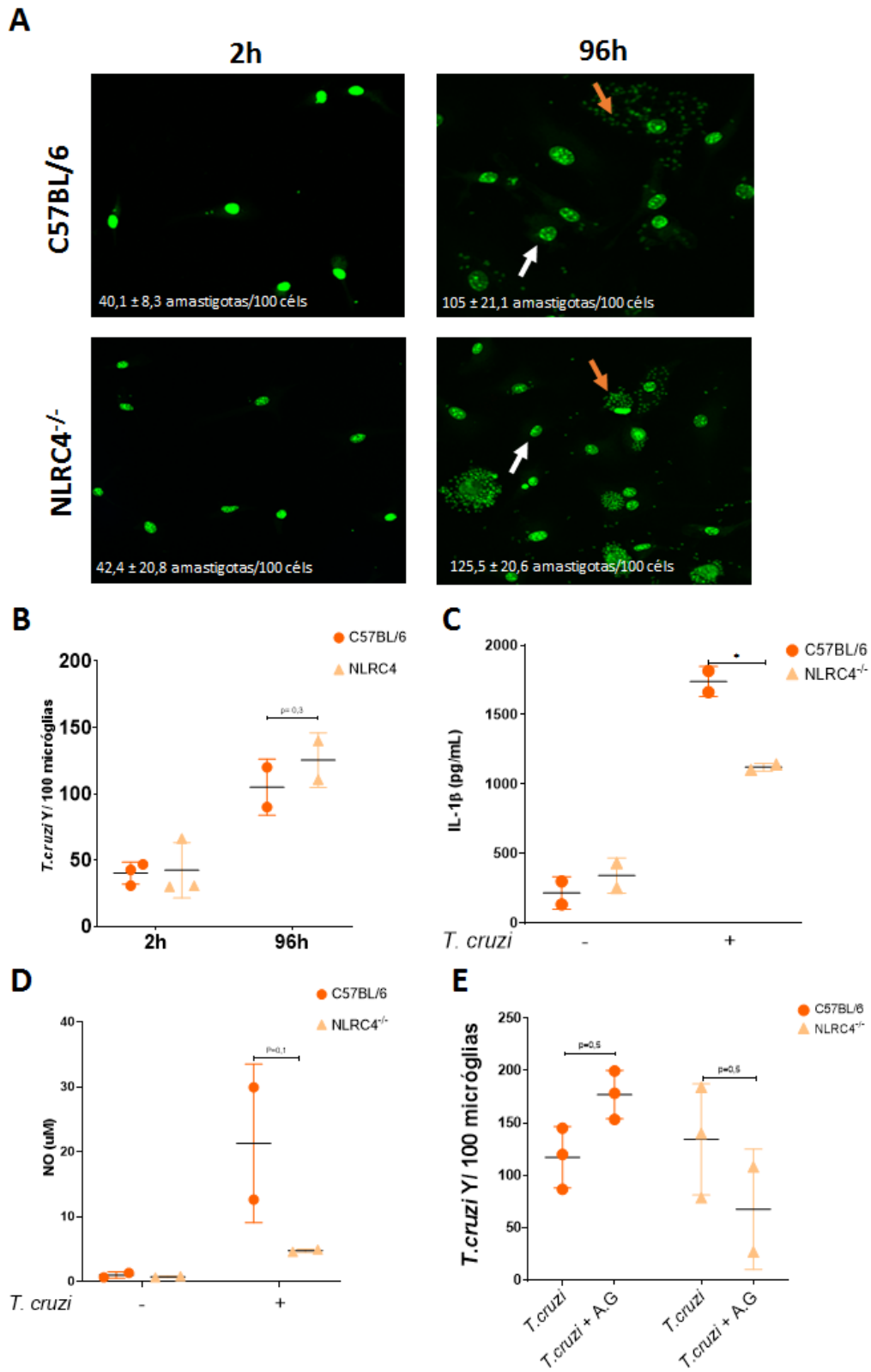
Anteriormente, nosso grupo mostrou a importância do inflamassoma NLRP3 para o controle da replicação do *T. cruzi* em macrófagos (65). Interessante, mais recentemente, demonstramos que a presença de NLRP3 também foi importante para o controle da replicação deste parasita na micróglia (115). Além do NLRP3, outro inflamassoma amplamente estudado em contextos infecciosos é o formado pelo receptor NLRC4. Apesar de ser majoritariamente descrito como sensor de infecções bacterianas, trabalhos recentes têm mostrado sua participação em outros contextos não bacterianos. Nosso grupo tem investigado a participação de NLRC4 no controle de infecções por protozoários em macrófagos (dados não publicados). Uma vez que NLRC4 parece estar altamente expresso no SNC (183,192,193), iniciamos o presente estudo investigando o papel desta molécula nas células gliais.

Utilizando micróglia primárias extraídas de animais nocaute para NLRC4 (NLRC4^{-/-}) e selvagens (WT) e infectadas com *T. cruzi* cepa Y (5:1) (conforme descrito anteriormente), avaliamos o papel de NLRC4 no controle da replicação do parasita intracelular. É possível observar que a micróglia NLRC4^{-/-} possui uma tendência em ter maior carga de parasitas intracelulares, no tempo mais tardio da infecção (96h) quando comparado às células WT (Figura 6A-B). Ainda, observou-se que a célula NLRC4^{-/-} apresentou redução significativa na secreção de IL-1 β , sugerindo que o inflamassoma NLRC4 é necessário para a resposta da micróglia à infecção por *T. cruzi* (Figura 6C). No entanto, é interessante notar que a célula NLRC4^{-/-} não interrompe totalmente sua secreção de IL-1 β , confirmando que há a participação de outro inflamassoma, como o formado por NLRP3, em resposta a este parasita.

Sabendo-se que a molécula tripanocida NO é muito importante para o controle da replicação do *T. cruzi* (114) e também que o inflamassoma NLRP3 participa da secreção dessa molécula em macrófagos e micróglia infectados (65,115) dosamos a produção de NO na ausência de NLRC4. Vimos que a micróglia NLRC4^{-/-} tem tendência a secretar menos NO em comparação com a célula WT (Figura 6D). A secreção de NO parece estar relacionada a maior permissividade à replicação do parasita, uma vez que o tratamento com um inibidor farmacológico da iNOS, a Aminoguanidina (AG) modulou de maneira distinta a capacidade tripanocida das micróglia WT e NLRC4^{-/-} (Figura 6E). Ainda que sem significância estatística, foi possível observar que o tratamento induziu ao aumento da carga parasitária nas micróglia WT mas não nas células NLRC4^{-/-}. Esse dado sugere que na célula ausente de NLRC4 a inibição por AG tenha menor impacto no controle da infecção, uma vez que esta célula secreta menos NO

em resposta ao parasita. Dessa forma, os dados mostram que NLRC4 está envolvido na resposta à infecção por *T. cruzi* em micróglia.

Figura 6 - NLRC4 está envolvido na resposta da micróglia à infecção pelo *T. cruzi*



Micróglias primárias extraídas do encéfalo de camundongos C57BL/6 e *NLR4^{-/-}* recém-nascidos foram primadas com LPS (500ng/mL) por 2h. Em seguida foram infectadas com *T. cruzi* Y (5:1) por 2h ou 96h, quando tiveram seus sobrenadantes coletados e foram fixadas com metanol. **(A)**- Células fixadas marcadas com anti-GFAP (vermelho) e coradas com DAPI (verde), onde os núcleos das células e os amastigotas foram diferenciados por tamanho e contados. Seta laranja - ninho contendo amastigotas, seta branca - núcleo da célula. Micrografias representam aumento óptico de 200x. **(B)**- Gráfico representativo das contagens de amastigotas por 100 células, onde foram contados pelo menos 10 campos de cada triplicata experimental. Do sobrenadante coletado foi realizada a dosagem de **(C)**- IL-1 β por ELISA e **(D)**- a produção de NO, por Griess. As barras representam a média \pm SD de triplicatas experimentais (*-p<0,05) de um experimento representativo que foi repetido ao menos três vezes.

4.1.2. RIPK3 participa do controle da infecção em micróglias por um mecanismo não relacionado à secreção de NO

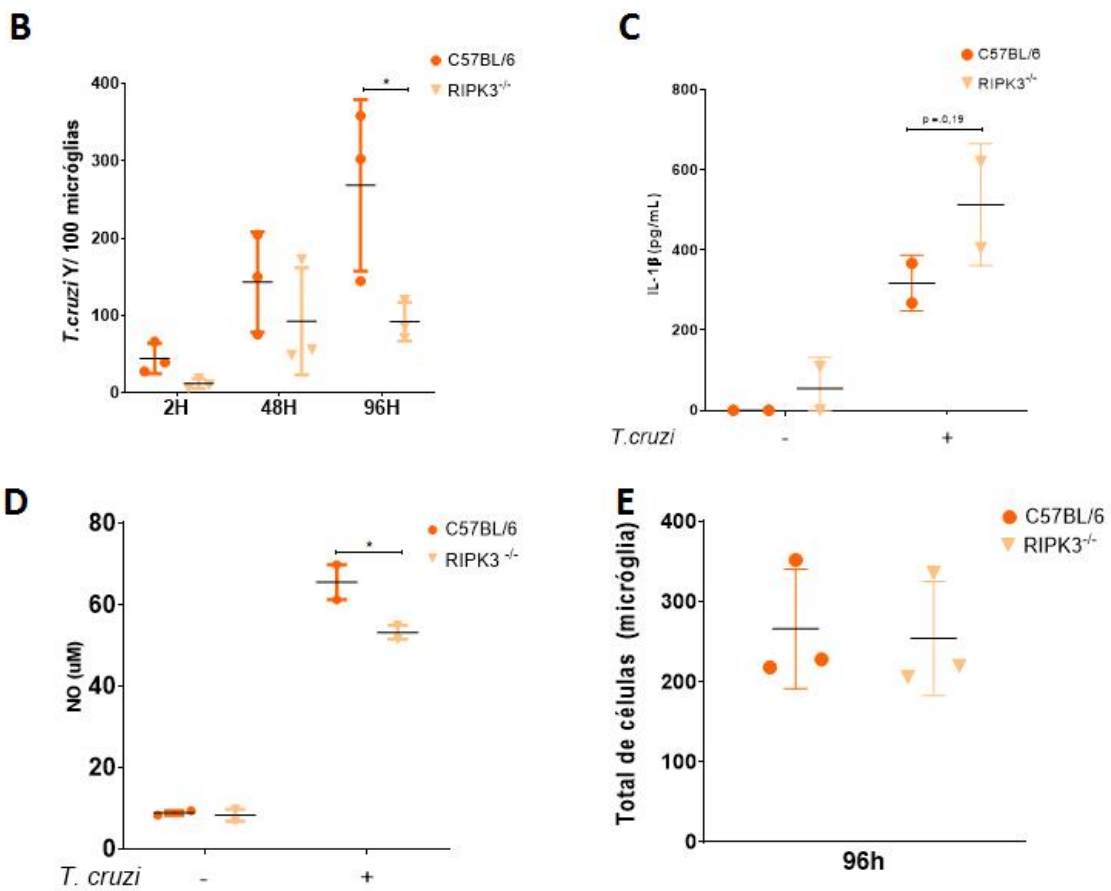
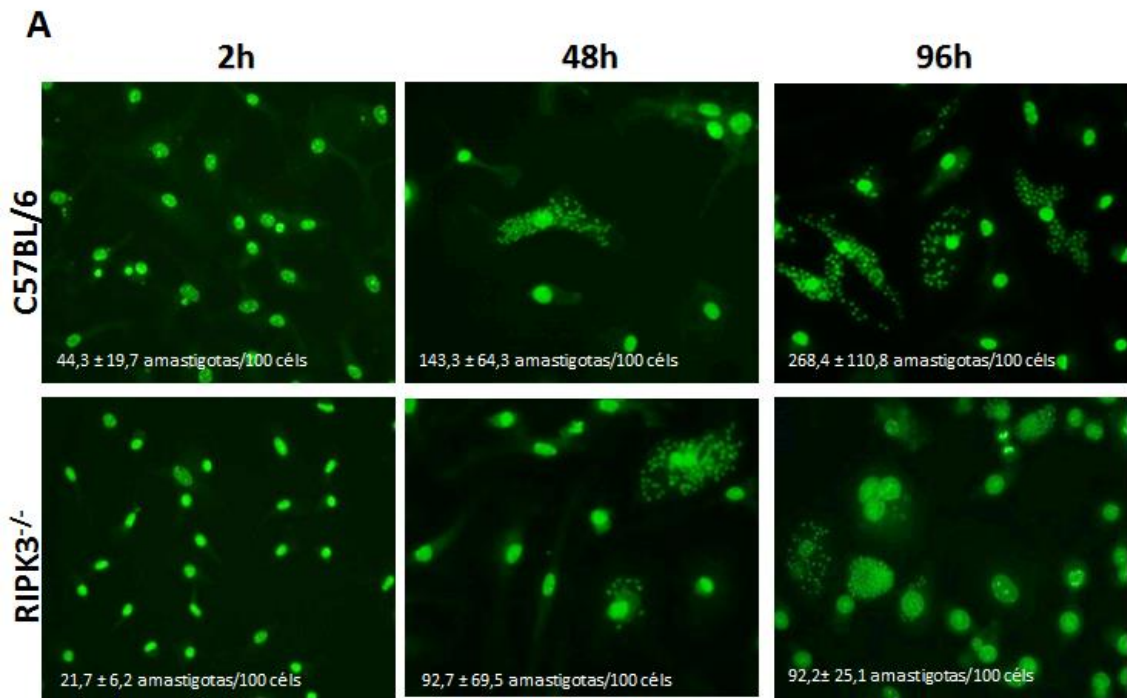
A via da necroptose tem sido descrita como significativa para o controle de algumas infecções no SNC (134,194). RIPK3 é uma das moléculas centrais nessa via e já foi descrita sendo importante no controle de alguns protozoários (154,195,196). Além disso, RIPK3 pode participar da ativação da via dos inflamassomas, que como já demonstrado, é relevante para o controle da infecção por *T. cruzi*. Assim, o próximo passo foi verificar a participação de RIPK3 na infecção por *T. cruzi* em micróglias.

Surpreendentemente, a micróglia *RIPK3^{-/-}* apresentou menor carga parasitaria quando comparado a célula WT, principalmente no tempo mais tardio da infecção (96h) (Figura 7A-B), sugerindo que RIPK3 participe da suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*.

Como a ativação dos inflamassomas é importante para o controle desta infecção, avaliamos a produção de IL-1 β nestas células. Concordando com o dado da carga parasitária, encontramos que a célula *RIPK3^{-/-}* é capaz de secretar maior quantidade de IL-1 β em resposta ao parasita, quando comparada à célula WT, sugerindo que RIPK3 pode atuar como regulador da atividade do inflamassoma (Figura 7C).

No entanto, a célula *RIPK3^{-/-}* apresentou menor secreção de NO quando comparada à célula WT (Figura 7D), sugerindo que um mecanismo independente de NO atue na resistência da micróglia à infecção pelo *T. cruzi* na ausência RIPK3. Ainda, a diferença de secreção de NO entre as micróglias WT e *RIPK3^{-/-}* parece não ter relação com a quantidade total de células, já que mesmo em 96h p.i. não há diferença no número de células entre os grupos (Figura 7E)

Figura 7 -RIPK3 participa do controle da infecção em micróglia por um mecanismo não relacionado à secreção de NO



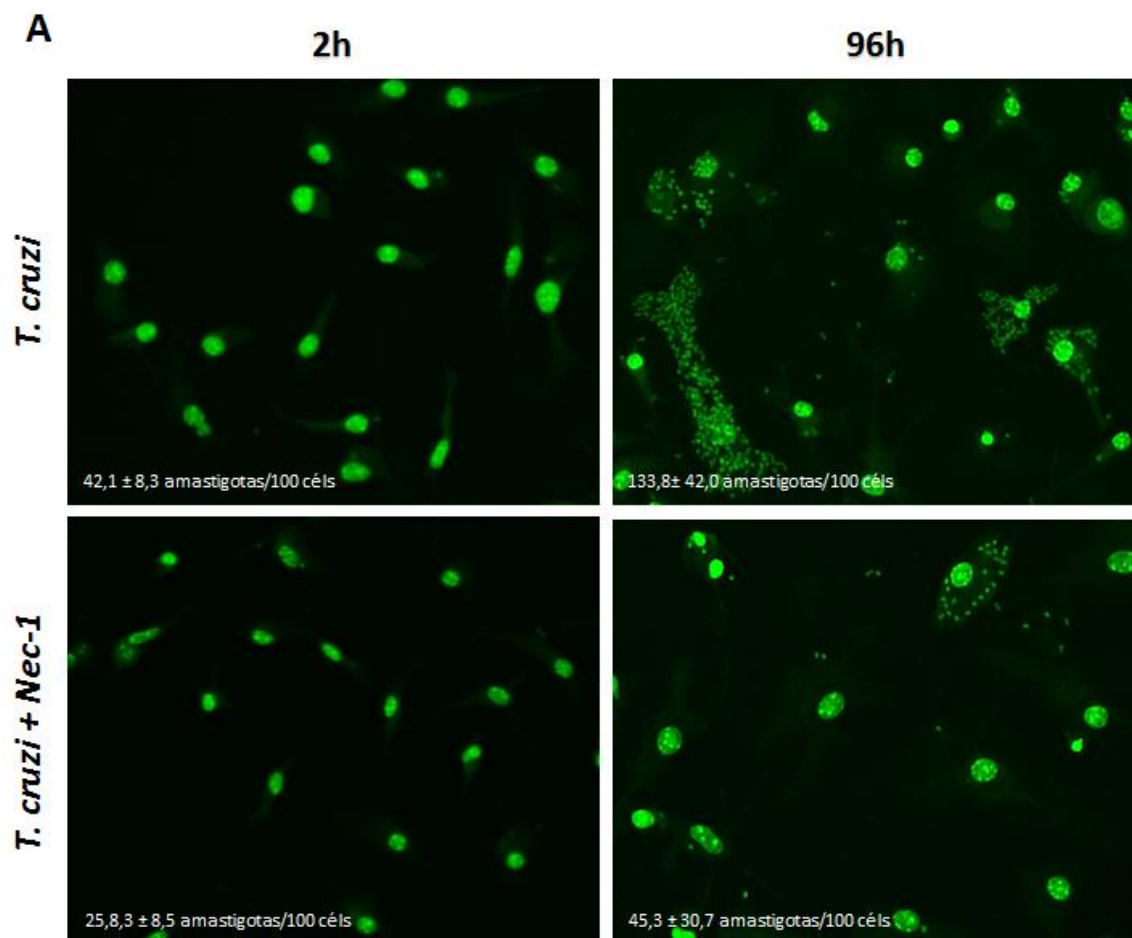
Micróglias primárias extraídas do encéfalo de camundongos C57BL/6 e RIPK3^{-/-} recém-nascidos e foram primadas com LPS (500ng/mL) por 2h. Em seguida as células foram infectadas com *T. cruzi* Y (5:1) por 2h, 48h ou 96h, quando tiveram seus sobrenadantes coletados e foram fixadas com metanol. **(A)**- Células fixadas marcadas com anti-GFAP (vermelho) e coradas com DAPI (verde), onde os núcleos das células e as amastigotas foram diferenciados por tamanho e contados. Micrografias representam aumento óptico de 200x. **(B)**- Gráfico representativo das contagens de amastigotas por 100 células, onde foram contados pelo menos 10 campos de cada triplicata experimental. Foi dosado do sobrenadante destas culturas **(C)**- a produção de IL-1 β no tempo de 24hp.i. e **(D)**- a produção de NO no tempo de 96h. **(E)**- Total de células que estavam aderidas na placa no momento da fixação em 96h. As barras representam a média \pm SD de triplicatas experimentais (*-p<0,05) de um experimento representativo que foi repetido ao menos três vezes.

4.1.3. RIPK1 regula a capacidade tripanocida das micróglias de maneira independente de NLRC4 e NLRP3

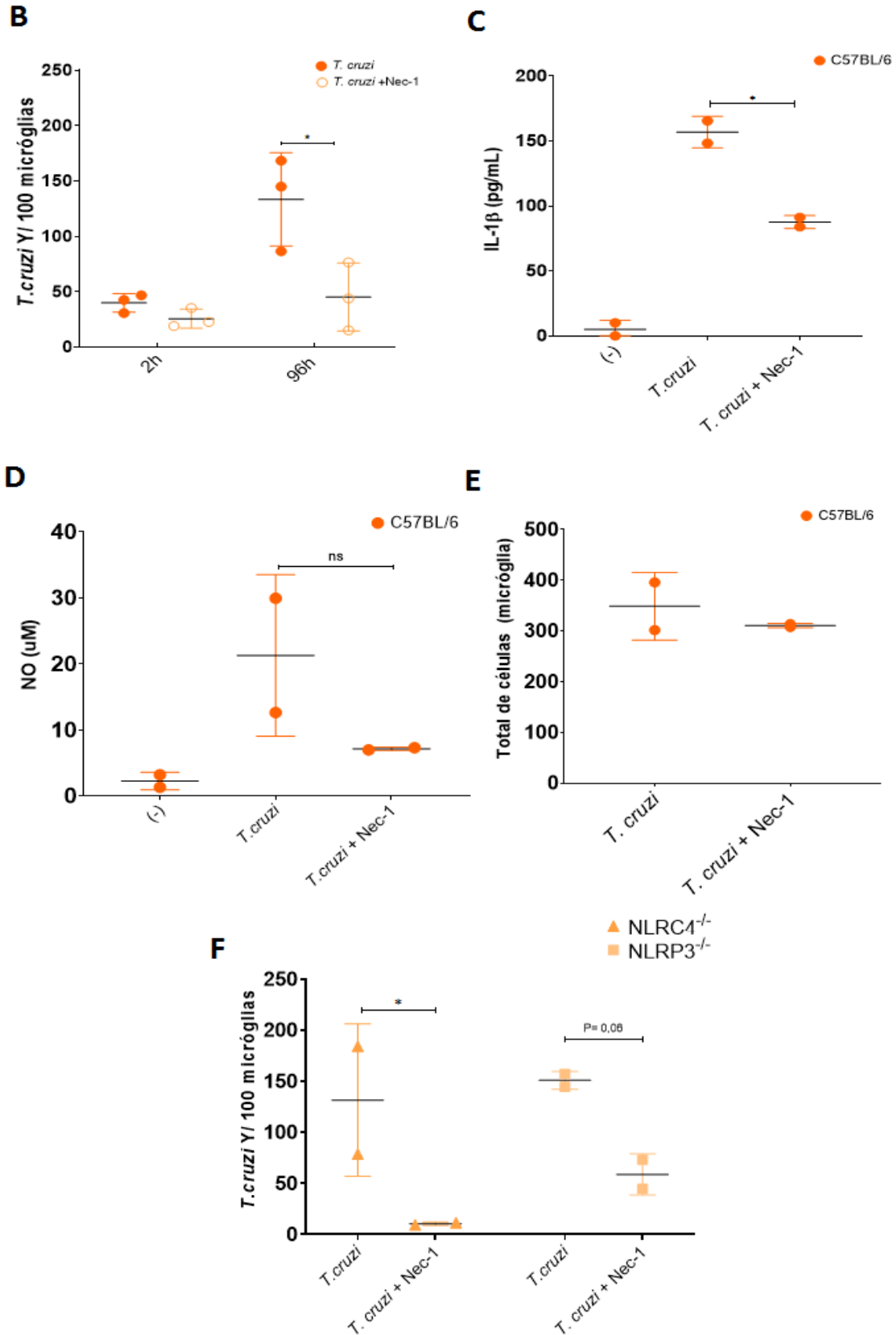
Assim como RIPK3, RIPK1 também é descrito tendo participação na ativação dos inflamassomas, favorecendo sua ativação e a produção de IL-1 β (197,198). Na via de necroptose, RIPK1 está *upstream* de RIPK3 e a ativação de RIPK3 em muitos casos depende de RIPK1. Assim, decidimos investigar o papel de RIPK1 na resposta de micróglias infectadas com *T. cruzi*. Para isso usamos um inibidor farmacológico de RIPK1, a necrostatina-1 (Nec-1). Vemos na figura 8 que o tratamento com Nec-1 tem tendência em diminuir a carga parasitária intracelular no tempo de 96h (Figura 8A-B), sugerindo que, assim como RIPK3, a presença de RIPK1 está relacionada com a maior permissividade à replicação do *T. cruzi*. No entanto, curiosamente, o efeito sobre a secreção de IL-1 β é o oposto ao observado anteriormente: com a inibição de RIPK1 por Nec-1, a micróglia secreta menos IL-1 β em relação à célula não tratada (Figura 8C). Isso sugere que RIPK1 e RIPK3 estão atuando de formas opostas na ativação dos inflamassomas em micróglias em resposta ao *T. cruzi*. Interessantemente, não há efeito de Nec-1 na secreção de NO (Figura 8D), sugerindo que RIPK3 e RIPK1 inibam a capacidade tripanocida de micróglias de maneira não relacionada à produção de NO. E, assim como observado anteriormente, esse efeito não está associado à perda celular, uma vez que a quantidade de células é similar nos dois grupos, mesmo 96h p.i. (Figura 8E).

Para avaliarmos a participação dos inflamassomas na modulação da capacidade tripanocida de micróglias por RIPK1, células obtidas de animais nocaute para NLRC4 (NLRC4^{-/-}) e para NLRP3 (NLRP3^{-/-}) foram tratadas (ou não) com Nec-1. Vimos que o tratamento inibiu a replicação do *T. cruzi* mesmo na ausência desses inflamassomas, sugerindo que a maior resistência das células tratadas com Nec-1 não envolve mecanismos dependentes de NLRC4 e NLRP3 (Figura 8F).

Figura 8 - RIPK1 regula a capacidade tripanocida das micróglia de maneira independente de NLRC4 e NLRP3



(continuação da figura na próxima página)



Micróglias primárias extraídas do encéfalo de camundongos C57BL/6 recém-nascidos e foram primadas com LPS (500ng/mL) por 2h e tratadas (ou não) com Nec-1 (30 μ M) ou AG (1mM). Em seguida as células foram infectadas com *T. cruzi* Y (5:1) por 2h ou 96h, quando tiveram seus sobrenadantes coletados e foram fixadas com metanol. **(A)**- Células WT fixadas marcadas com anti-GFAP (vermelho) e coradas com DAPI (verde), onde os núcleos das células e as amastigotas foram diferenciados por tamanho e contados. Micrografias representam aumento óptico de 200x. **(B)**-

Gráfico representativo das contagens de amastigotas por 100 células, onde foram contados pelo menos 10 campos de cada triplicata experimental. Foi dosado do sobrenadante destas culturas **(C)**- a produção de IL-1 β no tempo de 24hp.i. e **(D)**- a produção de NO no tempo de 96h. **(E)**- Total de células (WT) que estavam aderidas na placa no momento da fixação em 96h. **(F)** – Contagem representativa de amastigotas por 100 células de micróglia primárias extraídas de animais WT, NLRC4^{-/-} e NLRP3^{-/-} que tiveram o mesmo tratamento descrito anteriormente. As barras representam a média \pm SD de triplicatas experimentais (*-p<0,05) de um experimento representativo que foi repetido ao menos três vezes.

4.1.4. Vias metabólicas são impactadas pelos inflamassomas, mas não por RIPK1, em micróglia

Trabalhos recentes têm mostrado como a modulação do metabolismo energético da célula gera diferentes respostas em contextos específicos (199,200). Além disso sabemos que as células da glia tem diferentes papéis dentro da homeostase do tecido nervoso. Dentre tantos metabólitos importantes para a homeostase do tecido nervoso, podemos destacar o lactato e o glutamato, envolvidos em diversos mecanismos celulares, no fornecimento de energia para os neurônios e também localizados em pontos diferentes dentro da cadeia energética (pensando no ciclo do ácido cítrico). Sabendo disso, nosso próximo passo foi observar como esses metabólitos são modulados em resposta à infecção por *T. cruzi* nas micróglia e como as vias relacionadas ao controle da infecção podem modular esses metabólitos.

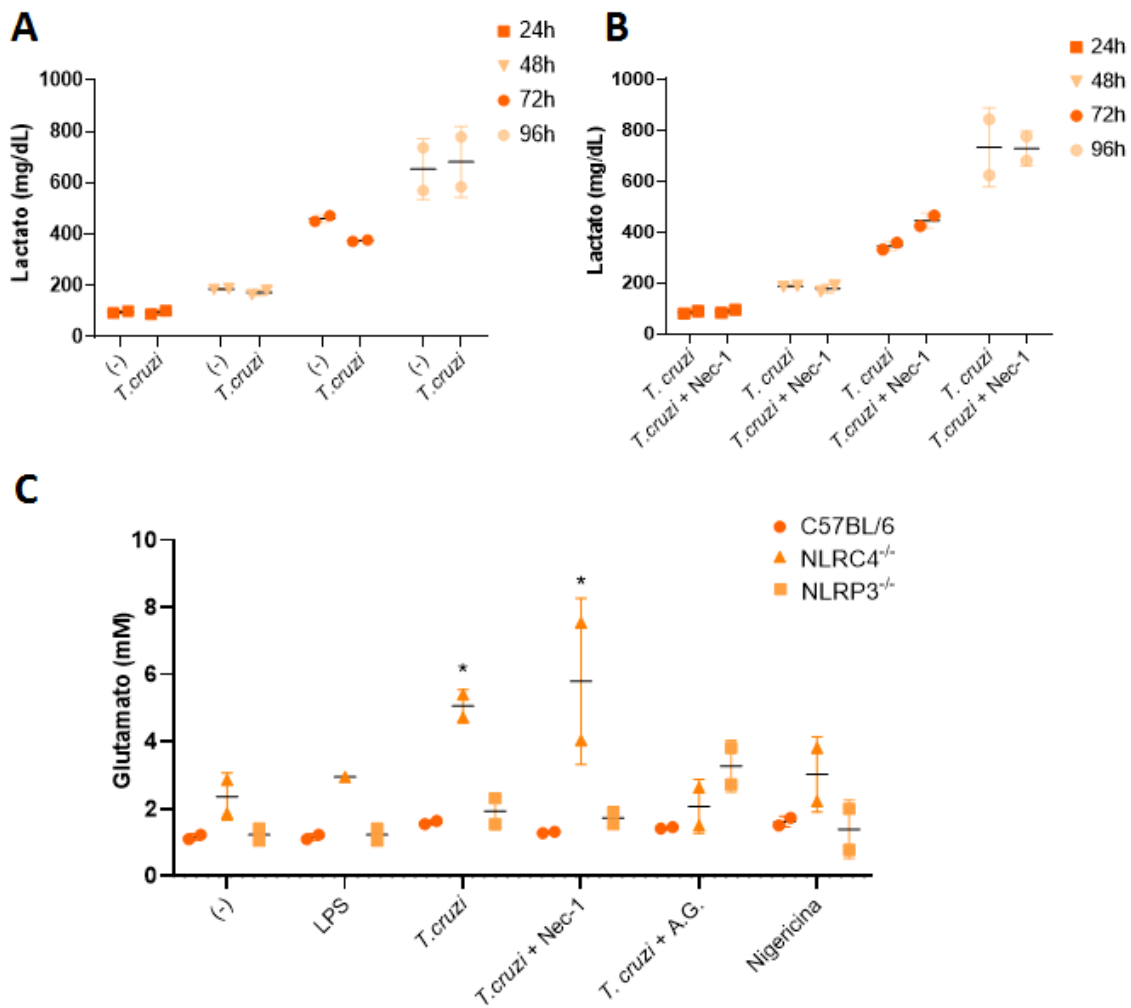
Vimos que a micróglia é capaz de secretar lactato e que este metabólito se acumula com o tempo em cultura (Figura 9A). Além disso, observou-se que nem a infecção com *T. cruzi* (Figura 9A) nem o tratamento com Nec-1 (Figura 9B) alterou a secreção de lactato em nenhum dos tempos observados, sugerindo que a participação de RIPK1 na capacidade tripanocida das micróglia acontece de maneira independente das vias metabólicas que geram lactato.

Assim como observado para o lactato, a infecção com *T. cruzi* não induz alteração no perfil de secreção de glutamato (Figura 9C), bem como os estímulos com LPS e nigericina. Ainda, RIPK1 parece também não ter efeito na liberação desse metabólito, uma vez que Nec-1 não alterou a sua secreção.

No entanto, de maneira muito interessante, micróglia de animais NLRC4^{-/-} mas não de animais NLRP3^{-/-} apresentam alta liberação de glutamato em resposta ao *T. cruzi*. Ainda, o tratamento com Nec-1 foi incapaz de alterar a alta secreção de glutamato observada na ausência de NLRC4. No entanto, surpreendentemente, a adição do inibidor farmacológico de iNOS, a aminoguanidina (AG), foi capaz de reduzir a secreção do glutamato apresentada por micróglia NLRC4^{-/-} a níveis basais (Figura 9C). Uma vez que as micróglia NLRC4^{-/-} apresentam níveis indetectáveis de NO (Figura 6D), o mecanismo pelo qual a AG modula a secreção de glutamato necessita ser elucidado.

Em conjunto, os dados mostram que NLRC4 tem papel majoritário na regulação da micróglia em resposta à infecção por *T. cruzi*, interferindo na capacidade de controlar a infecção e secreção de mediadores envolvidos no metabolismo e comunicação celular.

Figura 9 - Vias metabólicas são impactadas pela expressão de moléculas dos inflamassomas, mas não por RIPK1, em micróglia



Micróglia primária extraída do encéfalo de camundongos C57BL/6 e NLRC4^{-/-} e NLRP3^{-/-} recém-nascidos foram primadas com LPS (500ng/mL) por 2h e tratadas (ou não) com Nec-1 (30μM) ou AG (1mM). Em seguida as células foram infectadas com *T. cruzi* Y (5:1) e seus sobrenadantes foram coletados 24h, 48h, 72h e 96h p.i. onde foram dosados (A) e (B) - lactato (Labtest) e (C) - glutamato (Sigma/Merck) 96h p.i., conforme instruções dos fabricantes. As barras representam a média ±SD de triplicatas experimentais (*-p<0,05).

4.2. Astrócito

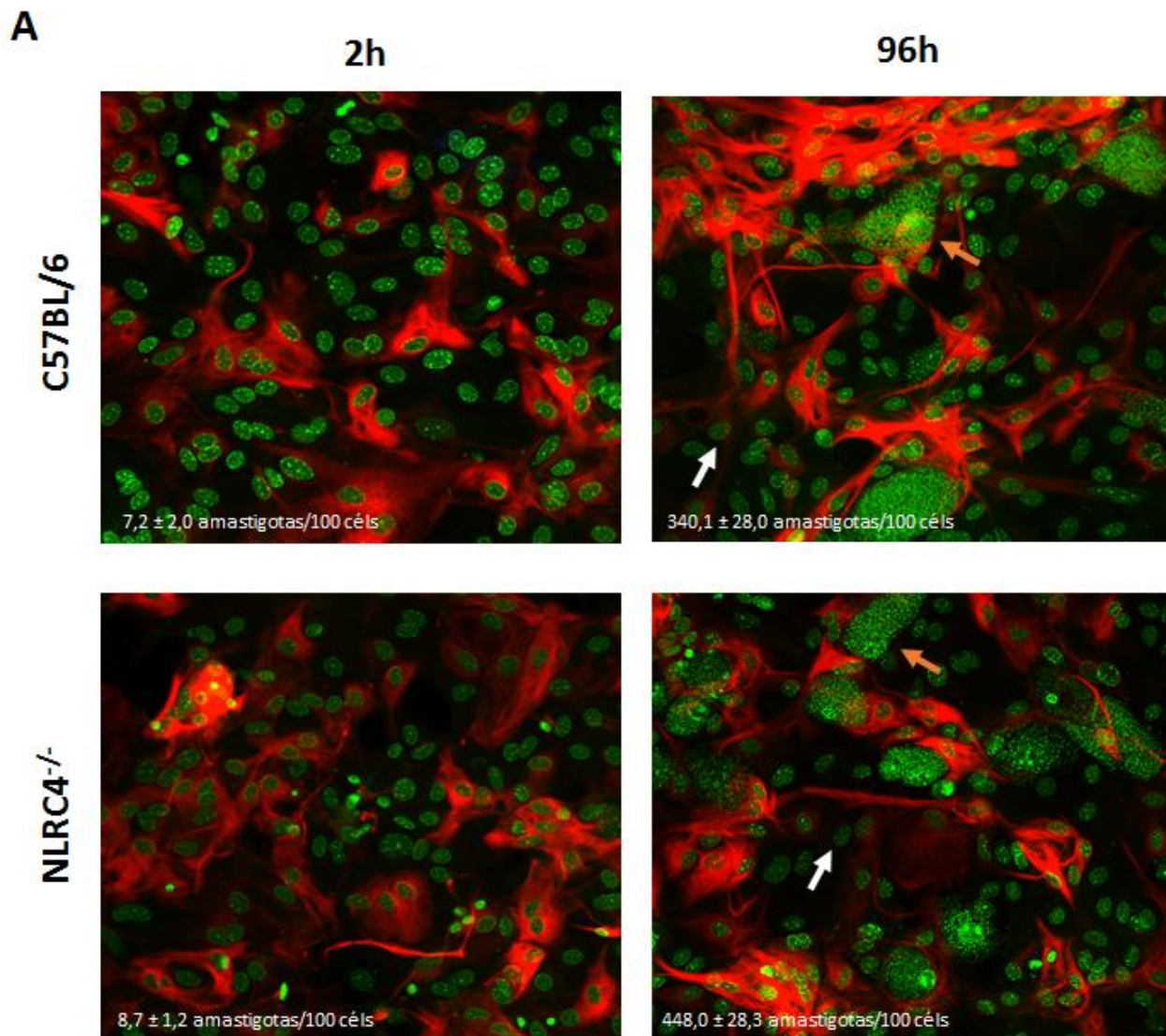
4.2.1. NLRC4 inibe a secreção de NO e tem papel no controle da infecção por *T. cruzi* em astrócitos

Utilizando astrócitos primários extraídos de animais nocaute para NLRC4 (NLRC4^{-/-}) e selvagens (WT), infectados com *T. cruzi* cepa Y (5:1) (conforme descrito anteriormente) avaliamos o papel de NLRC4 no controle da replicação do parasita intracelular. Observou-se que o astrócito NLRC4^{-/-} possui um acentuado aumento na quantidade de parasitas intracelulares (Figura 10 A-B), especialmente em tempos tardios da infecção, o que indica a participação do NLRC4 no controle da replicação de *T. cruzi* nos astrócitos. Em seguida avaliamos a secreção de IL-1 β em resposta a este parasita e vimos que a célula NLRC4^{-/-} tem significativa redução desta citocina, reforçando a importância de NLRC4 para esta célula (Figura 10 C).

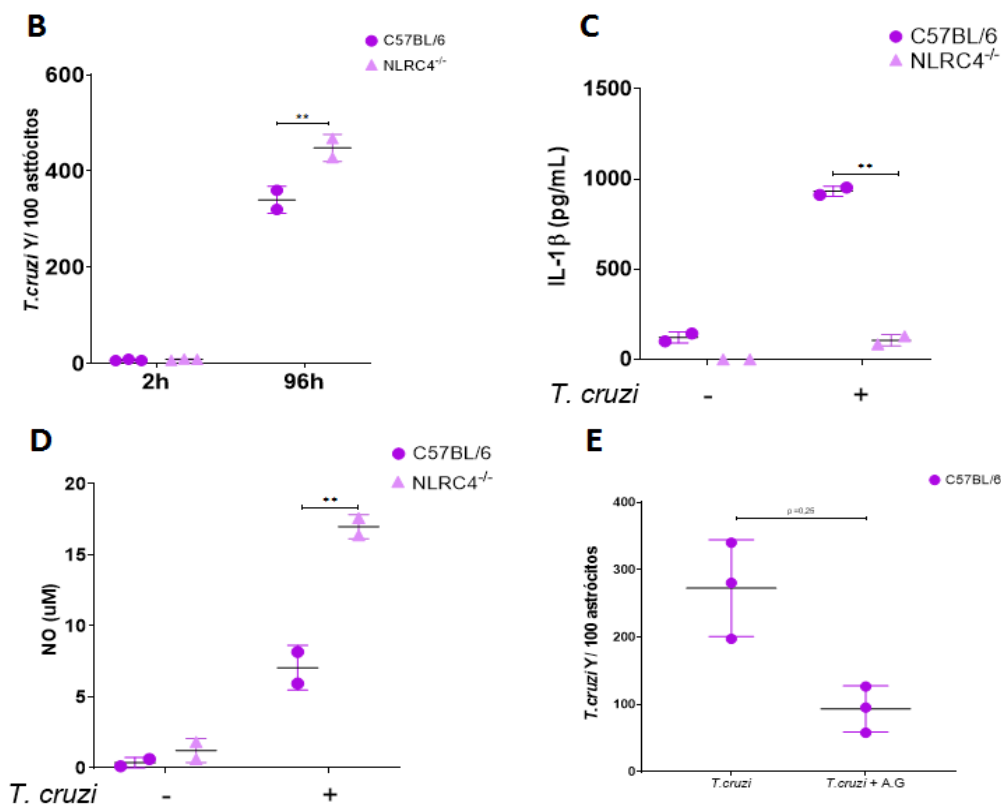
Como observado para as micróglia, avaliamos como estaria a secreção de NO nestas células. Surpreendentemente, a produção de NO foi significativamente aumentada na ausência de NLRC4 (Figura 10D), mostrando um papel diferencial desta molécula em astrócitos e micróglia e sugerindo que no astrócito o NO estaria relacionado com pior controle da infecção. De fato, o tratamento dos astrócitos com AG reduziu consideravelmente a carga parasitária observada nesta célula 96h p.i., (Figura 10E).

Sendo assim, observou-se que NLRC4 é ativado em resposta à infecção por *T. cruzi* em astrócitos e possui papel no controle da infecção por este protozoário. Ainda, NLRC4 participa de maneira distinta na secreção de NO em micróglia e astrócitos e o impacto desse mediador no controle da infecção é oposto nessas populações celulares.

Figura 10- NLRC4 inibe a secreção de NO e tem papel no controle da infecção por *T. cruzi* em astrócitos



(continuação da figura na próxima página)

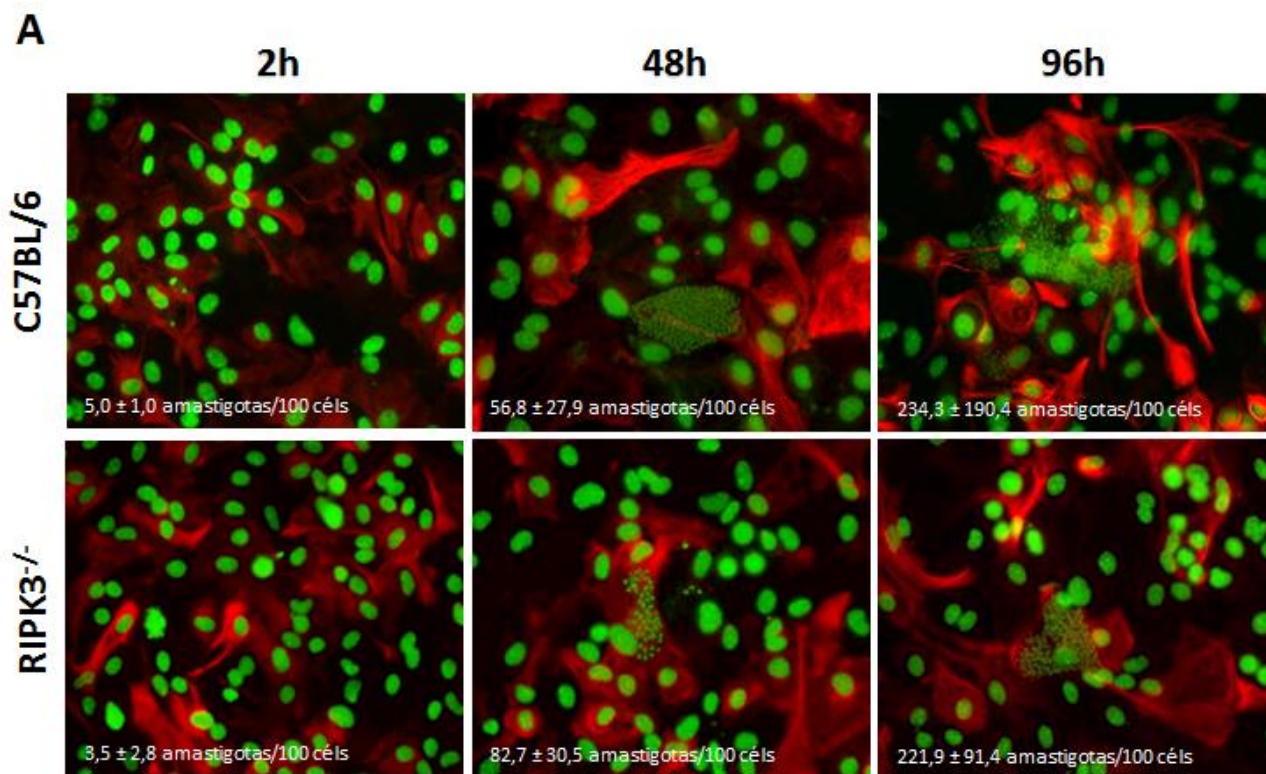


Astrócitos primários extraídos do encéfalo de camundongos C57BL/6 e NLRC4^{-/-} recém-nascidos e foram primadas com LPS (500ng/mL) por 2h. Em seguida foram infectados com *T. cruzi* Y (5:1) por 2h ou 96h, quando tiveram seus sobrenadantes coletados e foram fixadas com metanol. **(A)**- Células fixadas marcadas com anti-GFAP (vermelho) e coradas com DAPI (verde), onde os núcleos das células e as amastigotas foram diferenciados por tamanho e contados. (Seta laranja - ninho contendo amastigotas, seta branca - núcleo da célula). Micrografias representam aumento óptico de 200x. **(B)**- Gráfico representativo das contagens de amastigotas por 100 células, onde foram contados pelo menos 10 campos de cada triplicata experimental. **(C)**- Do sobrenadante coletado foi realizada a dosagem da produção de IL-1β por ELISA e **(D)**- a dosagem da produção de NO. As barras representam a média ±SD de triplicatas experimentais (*-p<0,05; **-p<0,01;) de um experimento representativo que foi repetido ao menos três vezes

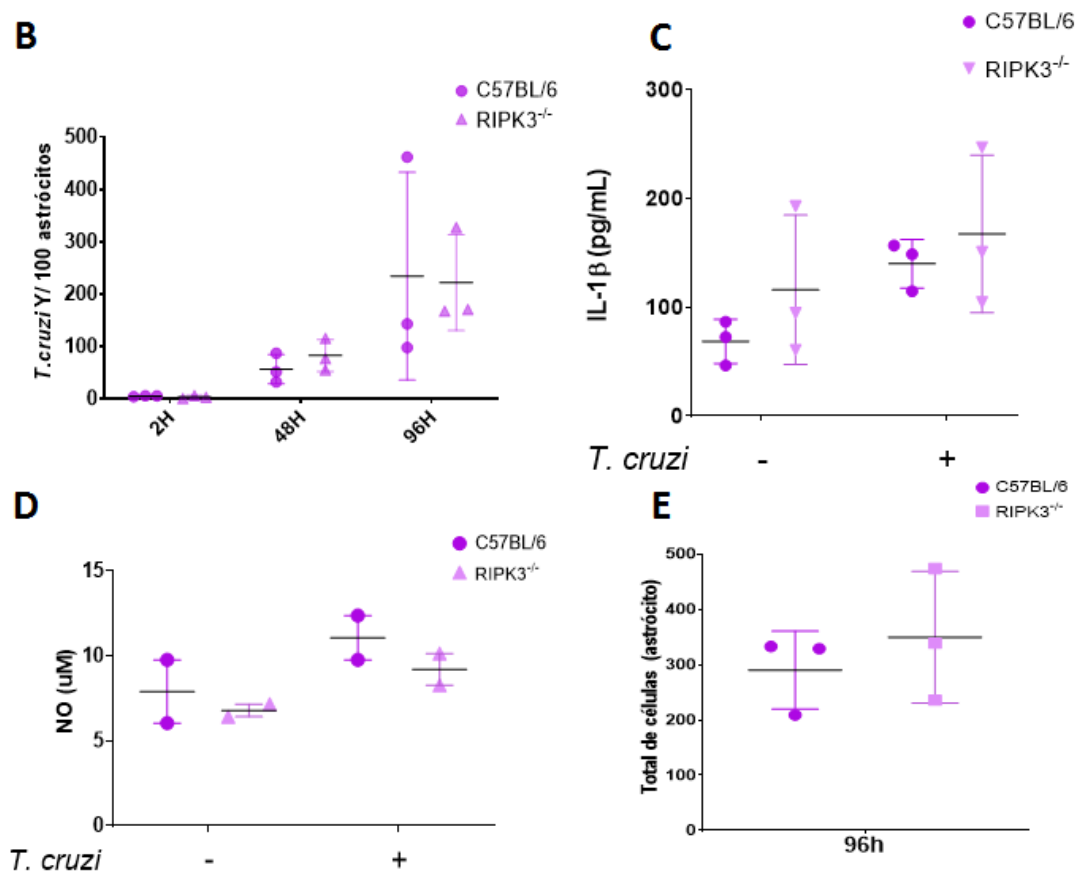
4.2.2. RIPK3 não participa do controle da infecção em astrócitos

Utilizando astrócitos primários extraídos de animais nocautes para RIPK3 (RIPK3^{-/-}) e selvagens (WT), infectados com *T. cruzi* cepa Y, observou-se que o parasita é capaz de replicar e aumentar a carga parasitária de maneira tempo-dependente, confirmando dados anteriores (115). Além disso, vimos que os astrócitos RIPK3^{-/-} e WT não apresentaram diferenças na quantidade de parasitas intracelulares, mesmo em tempos mais tardios da infecção (Figura 11A-B), sugerindo que RIPK3 não tenha papel no controle da infecção do *T. cruzi* em astrócitos. Corroborando esses dados, temos a produção de IL-1β e de NO que não se alteram na ausência de RIPK3 (Figura 11C-D). Dessa forma, os dados mostram que RIPK3 não tem papel na infecção por *T. cruzi* em astrócitos.

Figura 11 - RIPK3 não participa do controle da infecção em astrócitos



(continuação da figura na próxima página)



Astrócitos primários extraídos do encéfalo de camundongos C57BL/6 e RIPK3^{-/-} recém-nascidos e foram primadas com LPS (500ng/mL) por 2h. Em seguida as células foram infectadas com *T. cruzi* Y (5:1) por 2h, 48h ou 96h, quando tiveram seus sobrenadantes coletados e foram fixadas com metanol. **(A)**- Células fixadas marcadas com anti-GFAP (vermelho) e coradas com DAPI (verde), onde os núcleos das células e as amastigotas foram diferenciados por tamanho e contados. Micrografias representam aumento óptico de 200x. **(B)**- Gráfico representativo das contagens de amastigotas por 100 células, onde foram contados pelo menos 10 campos de cada triplicata experimental. Foi dosado do sobrenadante destas culturas **(C)**- a produção de IL-1 β no tempo de 24hp.i. e **(D)**- a produção de NO no tempo de 96h. **(E)**- Total de células que estavam aderidas na placa no momento da fixação em 96h. As barras representam a média \pm SD de triplicatas experimentais de um experimento representativo que foi repetido ao menos três vezes.

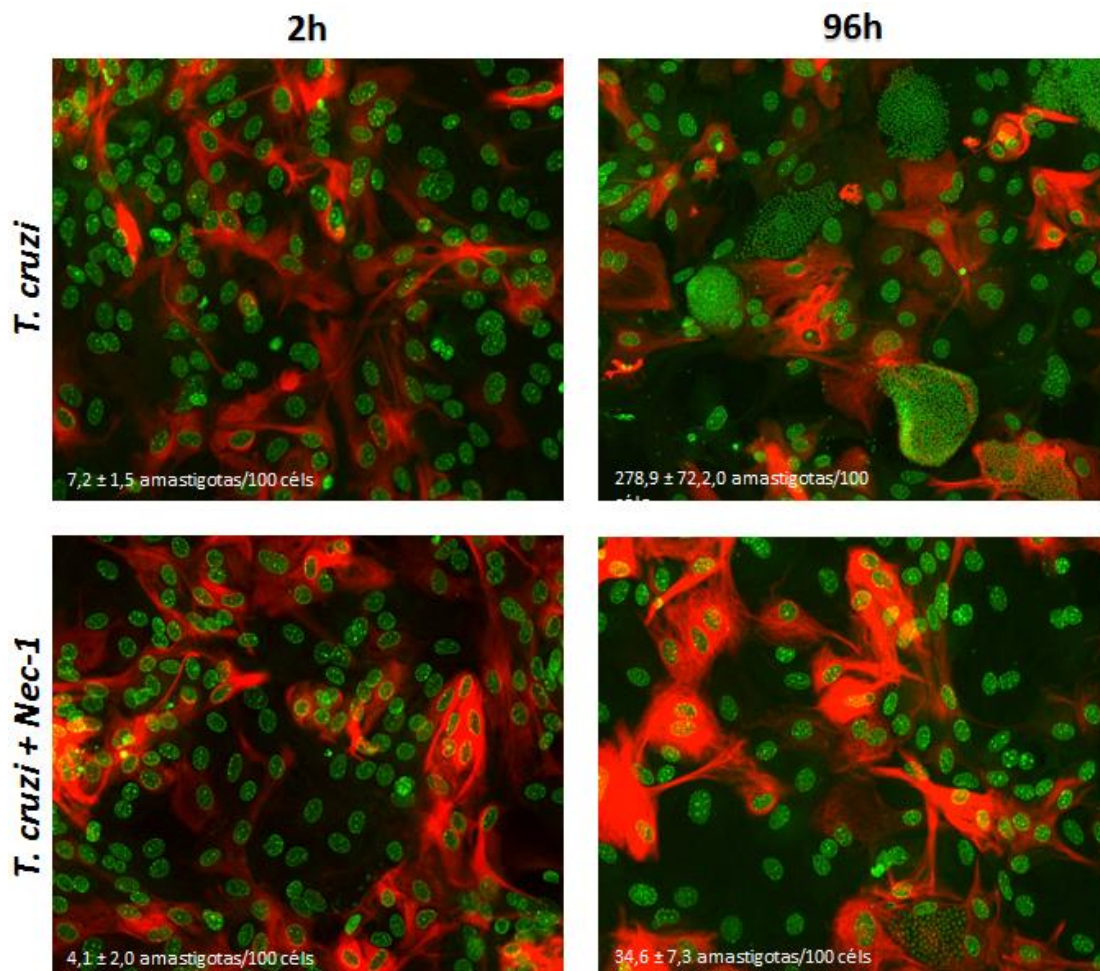
4.2.3. RIPK1 inibe o controle da infecção por *T. cruzi* em astrócitos de maneira independente dos inflamassomas

Seguindo o mesmo racional apresentado anteriormente, fomos verificar o papel de RIPK1 no controle da infecção do *T. cruzi* em astrócitos. Vemos na figura 12 que o tratamento com Nec-1 diminui drasticamente a carga parasitária dos astrócitos, sugerindo que RIPK1 seja bastante importante para a permissividade do astrócito à infecção pelo *T. cruzi* (Figura 12A-B). Assim como observamos nas micróglias, Nec-1 inibiu a secreção de IL-1 β (Figura 12C) e não alterou a secreção de NO (Figura 12D) em resposta ao parasita, sugerindo que RIPK1 interfere

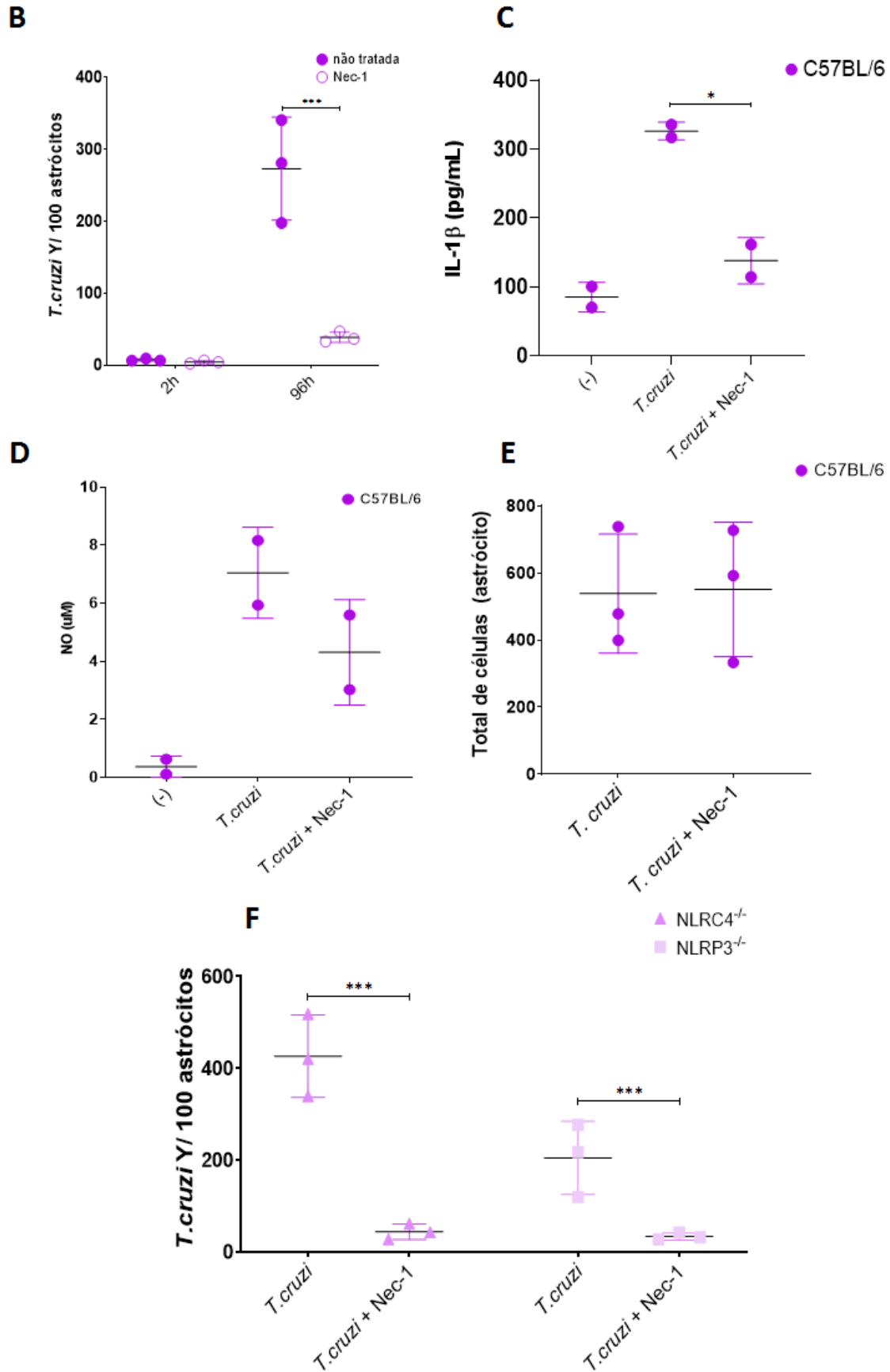
na susceptibilidade dos astrócitos de maneira não relacionada à produção de NO. Uma vez mais, os efeitos não podem ser atribuídos ao efeito do Nec-1 na perda celular, uma vez que o número de células foi mantido após o trabalho e infecção (Figura 12E).

Uma vez que Nec-1 inibiu a secreção de IL-1 β dos astrócitos, decidimos avaliar a participação de NLRC4 e NLRP3 na modulação da resistência dessas células em resposta ao *T. cruzi* (Figura 12F). Assim como obtido com as micróglia, foi possível observar o efeito do tratamento com Nec-1 na resistência dos astrócitos NLRC4^{-/-} e NLRP3^{-/-} à infecção pelo *T. cruzi*, sugerindo que RIPK1 controle a susceptibilidade dos astrócitos de maneira independente de inflamassomas por um mecanismo a ser elucidado e que não está relacionado à modulação da secreção de NO.

Figura 12 - RIPK1 tem papel no controle da infecção em astrócitos, por um mecanismo de inibição de NO e é capaz de modular ativação dos inflamassomas



(Figura continua na próxima página)



Astrócitos primários extraídos do encéfalo de camundongos C57BL/6 recém-nascidos e foram primadas com LPS (500ng/mL) por 2h e tratadas (ou não) com Nec-1 (30µM) ou AG (1mM). Em seguida as células foram infectadas com

T. cruzi Y (5:1) por 2h ou 96h, quando tiveram seus sobrenadantes coletados e foram fixadas com metanol. **(A)**- Células WT fixadas marcadas com anti-GFAP (vermelho) e coradas com DAPI (verde), onde os núcleos das células e as amastigotas foram diferenciados por tamanho e contados. Micrografias representam aumento óptico de 200x. **(B)**- Gráfico representativo das contagens de amastigotas por 100 células, onde foram contados pelo menos 10 campos de cada triplicata experimental. Foi dosado do sobrenadante destas culturas **(C)**- a produção de IL-1 β no tempo de 24hp.i. e **(D)**- a produção de NO no tempo de 96h. **(E)**- Total de células (WT) que estavam aderidas na placa no momento da fixação em 96h. **(F)** – Contagem representativa de amastigotas por 100 células de astrócitos primários extraídos de animais WT, NLRC4^{-/-} e NLRP3^{-/-} que tiveram o mesmo tratamento descrito anteriormente. As barras representam a média \pm SD de triplicatas experimentais (*-p<0,05; **-p<0,01; ***-p<0,001) de um experimento representativo que foi repetido ao menos três vezes.

4.2.4. Inflamassomas modulam vias metabólicas dos astrócitos em resposta à infecção pelo *T. cruzi*

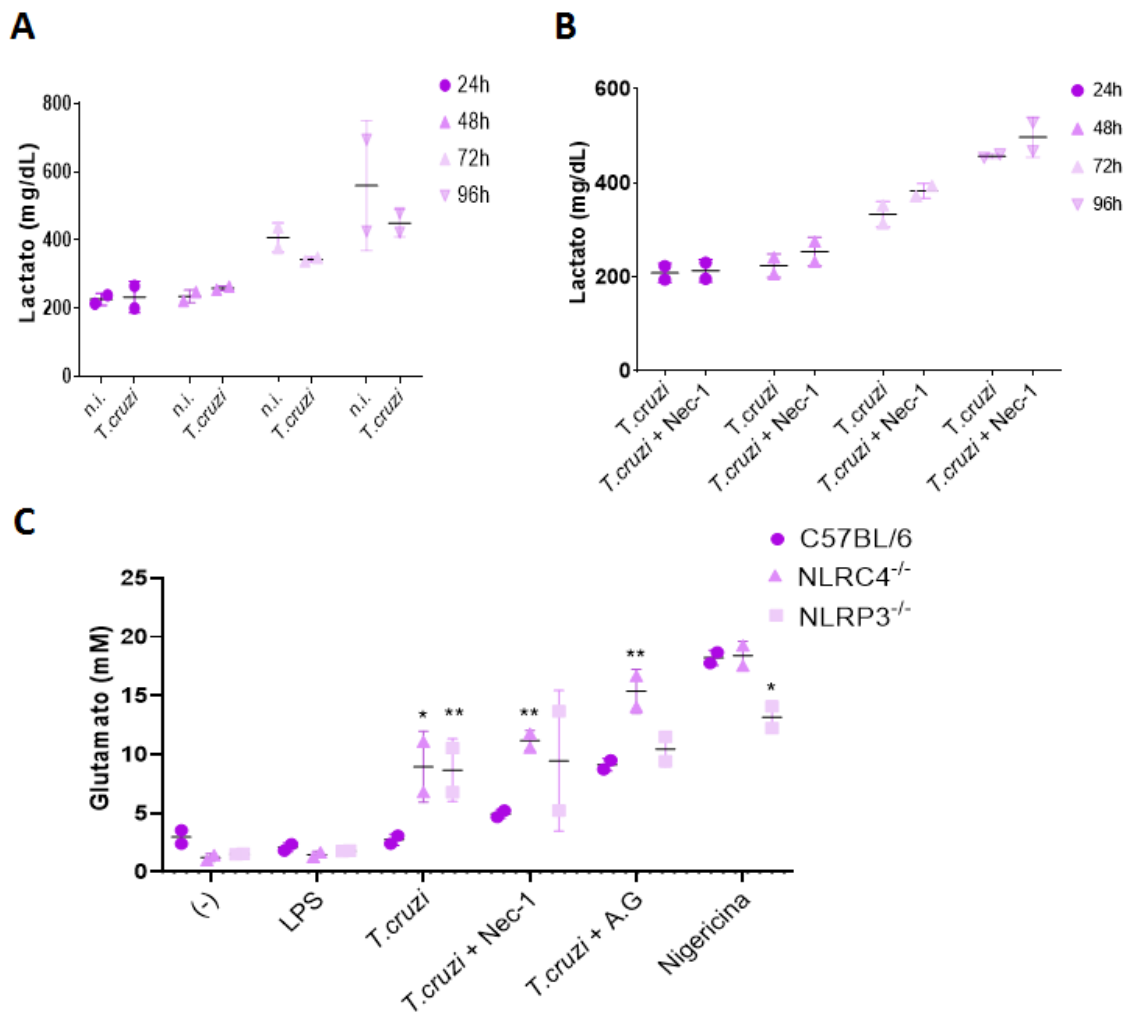
Uma vez que os dados anteriores sugerem que vias distintas mediadas pelos inflamassomas e RIPK1 alteram a resistência dos astrócitos à infecção pelo *T. cruzi* e que essas vias podem impactar (e ser impactadas pelo) o metabolismo energético dessas células, avaliamos dois metabólitos importantes para os astrócitos que são o lactato e o glutamato. Similar ao observado nas micróglia (Figura 9), verificamos que os astrócitos secretam lactato de maneira independente da infecção por *T. cruzi* (Figura 13A). Ainda, esse metabólito se acumula com o tempo em cultura e também não é alterado pelo tratamento com Nec-1 (Figura 13B), sugerindo que a participação de RIPK1 na capacidade tripanocida dos astrócitos também acontece de maneira independente das vias metabólicas que geram lactato.

Ao contrário do estímulo com nigericina, a infecção com *T. cruzi* e o tratamento com LPS não induziram alteração na presença do glutamato na cultura dos astrócitos (Figura 13C). Houve uma tendência ao aumento na secreção de glutamato após o tratamento com Nec-1 apesar de não haver diferença significativa. Os inflamassomas parecem exercer papel majoritário na inibição da secreção (ou aumento da recaptção) do glutamato também em astrócitos infectados, uma vez que altos níveis de glutamato em resposta ao *T. cruzi* foram encontrados nos astrócitos dos animais NLRC4^{-/-} e também NLRP3^{-/-} (Figura 13C).

Ao contrário do observado em micróglia, o tratamento com o inibidor farmacológico de iNOS, a aminoguanidina (AG), aumentou a secreção do glutamato dos astrócitos, especialmente dos astrócitos NLRC4^{-/-} (Figura 13C).

Em conjunto, os dados mostram que NLRC4 participa da capacidade tripanocida de astrócitos por um mecanismo relacionado à inibição de NO e glutamato.

Figura 13- Inflamassomas e RIPK1 modulam vias metabólicas em resposta a infecção pelo *T. cruzi*



Astrócitos primários extraídos do encéfalo de camundongos C57BL/6 e NLRC4^{-/-} e NLRP3^{-/-} recém-nascidos foram primadas com LPS (500ng/mL) por 2h e tratadas (ou não) com Nec-1 (30μM) ou AG (1mM). Em seguida as células foram infectadas com *T. cruzi* Y (5:1) e seus sobrenadantes foram coletados 24h, 48h, 72h e 96h p.i onde foram dosados **(A) e (B)** - lactato (Labtest) e **(C)** - glutamato (Sigma/Merck) 96h p.i., conforme instruções dos fabricantes. As barras representam a média ±SD de triplicatas experimentais (*-p<0,05; **- p<0,01).

5. Discussão

Mesmo com mais de 100 anos desde sua descrição, a doença de Chagas continua sendo uma doença tropical negligenciada. Importantes iniciativas vêm trazendo atenção para isso, fazendo levantamento epidemiológico e também promovendo o conhecimento e o tratamento da doença nas comunidades endêmicas. O entendimento de mecanismos celulares e moleculares envolvidos no controle da infecção pelo *T. cruzi* também pode desempenhar papel importante no combate dessa doença. Nesse sentido, nosso trabalho, junto ao de outros grupos, vem buscando entender as vias moleculares envolvidas na resposta imune ao *T. cruzi* e na interação patógeno-hospedeiro. No presente trabalho vimos a participação de moléculas citosólicas (a saber NLRC4, RIPK1 e RIPK3) na resposta à infecção por *T. cruzi* em micróglia e astrócitos e seus diferentes papéis na modulação da secreção de IL-1 β , NO. Além disso também observamos o impacto dessas moléculas para o perfil metabólico da célula, o que também se correlaciona com o controle da infecção.

É possível observar que a infecção por *T. cruzi* foi capaz de ativar o inflamassoma NLRC4 na micróglia, uma vez que na ausência dessa molécula houve diminuição da secreção de IL-1 β , parâmetro utilizado para avaliar a ativação dos inflamassomas (Figura 6C). Interessante, na micróglia NLRC4^{-/-} a secreção de IL-1 β não foi totalmente abolida, uma vez que é sabido que outros inflamassomas como o NLRP3 também participam da resposta frente a este parasita (65,115,201). Esses dados sugerem que os inflamassomas formados por diferentes moléculas iniciadoras, podem cooperar e até agir de maneira redundante para a resposta a um mesmo estímulo. De fato, alguns trabalhos já mostraram o recrutamento de NLRP3 e NLRC4 após o estímulo com *Salmonella*, sugerindo que um inflamassoma recruta o outro para compor a resposta. É também provável que eles agrupem na mesma plataforma molecular formando apenas um único *puncta* inflamassoma no citosol (202,203). Neste caso, a ausência de uma dessas proteínas *upstream* a ASC não resultaria na depleção total da secreção das citocinas, mas apenas na sua diminuição.

Apesar de baixa significância estatística, houve grande tendência em todos os experimentos realizados, à menor secreção de NO e maior permissividade à replicação do *T. cruzi* em micróglia NLRC4^{-/-} (Figura 6A-B, D). Como descrito anteriormente por nosso grupo, o NO dependente de NLRP3 foi importante para controlar a infecção por *T. cruzi* em macrófagos e micróglia (65,115). Assim, talvez a redundância com NLRP3 possa explicar o baixo impacto da ausência de NLRC4 na secreção de NO em micróglia. A participação dos inflamassomas na indução da secreção de NO está relacionada com a atividade da caspase-1 que depois de ativada pode clivar uma proteína associada a cromatina, PARP-1, e então liberar o sítio de transcrição do gene da iNOS (112,113). Dessa forma é possível inferir que mesmo que os inflamassomas

funcionem cooperativamente em resposta ao mesmo estímulo, possivelmente algum dos receptores é predominante em certas respostas a alguns estímulos. Por ser capaz de ser ativado por diversos estímulos, NLRP3 é provavelmente o inflamassoma “predominante” na resposta da micróglia ao *T. cruzi* e pode receber adição à essa resposta pela ativação de NLRC4. No entanto, apesar de ainda serem necessários mais estudos a respeito do mecanismo pelo qual o *T. cruzi* é capaz de ativar NLRC4, é importante pontuar que até o presente momento este é um dos primeiros trabalhos que observa a participação de NLRC4 em uma infecção por protozoário (97).

É sabido que a resposta suficiente ao *T. cruzi*, em macrófagos e em modelos experimentais *in vivo* é dependente da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , INF- γ , IL-12, da secreção de NO e da função adequada das células da imunidade inata e imunidade adaptativa como macrófagos, células NK, linfócitos Th1, TCD8⁺ (204–206). A via da necroptose que participa em diversos contextos de infecção (134,142,156) e em patologias estéreis e crônicas (184,207,208) é ativada por TNF e já foi observada contribuindo para a ativação dos inflamassomas. Assim, parecia lógica a participação da necroptose na infecção pelo *T. cruzi*. Porém, surpreendentemente, na ausência de RIPK3 houve um melhor controle da replicação do *T. cruzi* e secreção de maiores níveis de IL-1 β , sugerindo que RIPK3 possa inibir a ativação dos inflamassomas em resposta a esse parasita. No entanto, a atividade de RIPK3 parece acontecer de maneira independente da indução de morte celular, uma vez que não houve diferença na quantidade de células recuperadas após a infecção e também da secreção de NO (Figura 7C).

Alguns estudos têm mostrado como as vias de apoptose e de necroptose tem capacidade de ativar o NLRP3 e induzir a secreção de IL-1 β (209–212). Além disso a caspase-8 foi demonstrada tendo habilidade de clivar IL-1 β diretamente e também de ativar o inflamassoma NLRP3 (211,213–215). É possível sugerir que o *T. cruzi* seja capaz de ativar a caspase-8 e essa, na ausência de RIPK3, além de não mais inibir essa proteína (que pode induzir a ativação dos inflamassomas) também pode diretamente clivar a IL-1 β aumentando sua secreção nas micróglia no presente estudo (Figura 7C). Porém, diversos estudos mostraram que células *Ripk3*^{-/-}*Caspase-8*^{-/-}, *Fadd*^{-/-}*Ripk3*^{-/-}, *Mlkl*^{-/-}*Fadd*^{-/-} e *Ripk3*^{-/-} tem drasticamente diminuída a transcrição de proteínas inflamatórias, incluindo IL-1 β (138,214,216). Sendo assim, seria mais provável que a micróglia *Ripk3*^{-/-} tenha outras vias intracelulares alteradas, como as relacionadas com metabolismo celular, dentre outras, que explicaria o aumento de IL-1 β em resposta à infecção pelo *T. cruzi*.

Uma vez que a ausência de RIPK3 resultou na melhora do controle da infecção por um mecanismo que não dependente de NO e nem da morte celular (Figura 7D-E), nossa próxima

avaliação buscou entender se era um mecanismo dependente de RIPK1. Existem alguns contextos que RIPK3 pode ser recrutado diretamente por TRIF e recrutar MLKL na ausência de RIPK1, bem como outras vias que levam a transcrição de NFκB, ou mesmo à apoptose que requerem RIPK1 mas são independente de RIPK3 (189). Por isso avaliamos a participação de RIPK1 através da adição do inibidor farmacológico dessa molécula, o Nec-1. Foi possível notar que o tratamento diminuiu a carga parasitária da micróglia tratada (Figura 8A-B) e, mais uma vez, esse controle não estava relacionado com a secreção de NO, uma vez que a secreção deste, não foi alterada na presença do inibidor (Figura 8D). Além disso, com a inibição de RIPK1 observou-se menor secreção de IL-1β, sugerindo que RIPK1 tenha um papel positivo na modulação do inflamassoma, favorecendo sua ativação (Figura 8C). Esse dado converge com os estudos que vêem RIPK1 favorecendo a ativação dos inflamassomas. Uma das vias que se sugere que RIPK1 favoreça a secreção de IL-1β é pela ativação da fosfatase mitocondrial de serina/treonina, a PGAM5 (*Phosphoglycerate mutase, an enzyme family member 5*) que responde a TNF e é responsável por induzir mtROS e em consequência ativar NLRP3 (197,213). A participação de PGAM5 já foi descrita como sendo essencial para o controle da replicação da *L. amazonensis* uma vez que foi capaz de modular tanto a secreção de IL-1β como de NO (156). No entanto, nesse mesmo estudo, as pesquisadoras observaram que PGAM e RIPK1 participavam do controle da *Leishmania* por mecanismos distintos, onde RIPK1 quando inibido não tinha alterada sua secreção de NO, assim como observamos no presente estudo com *T. cruzi*. Porém Dra. Luz e colaboradores observaram que a inibição de RIPK1 deixou macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) mais susceptíveis à infecção por *Leishmania* e também que a secreção de IL-1β estava aumentada após o tratamento com Nec-1 (156). Interessante, apesar de Nec-1 ter capacidade de inibir a secreção de IL-1β (Figura 8C), o seu efeito no controle da infecção aconteceu de maneira independente das moléculas NLRC4 e NLRP3 (Figura 8F).

A invasão do *T. cruzi* no parênquima do SNC é uma observação bastante antiga, praticamente feita desde a descrição da DC. Desde 1911 Carlos Chagas já postulava a presença do *T. cruzi* no SNC nos casos crônicos, mesmo a maior parte dos casos relatados na fase aguda, naquela época. É também antiga a informação de que esse parasita dificilmente se encontrava em neurônios, no geral eles estão abrigados nas células gliais e em especial nos astrócitos (14,15,217,218). Esses estudos iniciais observavam que os ninhos de amastigotas se encontravam quase sempre em nódulos que continha: parasita, astrócito, micróglia e até mesmo infiltrados inflamatórios (13). A maior parte dos grupos que observaram a infecção do SNC em humanos eram estudos descritivos, principalmente de pacientes HIV⁺ e não havia informação suficiente sobre mecanismos moleculares dos astrócitos em resposta a essa

infecção. Um dos primeiros estudos *in vitro* que analisou a biologia molecular desta célula em resposta ao *T. cruzi* observou que o parasita foi capaz de invadir e replicar de maneira tempo-dependente. Ainda, o astrócito apresentou aumento da expressão da molécula de MHC (tipo I e II) e secreção da citocinas e quimiocinas, sugerindo seu papel como célula apresentadora e ativadora da imunidade adaptativa (219). Nesse contexto nosso grupo também descreveu a capacidade do *T. cruzi* invadir e se replicar em astrócitos primários de camundongos neonatos. O astrócito parece não controlar a infecção por *T. cruzi*, mostrando-se mais permissivo que a micróglia, fato relacionado com a menor ativação de NLRP3 nessas células. Ainda, os astrócitos de camundongos WT e NLRP3^{-/-} se mostraram igualmente permissivos à infecção (115). Em contrapartida, astrócitos deficientes em NLRC4 apresentaram uma carga parasitária ainda maior do que a célula WT (Figura 10A-B), sugerindo que esta molécula contribua para a homeostase celular de alguma forma. De fato, já foi sugerido que a expressão de NLRC4 seria maior em astrócitos do que em micróglia, em resposta a uma lipoproteína (LPC) (183), o que pode sugerir que para os astrócitos, a ausência de NLRC4 seja mais significativa do que nas micróglia, em resposta ao *T. cruzi*. Ainda, observamos que a secreção de IL-1 β diminuiu significativamente na ausência de NLRC4 (Figura 10C) e também acompanhou o controle da infecção, sugerindo que NLRC4 é de fato importante para resposta frente à infecção pelo *T. cruzi*, mesmo que o controle da infecção não seja obtido por completo. Em outros contextos de infecção como por exemplo por *Brucella abortus*, o astrócito também foi capaz de secretar citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , também não controlando totalmente a replicação desta bactéria (181).

Surpreendentemente, a secreção de NO foi significativamente aumentada no astrócito NLRC4^{-/-} (Figura 10D). Esse resultado chamou bastante a atenção e, a fim de confirmá-lo, tratamos células WT com AG e avaliamos a carga parasitária após 96h de infecção. O tratamento levou a uma tendência na diminuição da carga parasitária, o que sugere que o NO nos astrócitos esteja relacionado à suscetibilidade à infecção (Figura 10E). Resultado similar já havia sido observado por nós no estudo prévio a este (dado não mostrado) e também um outro estudo onde Silva e colaboradores mostraram que os astrócitos que secretavam mais NO apresentavam maior carga parasitária de *T. cruzi* (220). Nesse trabalho, os autores apontaram a importância de INF γ na suscetibilidade à invasão e replicação do *T. cruzi* no astrócito. Em um trabalho do mesmo grupo, Silva e colaboradores mostram o papel do TNF α nessa suscetibilidade (221). Nesse contexto, o grupo mostra como as citocinas mais importantes e abundantes sistemicamente para a infecção pelo *T. cruzi* participam de maneira a aumentar suscetibilidade do astrócito, permitindo que ele seja uma célula-alvo para a invasão do parasita e explicando por que provavelmente o SNC seja o tecido com altas taxas de reativação do parasita. Destaca-

se o efeito oposto do NO encontrado em micróglia e astrócitos. Por serem células extremamente abundantes e por estarem na formação da primeira barreira de entrada do parênquima do SNC, através da BBB, é muito importante que os astrócitos sejam capazes de responder a insultos agudos do SNC, mas ao mesmo tempo que sejam células menos vulneráveis a mudanças bruscas no seu perfil de ativação. Vale lembrar que uma das funções desta célula é manter a homeostase do meio extracelular através da regulação de íons e água e até mesmo alguns metabólitos, principalmente para manter a sobrevivência dos neurônios ao seu redor. Alguns trabalhos já mostraram que moléculas como NO e IL-1 β podem participar do aumento da permeabilidade da BBB (222,223) além de terem efeito neurotóxico (224). Sendo assim é favorável que a condição com menor secreção de NO seja também a que tem melhor controle da infecção.

Como já comentado anteriormente, o astrócito é capaz de secretar TNF em resposta ao *T. cruzi* (220,221). Além disso, a infecção pelo *T. cruzi* já foi observada ativando a apoptose nessas células que estavam co-infectadas com HIV (225). Ainda, a ativação de RIPK3 nos astrócitos já foi descrita em de outros contextos de inflamação como na infecção pelo Zika vírus e também na esclerose lateral amiotrófica (*Amyotrophic lateral sclerosis*; ALS) (194,226). Em ambos os estudos, a presença de RIPK3 esteve associada à indução da necroptose, favorecendo o controle da infecção por ZIKV e tendo papel neurotóxico para a ALS. No entanto, ao contrário desses estudos e do que foi observado nas micróglia, RIPK3 não teve papel na resposta do astrócito à infecção pelo *T. cruzi*. A ausência de RIPK3 não alterou a carga parasitária (Figura 11A-B), a secreção de IL-1 β (Figura 11C) nem de NO (Figura 11D).

Por outro lado, surpreendentemente, RIPK1 parece ter importante papel na susceptibilidade dos astrócitos, uma vez que o tratamento com Nec-1 induziu uma drástica redução na carga parasitária, muito similares às aquelas encontradas no início da infecção (2h p.i.) (Figura 12A-B). Existem poucos relatos na literatura acerca de RIPK1 e infecções por protozoários. Um dos estudos mostrou a participação de RIPK1 e a via da necroptose para reduzir a viabilidade da *Leishmania* e o bloqueio da caspase-8 foi benéfica para o conter o parasita (155). Outro estudo, também com *Leishmania*, observou que este parasita consegue diminuir a transcrição dos genes da necroptose, sugerindo que este seja o mecanismo pelo qual o parasita evada a resposta imune e consiga estabelecer a infecção (195). Em ambos estudos a presença de RIPK1 foi crucial para conter a infecção ou ainda, quando esta molécula era *down-regulada* levava à piora da doença. No atual trabalho observamos que a presença de RIPK1 é relacionada ao pior controle, ou seja, a sua ausência foi associada ao quadro de melhor controle do parasita, sendo assim o contrário do que se tem descrito na literatura para outros

protozoários ainda que estes trabalhos prévios não tenham sido feitos em astrócitos e nem observado a infecção pelo *T. cruzi*.

Consistente com os dados que demonstram que RIPK1 pode induzir a produção de danos mitocondriais que favoreceriam a ativação dos inflamassomas (197,227), verificamos que o tratamento com Nec-1 inibiu a secreção de IL-1 β em resposta ao *T. cruzi* (Figura 12C). Assim como observado nas micróglia, apesar da modulação da secreção de IL-1 β sugerir um efeito de RIPK1 nos inflamassomas, o controle da infecção conferido por Nec-1 foi independente das moléculas NLRC4 e NLRP3 (Figura 12F), uma vez que as células deficientes para tais moléculas, tiveram a carga parasitária significativamente reduzidas como na células WT.

Tem crescido na literatura os estudos que integram análises metabólicas das células e seus impactos no desfecho inflamatório de uma condição de saúde (228). Essas mudanças, num contexto de interação patógeno-hospedeiro, podem ser determinantes para a sobrevivência do patógeno, principalmente aqueles intracelulares obrigatórios (229). Nesse sentido, entender a co-evolução de patógeno e hospedeiro é fundamental pois certas mudanças podem acontecer em resposta ao parasita ou podem ser induzidas pelo próprio parasita (230), e entender estes mecanismos pode permitir o desenvolvimento de fármacos ou maneiras de interferir nestas vias, permitindo melhoras no tratamento das patologias. Nesse sentido, buscamos entender o perfil metabólico de micróglia e astrócitos infectados por *T. cruzi*, analisando dois metabólitos relevantes para estas células: lactato e glutamato. O lactato é um metabólito frequentemente utilizado para troca entre essas duas células gliais e o neurônio, sendo uma fonte de energia externa deste último (231). Essa molécula é bastante versátil na maneira que pode fornecer energia para a célula: pode participar tanto da glicólise, quanto da via das pentoses fosfato (*Pentose-Phosphate Pathway*; PPP) como também do ciclo do ácido cítrico (TCA). Sendo assim é esperado que a célula mantenha certa quantidade de lactato intracelular, mesmo sendo uma maneira bastante eficiente de fornecer suporte energético para os neurônios em certos contextos. No presente estudo foi possível observar que a infecção pelo *T. cruzi* não alterou o perfil de lactato secretado por ambas as células (Figura 9A e 13A) bem como o tratamento com Nec-1 não alterou esta secreção (Figura 9B e 13B). Sendo assim, ainda são necessárias maiores investigações sobre o papel do lactato nestas células em resposta a infecção, mas aponta que o *T. cruzi* não desregule a secreção deste metabólito e sugere que a inibição de RIPK1 favoreça o controle de maneira independente das vias metabólicas que geram lactato.

Ao analisarmos o glutamato, observamos mais uma vez, que a infecção pelo *T. cruzi* não altera sua secreção nestas células gliais (Figura 9C e 13C). No entanto, vemos que nas micróglia,

a ausência de NLRC4 somada à perturbação celular da infecção pelo *T. cruzi* induziu um significativo aumento deste metabólito (Figura 9C). No astrócito, em ambas as células nocautes para NLRP3 ou NLRC4, após estímulo com *T. cruzi*, também foram observados altos níveis desse metabólito (Figura 13C), o que pode estar relacionado à maior secreção ou menor recaptação do mesmo. O glutamato participa de diversas reações no SNC, desde funcionar como neurotransmissor de neurônios excitatórios até podendo ser neurotóxico dependendo da sua concentração. Na região intracelular, contribui como substrato para vias do metabolismo energético da célula. Por isso ele precisa ser bem regulado e para isso é muito importante a função dos astrócitos de reabsorver o excesso de glutamato presente no meio extracelular (231). Intracelular, o glutamato pode participar do TCA, sob a forma de α -cetoglutarato; é indispensável na biossíntese de aminoácidos; e participa de diversas outras vias como na glicosilação de outras moléculas (232,233). Sabemos que em resposta à Nigericina os astrócitos são capazes de responder secretando altas concentrações de IL-1 β e NO (115), sendo então nosso controle positivo para uma perturbação citosólica suficiente para ativar os astrócitos. Dessa forma, é possível inferir que os inflamassomas tem maior impacto modulando o perfil metabólico destas células, impactando conseqüentemente a capacidade de cada uma dessas células em responder a infecção pelo *T. cruzi*, permitindo o controle, ou não, da infecção.

Alguns substratos da via do TCA já foram correlacionados com o maior ou menor perfil inflamatório que uma célula possui (principalmente células do sistema imune). O acúmulo de succinato, induz a transcrição de HIF-1 α , um importante fator de transcrição da IL-1 β (199). O itaconato, por sua vez um substrato derivado do aconitato, tem ação inibitória sobre a succinato desidrogenase e em contrapartida, inibe genes inflamatórios através do fator de transcrição ATF3 (200). Durante a infecção por *T. cruzi*, alguns desses substratos também são deslocados. Koo e colaboradores descreveram que macrófagos infectados pelo *T. cruzi* têm a via da glicólise diminuída e que, estimular a PPP com análogos farmacológicos, favorece o controle da infecção (234). De fato o *T. cruzi* é capaz de induzir o acúmulo de succinato em macrófagos (235) além de possuir uma enzima, chamada cruzipaina, que promove a ação da arginase, uma enzima envolvida na produção de NO (236).

É importante notar que a maioria dos trabalhos que analisam o imunometabolismo levam em conta principalmente células imunes (linfócitos, macrófagos, células dendríticas) e por isso não há muita investigação a respeito dos efeitos do metabolismo nas respostas “imunes” de outras células como os astrócitos. Por outro lado, existem diversos estudos que mostram como desbalanço hormonal, de neurotransmissores ou mal-funcionamento das células gliais podem levar à distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos (179,237). Nesse sentido um estudo

recente do grupo da Dra. Christina Peixoto mostrou as similaridades entre pacientes com depressão e pacientes da DC (238). Os autores apontam diversos mecanismos comuns entre as duas doenças, como os o metabolismo do triptofano, que tem impacto na síntese de serotonina (neurotransmissor em falta nos pacientes depressivos) e na resolução da infecção; o estresse oxidativo presente nas células neuronais dos casos de depressão e também das células infectadas pelo *T. cruzi*; e por último níveis de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , decorrente da infecção e que também é presente nos pacientes com depressão (238). Ademais vale ressaltar que desbalanços metabólicos como de glutamato ou outros metabólitos, podem afetar o SNC mesmo que a infecção não ocorra no parênquima do tecido nervoso. A comunicação que hormônios e neurotransmissores podem ter em praticamente todas as células do corpo nem sempre se limita à proximidade ou co-localização de duas células do mesmo tecido. Muitas moléculas produzidas em nosso intestino decorrente da interação com a microbiota podem atingir o SNC e vice-versa, além de também ter efeitos em outros tecidos do indivíduo (239). O grupo da Dra. Joseli Vieira e colaboradores já demonstrou que o *T. cruzi* pode induzir mudanças comportamentais semelhantes a comportamentos depressivos independente da presença do parasita no parênquima cerebral (240,241) e também que o tratamento com benznidazol consegue reverter os impactos na memória que esta infecção altera, através da redução de estresse oxidativo nas células nervosas (242).

Por fim, no presente estudo não foi avaliado diretamente o impacto da infecção por *T. cruzi* na transcrição destas células, mas através da análise de dados depositados em banco de dados de sequenciamento, foi possível observar que o *T. cruzi* induz, em células cardíacas, o aumento da transcrição de RIPK1, Caspase-1 e IL-1 β , IL-1 α (dados não mostrados) (referência GSE41089 e GSE41089). Em uma revisão recente, Dr. Jaramillo e colaboradores observaram que a mudança do transcriptoma entre células não infectadas e células infectadas por *T. cruzi*, as moléculas mais significativamente alteradas são relacionadas à resposta a vírus e algumas citocinas anti-inflamatórias (243). Nesse sentido, seria importante analisar as mudanças metabólicas e transcricionais que o *T. cruzi* é capaz de induzir nas células hospedeiras, particularmente em astrócitos e micróglia, buscando entender se este parasita é capaz de evadir as respostas destas células (especialmente dos astrócitos), visando encontrar mecanismos eficazes para o controle da infecção que possam ser futuramente acessados através de fármacos ou outros tratamentos.

6. Conclusão

Sendo assim, concluímos que:

- 1) NLRC4 está envolvido na resposta das micróglia à infecção pelo *T. cruzi* por um mecanismo relacionado à indução da secreção de IL-1 β e NO.
- 2) Na ausência de NLRC4, mas não de NLRP3, há uma alta concentração de glutamato nas culturas de micróglia infectadas com *T. cruzi*.
- 3) NLRC4 participa da capacidade tripanocida de astrócitos por um mecanismo relacionado à inibição de NO e glutamato.
- 4) RIPK3 inibe a capacidade tripanocida de micróglia por um mecanismo não relacionado à secreção de NO e não tem papel em astrócitos.
- 5) RIPK1 inibe o controle da infecção do *T. cruzi* em micróglia e astrócitos, através de um mecanismo independente de perda celular, secreção de NO e da presença dos inflamassomas.

Referências

1. Jurberg C. Chagas: one hundred years later. Vol. 87, Bulletin of the World Health Organization. 2009. p. 491–2.
2. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. [cited 2021 May 31]. Available from: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1
3. Andrade LO, Andrews NW. The Trypanosoma cruzi –host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol 2005 310 [Internet]. 2005 Sep 9 [cited 2021 Jul 12];3(10):819–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1249>
4. Kratz JM, Gonçalves KR, Romera L, Moraes CB, Bittencourt-cunha P, Schenkman S, et al. The translational challenge in Chagas disease drug development. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2021 [cited 2021 May 31];116:1–11. Available from: <https://memorias.ioc.fiocruz.br/article/10809/0501-chagas-the-translational-challenge-in-chagas-disease-drug-development>
5. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis) [Internet]. [cited 2021 May 31]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
6. Coura JR, Vías PA. Chagas disease: A new worldwide challenge. Nature. 2010.
7. Albajar-Viñas P, Jannin J. The hidden chagas disease burden in Europe. Vol. 16, Eurosurveillance. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2011. p. 19975.
8. Distribuição DC global [Internet]. [cited 2021 Jul 12]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2
9. Sardinha Mendes FS, Perez-molina JA, Angheben A, Meymandi SK, Sosa-estani S, Molina I. Critical analysis of Chagas disease treatment in different countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2021;116(February):1–9.
10. DNDi. Acesso Chagas: A experiência-piloto na Colômbia.
11. NOVOS CAMINHOS PARA A ELIMINAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS EM MEIO À COVID-19 [Internet]. [cited 2021 May 31]. Available from: www.youtube.com/watch?v=RnuHnaMkTM8
12. Da JR, Camargos MERS, Chiari E, Machado CRS. Trypanosoma cruzi infection and the rat

- central nervous system: Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull.* 2000;
13. Pittella JEH. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. Vol. 103, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2009. p. 973–8.
 14. Villela E, Villela E. Elementos do sistema nervoso central parasitados pelo *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1932;26(1):77–81.
 15. Pittella JE. Central nervous system involvement in experimental *Trypanosomiasis cruzi*. Vol. 86, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1991. p. 141–5.
 16. Sanabria A. Ultrastructure of *Trypanoma cruzi* in Mouse Brain. 1968;391:379–91.
 17. Morocoima A, Socorro G, Ávila R, Hernández A, Merchán S, Ortiz D, et al. *Trypanosoma cruzi*: Experimental parasitism in the central nervous system of albino mice. *Parasitol Res [Internet].* 2012 Nov 7 [cited 2021 Jun 3];111(5):2099–107. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-012-3057-9>
 18. Pérez-Molina J, Rodríguez-Guardado A, Soriano A, Pinazo MJ, Carrilero B, García-Rodríguez M, et al. Guidelines on the treatment of chronic coinfection by *trypanosoma cruzi* and HIV outside endemic areas. *HIV Clin Trials.* 2011;12(6):287–98.
 19. Fernández ML, Marson ME, Mastrantonio GE, Corti MA, Fleitas U, Lloveras SC, et al. Benznidazole in cerebrospinal fluid: A case series of chagas disease meningoencephalitis in hiv-positive patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Mar 1;65(3).
 20. Stauffert D, Silveira MF da, Mesenburg MA, Manta AB, Dutra A da S, Bicca GL de O, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*/HIV coinfection in southern Brazil. *Brazilian J Infect Dis.* 2017 Mar 1;21(2):180–4.
 21. de Almeida EA, Ramos AN, Correia D, Shikanai-Yasuda MA. Coinfecção *Trypanosoma cruzi*/HIV: Revisão sistemática (1980 - 2010). Vol. 44, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - SBMT; 2011. p. 762–70.
 22. Zaidel EJ, Forsyth CJ, Novick G, Marcus R, Ribeiro ALP, Pinazo MJ, et al. COVID-19: Implications for People with Chagas Disease [Internet]. Vol. 15, *Global Heart.* Ubiquity Press; 2020 [cited 2021 Jun 2]. Available from: </pmc/articles/PMC7566506/>

23. Alberca RW, Yendo TM, Ramos YAL, Fernandes IG, De Mendonça Oliveira L, Teixeira FME, et al. Case report: COVID-19 and chagas disease in two coinfecting patients. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Jun 2];103(6):2353–6. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas->
24. Córdova E, Maiolo E, Corti M, Orduña T. Neurological manifestations of Chagas' disease. Vol. 32, *Neurological Research*. 2010. p. 238–44.
25. de Oliveira Santos E, dos Reis Canela J, Gomes Monção HC, Guedes Roque MJ. Reactivation of Chagas' disease leading to the diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome. *Braz J Infect Dis*. 2002;6(6):317–21.
26. Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality related to Chagas disease and HIV/AIDS coinfection in Brazil. *J Trop Med* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jun 8];2012. Available from: </pmc/articles/PMC3434406/>
27. Vilar-Pereira G, Silva AA da, Pereira IR, Silva RR, Moreira OC, de Almeida LR, et al. Trypanosoma cruzi-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. *Brain Behav Immun*. 2012;26(7):1136–49.
28. Yasukawa K, Patel SM, Flash CA, Stager CE, Goodman JC, Woc-Colburn L. Trypanosoma cruzi meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2014;91(1):84–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4080575&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Jones JL, Hanson DL, Chu SY, Ciesielski CA, Kaplan JE, Ward JW, et al. Toxoplasmic encephalitis in HIV-infected persons: risk factors and trends. The Adult/Adolescent Spectrum of Disease Group. *AIDS*. 1996;10(12):1393–1399.
30. Jaén RI, Val-Blasco A, Prieto P, Gil-Fernández M, Smani T, López-Sendón JL, et al. Innate Immune Receptors, Key Actors in Cardiovascular Diseases. Vol. 5, *JACC: Basic to Translational Science*. Elsevier Inc; 2020. p. 735–49.
31. Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens [Internet]. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2013 [cited 2021 Jun 18]. p. 551–65. Available from: www.nature.com/reviews/immunol

32. Kawai T, Akira S. TLR signaling [Internet]. Vol. 13, Cell Death and Differentiation. Cell Death Differ; 2006 [cited 2021 Jun 18]. p. 816–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16410796/>
33. O’Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling [Internet]. Vol. 7, Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group; 2007 [cited 2021 Jun 18]. p. 353–64. Available from: www.nature.com/reviews/immunol
34. Geddes K, Magalhães JG, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. Nat Rev Drug Discov 2009 86 [Internet]. 2009 [cited 2021 Jul 12];8(6):465–79. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd2783>
35. Lu F, Lan Z, Xin Z, He C, Guo Z, Xia X, et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases. J Cell Physiol. 2020 Apr 1;235(4):3207–21.
36. Inohara N, Núñez G. NODS: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis [Internet]. Vol. 3, Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group; 2003 [cited 2021 Jun 18]. p. 371–82. Available from: www.nature.com/reviews/immunol
37. Ting JP-Y, Davis BK. CATERPILLER: A Novel Gene Family Important in Immunity, Cell Death, and Diseases. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115616> [Internet]. 2004 Nov 19 [cited 2021 Jul 12];23:387–414. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115616>
38. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome. Nat Genet 2001 293 [Internet]. 2001 Oct 22 [cited 2021 Jul 12];29(3):301–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng756z>
39. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . Mol Cell. 2002 Aug 1;10(2):417–26.
40. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. Nature Reviews Immunology. 2016.

41. Swanson K V., Deng M, Ting JP-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 2019 198 [Internet]. 2019 Apr 29 [cited 2021 Jul 12];19(8):477–89. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-019-0165-0>
42. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Vol. 140, *Cell*. 2010. p. 821–32.
43. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* [Internet]. 2015;526(7575):666–71. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature15541>
44. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* [Internet]. 2015;526(7575):660–5. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature15514>
45. Ciężyńska M, Olejniczak-Staruch I, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. The Role of NLRP1, NLRP3, and AIM2 Inflammasomes in Psoriasis: Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 May 31 [cited 2021 Jun 21];22(11):5898. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/5898>
46. Sharma BR, Kanneganti TD. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases [Internet]. Vol. 22, *Nature Immunology*. Nature Research; 2021 [cited 2021 Jun 21]. p. 550–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33707781/>
47. Bhaduri-McIntosh S, McIntosh M. Inflammasome, the Constitutive Heterochromatin Machinery, and Replication of an Oncogenic Herpesvirus. *Viruses* [Internet]. 2021 May 6 [cited 2021 Jun 21];13(5):846. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34066537/>
48. Faria SS, Costantini S, de Lima VCC, de Andrade VP, Rialland M, Cedric R, et al. NLRP3 inflammasome-mediated cytokine production and pyroptosis cell death in breast cancer [Internet]. Vol. 28, *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd; 2021 [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33840390/>
49. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol* [Internet]. 2008;9(8):857–65. Available from:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1636>

50. Yu JR, Leslie KS. Cryopyrin-associated periodic syndrome: An update on diagnosis and treatment response. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2011 Feb [cited 2021 Jun 18];11(1):12–20. Available from: </pmc/articles/PMC3020304/>
51. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* [Internet]. 2009 Oct 5 [cited 2021 Jun 18];187(1):61–70. Available from: www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200903124
52. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Sep 21 [cited 2021 Jun 18];377(12):1119–31. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1707914>
53. Tegtmeier K, Atassi G, Zhao J, Maloney NJ, Lio PA. Off-Label studies on anakinra in dermatology: a review [Internet]. *Journal of Dermatological Treatment*. Taylor and Francis Ltd; 2020 [cited 2021 Jun 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32279586/>
54. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(2):136–40. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1831>
55. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* [Internet]. 2006;440(7081):237–41. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature04516>
56. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Pétrilli V, et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(10):903–13.
57. Yue N, Huang H, Zhu X, Han Q, Wang Y, Li B, et al. Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):1–15.
58. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science (80-)* [Internet]. 2008;320(5876):674–7. Available from:

<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1156995>

59. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008;105(26):9035–40. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0803933105>
60. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD. The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 β by Keratinocytes. *Curr Biol*. 2007;17(13):1140–5.
61. Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. Vol. 16, *Current Opinion in Microbiology*. 2013. p. 23–31.
62. Lupfer C, Kanneganti TD. The expanding role of NLRs in antiviral immunity. Vol. 255, *Immunological Reviews*. 2013. p. 13–24.
63. Joly S, Sutterwala FS. Fungal pathogen recognition by the NLRP3 inflammasome. *Virulence*. 2010;1(4):276–80.
64. Clay GM, Sutterwala FS, Wilson ME. NLR proteins and parasitic disease. Vol. 59, *Immunologic Research*. 2014. p. 142–52.
65. Gonçalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, et al. NLRP3 Controls Trypanosoma cruzi Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10).
66. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, Mineo TWP, et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nat Med* 2013 197 [Internet]. 2013 Jun 9 [cited 2021 Jul 12];19(7):909–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.3221>
67. Seoane PI, Lee B, Hoyle C, Yu S, Lopez-Castejon G, Lowe M, et al. The NLRP3-inflammasome as a sensor of organelle dysfunction [Internet]. Vol. 219, *The Journal of cell biology*. NLM (Medline); 2020 [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.202006194>
68. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith B, Rajendiran T, Núñez G. K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142–53.

69. Gov L, Schneider CA, Lima TS, Pandori W, Lodoen MB. NLRP3 and Potassium Efflux Drive Rapid IL-1 β Release from Primary Human Monocytes during *Toxoplasma gondii* Infection. J Immunol [Internet]. 2017;ji1700245. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1700245>
70. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. Nature. 2016;
71. Clapham DE. Calcium Signaling [Internet]. Vol. 131, Cell. Elsevier B.V.; 2007 [cited 2021 Jun 28]. p. 1047–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18083096/>
72. Horng T. Calcium signaling and mitochondrial destabilization in the triggering of the NLRP3 inflammasome. Vol. 35, Trends in Immunology. 2014. p. 253–61.
73. Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2012;109(28):11282–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3396518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
74. Lee GS, Subramanian N, Kim AI, Akseptijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. Nature. 2012.
75. Zhang Y, Rong H, Zhang FX, Wu K, Mu L, Meng J, et al. A Membrane Potential- and Calpain-Dependent Reversal of Caspase-1 Inhibition Regulates Canonical NLRP3 Inflammasome. Cell Rep [Internet]. 2018 Aug 28 [cited 2021 Jun 28];24(9):2356-2369.e5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30157429/>
76. Gong T, Yang Y, Jin T, Jiang W, Zhou R. Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes [Internet]. Vol. 39, Trends in Immunology. Elsevier Ltd; 2018 [cited 2021 Jun 28]. p. 393–406. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29452983/>
77. Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Induces NLRP3-Dependent Lysosomal Damage and Inflammasome Activation. J Immunol [Internet]. 2013 Nov 15 [cited 2021 Jun 28];191(10):5230–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24089192/>
78. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy

- proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2011;
79. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity.* 2012;36(3):401–14.
 80. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* [Internet]. 2011 Jan 13 [cited 2021 Jun 28];469(7329):221–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature09663>
 81. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* [Internet]. 2013 May 17 [cited 2021 Jun 28];14(5):454–60. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.2550>
 82. Shi H, Wang Y, Li X, Zhan X, Tang M, Fina M, et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol.* 2016;
 83. Yu J, Nagasu H, Murakami T, Hoang H, Broderick L, Hoffman HM, et al. Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Oct 28 [cited 2021 Jun 28];111(43):15514–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25313054/>
 84. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* [Internet]. 2008;9(8):847–56. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.1631>
 85. Chu J, Thomas LM, Watkins SC, Franchi L, Núñez G, Salter RD. Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 β from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. *J Leukoc Biol.* 2009;
 86. Zaiss AK, Vilaysane A, Cotter MJ, Clark SA, Meijndert HC, Colarusso P, et al. Antiviral Antibodies Target Adenovirus to Phagolysosomes and Amplify the Innate Immune Response. *J Immunol.* 2009;
 87. Terada K, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z, Uchiyama Y, Peters C, et al. Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 β in chromogranin a-

- stimulated microglia. *Glia* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jun 28];58(1):114–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19544382/>
88. Campden RI, Zhang Y. The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation [Internet]. Vol. 670, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc.; 2019 [cited 2021 Jun 28]. p. 32–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30807742/>
 89. Sun L, Wu Z, Hayashi Y, Peters C, Tsuda M, Inoue K, et al. Microglial cathepsin B contributes to the initiation of peripheral inflammation-induced chronic pain. *J Neurosci* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2021 Jun 28];32(33):11330–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22895716/>
 90. Orłowski GM, Colbert JD, Sharma S, Bogoy M, Robertson SA, Rock KL. Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 β Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 β Activation. *J Immunol* [Internet]. 2015;195(4):1685–97. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1500509>
 91. Duncan JA, Canna SW. The NLRC4 Inflammasome [Internet]. Vol. 281, *Immunological reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2018 [cited 2021 Jun 28]. p. 115–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.12607>
 92. Broz P, Moltke J von, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2010 Dec 16 [cited 2021 Jul 12];8(6):471–83. Available from: <http://www.cell.com/article/S193131281000380X/fulltext>
 93. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* [Internet]. 2011 Sep 29 [cited 2021 Jun 28];477(7366):596–602. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21918512/>
 94. Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* [Internet]. 2011 Sep 29 [cited 2021 Jun 28];477(7366):592–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21874021/>
 95. Valeria MRR, Ramirez J, Naseer N, Palacio NM, Siddarthan IJ, Yan BM, et al. Broad detection of bacterial type III secretion system and flagellin proteins by the human NAIP/NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2017 Dec 12 [cited

- 2021 Jun 28];114(50):13242–7. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29180436/>
96. Kortmann J, Brubaker SW, Monack DM. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. *J Immunol* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2021 Jun 28];195(3):815–9. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26109648/>
 97. Sundaram B, Kanneganti TD. Advances in understanding activation and function of the NLRC4 inflammasome. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Jun 28];22(3):1–12. Available from: [/pmc/articles/PMC7864484/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3544484/)
 98. Lage SL, Longo C, Branco LM, da Costa TB, Buzzo C de L, Bortoluci KR. Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. 2014.
 99. Semper RP, Vieth M, Gerhard M, Mejías-Luque R. Helicobacter pylori Exploits the NLRC4 Inflammasome to Dampen Host Defenses . *J Immunol* [Internet]. 2019 Oct 15 [cited 2021 Jun 28];203(8):2183–93. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31511355/>
 100. Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, Hall BA, et al. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Dec [cited 2021 Jun 28];7(12). Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22174673/>
 101. Janowski AM, Colegio OR, Hornick EE, McNiff JM, Martin MD, Badovinac VP, et al. NLRC4 suppresses melanoma tumor progression independently of inflammasome activation. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Oct 3 [cited 2021 Jun 28];126(10):3917–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27617861/>
 102. Karki R, Kanneganti TD. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting [Internet]. Vol. 19, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2021 Jun 28]. p. 197–214. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30842595/>
 103. Kolb R, Phan L, Borchering N, Liu Y, Yuan F, Janowski AM, et al. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Oct 6 [cited 2021 Jun 28];7. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27708283/>

104. Lopes AH, Talbot J, Silva RL, Lima JB, França RO, Verri WA, et al. Peripheral NLR4 inflammasome participates in the genesis of acute inflammatory pain. *Pain* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 Jun 29];156(3):451–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25687541/>
105. Canna SW, De Jesus AA, Gouni S, Brooks SR, Marrero B, Liu Y, et al. An activating NLR4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet* [Internet]. 2014 Sep 26 [cited 2021 Jun 28];46(10):1140–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25217959/>
106. Kitamura A, Sasaki Y, Abe T, Kano H, Yasutomo K. An inherited mutation in NLR4 causes autoinflammation in human and mice. *J Exp Med* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 28];211(12):2385–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25385754/>
107. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions [Internet]. Vol. 165, *Cell*. Cell Press; 2016 [cited 2021 Jun 11]. p. 792–800. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.046>
108. Von Moltke J, Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, Van Rooijen N, et al. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature*. 2012;490(7418):107–11.
109. Shao W, Yeretssian G, Doiron K, Hussain SN, Saleh M. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Dec 14 [cited 2021 Jun 29];282(50):36321–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17959595/>
110. Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 Activation of Lipid Metabolic Pathways in Response to Bacterial Pore-Forming Toxins Promotes Cell Survival. *Cell* [Internet]. 2006 Sep 22 [cited 2021 Jun 29];126(6):1135–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16990137/>
111. Kotas ME, Jurczak MJ, Annicelli C, Gillum MP, Cline GW, Shulman GI, et al. Role of caspase-1 in regulation of triglyceride metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Mar 19 [cited 2021 Jun 29];110(12):4810–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23487794/>
112. Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, et al. A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *J Biol*

- Chem. 2010;285(42):32087–95.
113. Buzzo C de L, Medina T, Branco LM, Lage SL, Ferreira LC de S, Amarante-Mendes GP, et al. Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(February):41686. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep41686>
 114. Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Vol. 62, Infection and Immunity*. 1994. p. 5177–82.
 115. Pacheco AL, Vicentini G, Matteucci KC, Ribeiro RR, Weinlich R, Bortoluci KR. The impairment in the NLRP3-induced NO secretion renders astrocytes highly permissive to *T. cruzi* replication. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2019;(March):JLB.4AB1118-416RR. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/JLB.4AB1118-416RR>
 116. Weinlich R, Dillon CP, Green DR. Ripped to death. *Trends in Cell Biology*. 2011.
 117. Wallach D, Kang TB, Dillon CP, Green DR. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science*. 2016.
 118. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Jan 30 [cited 2021 Jun 29];370(5):455–65. Available from: </pmc/articles/PMC4035222/>
 119. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 2000;
 120. Schock SN, Chandra N V., Sun Y, Irie T, Kitagawa Y, Gotoh B, et al. Induction of necroptotic cell death by viral activation of the RIG-I or STING pathway. *Cell Death Differ* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 Jun 29];24(4):615–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28060376/>
 121. Brault M, Olsen TM, Martinez J, Stetson DB, Oberst A. Intracellular Nucleic Acid Sensing Triggers Necroptosis through Synergistic Type I IFN and TNF Signaling. *J Immunol* [Internet]. 2018 Apr 15 [cited 2021 Jun 29];200(8):2748–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29540580/>
 122. Berghe T Vanden, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014.

123. Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 1999;
124. Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu D e., Hoti N, et al. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal.* 2007;
125. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell.* 2009;
126. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell.* 2009;
127. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell.* 2012;
128. Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity.* 2013;
129. Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, Choksi S, Li Q, Luo J, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;
130. Chen W, Zhou Z, Li S, Zhong CQ, Zheng X, Wu X, et al. Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling. *J Biol Chem.* 2013;
131. Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol.* 2014;
132. Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, et al. MLKL Compromises Plasma Membrane Integrity by Binding to Phosphatidylinositol Phosphates. *Cell Rep.* 2014;
133. Su Z, Yang Z, Xie L, DeWitt JP, Chen Y. Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death Differ* 2016 235 [Internet]. 2016 Feb 26 [cited 2021 Jul 15];23(5):748–56. Available from: <https://www.nature.com/articles/cdd20168>
134. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell*

- Host Microbe. 2010;
135. Wang X, Jiang W, Yan Y, Gong T, Han J, Tian Z, et al. RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2014;
 136. Gaiha GD, McKim KJ, Woods M, Pertel T, Rohrbach J, Barteneva N, et al. Dysfunctional HIV-specific CD8+ T cell proliferation is associated with increased caspase-8 activity and mediated by necroptosis. *Immunity.* 2014;
 137. Philip NH, Dillon CP, Snyder AG, Fitzgerald P, Wynosky-Dolfi MA, Zwack EE, et al. Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF- B and MAPK signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;
 138. Weng D, Marty-Roix R, Ganesan S, Proulx MK, Vladimer GI, Kaiser WJ, et al. Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;
 139. Li S, Zhang L, Yao Q, Li L, Dong N, Rong J, et al. Pathogen blocks host death receptor signalling by arginine GlcNAcylation of death domains. *Nature.* 2013;
 140. Robinson N, McComb S, Mulligan R, Dudani R, Krishnan L, Sad S. Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Immunol.* 2012;
 141. Autheman D, Wyder M, Popoff M, D'Herde K, Christen S, Posthaus H. Clostridium perfringens Beta-Toxin Induces Necrostatin-Inhibitible, Calpain-Dependent Necrosis in Primary Porcine Endothelial Cells. *PLoS One.* 2013;
 142. Roca FJ, Ramakrishnan L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell.* 2013;
 143. Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al. Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. *J Immunol [Internet].* 2001;167(1):416–23. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.167.1.416>
 144. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol [Internet].* 2006;177(6):3515–9. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.6.3515>

145. Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, et al. TLR-Dependent Induction of IFN- Mediates Host Defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 2014;
146. Oliveira A-C, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al. Expression of Functional TLR4 Confers Proinflammatory Responsiveness to *Trypanosoma cruzi* Glycoinositolphospholipids and Higher Resistance to Infection with *T. cruzi*. *J Immunol* [Internet]. 2004;173(9):5688–96. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.9.5688>
147. Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, Cerny A, dos Santos SL, Bartholomeu DC, et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* [Internet]. 2011;187(4):1903–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3150366&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
148. Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, et al. Impaired Production of Proinflammatory Cytokines and Host Resistance to Acute Infection with *Trypanosoma cruzi* in Mice Lacking Functional Myeloid Differentiation Factor 88. *J Immunol*. 2014;
149. Silva GK, Gutierrez FRS, Guedes PMM, Horta C V., Cunha LD, Mineo TWP, et al. Cutting Edge: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Responses Account for Murine Resistance against *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2021 Jul 12];184(3):1148–52. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/184/3/1148>
150. Silva GK, Costa RS, Silveira TN, Caetano BC, Horta CV, Gutierrez FRS, et al. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1 β Response and Host Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* [Internet]. 2013 Sep 15 [cited 2021 Apr 29];191(6):3373–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23966627/>
151. Clipman SJ, Henderson-Frost J, Fu KY, Bern C, Flores J, Gilman RH. Genetic association study of NLRP1, CARD, and CASP1 inflammasome genes with chronic Chagas cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi* seropositive patients in Bolivia. *PLoS One* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2021 Jun 30];13(2):e0192378. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192378>

152. Medeiros NI, Pinto BF, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Magalhães LMD, Dutra WO, et al. Evidence of Different IL-1 β Activation Pathways in Innate Immune Cells From Indeterminate and Cardiac Patients With Chronic Chagas Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 16];10:800. Available from: [/pmc/articles/PMC6482163/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30154785/)
153. Ganesan S, Rathinam VAK, Bossaller L, Army K, Kaiser WJ, Mocarski ES, et al. Caspase-8 Modulates Dectin-1 and Complement Receptor 3–Driven IL-1 β Production in Response to β -Glucans and the Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *J Immunol* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2021 Jun 30];193(5):2519–30. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/193/5/2519>
154. DeLaney AA, Berry CT, Christian DA, Hart A, Bjanes E, Wynosky-Dolfi MA, et al. Caspase-8 promotes c-Rel–dependent inflammatory cytokine expression and resistance against *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;
155. Barbosa LA, Fiuza PP, Borges LJ, Rolim FA, Andrade MB, Luz NF, et al. RIPK1-RIPK3-MLKL-associated necroptosis drives *Leishmania infantum* killing in neutrophils. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Aug 14 [cited 2021 Jun 25];9(AUG). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30154785/>
156. Farias Luz N, Balaji S, Okuda K, Barreto AS, Bertin J, Gough PJ, et al. RIPK1 and PGAM5 Control *Leishmania* Replication through Distinct Mechanisms. *J Immunol* [Internet]. 2016 Jun 15 [cited 2021 Jun 25];196(12):5056–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27183605/>
157. Luz NF, Khouri R, Van Weyenbergh J, Zanette DL, Fiuza PP, Noronha A, et al. *Leishmania braziliensis* Subverts Necroptosis by Modulating RIPK3 Expression. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Sep 28 [cited 2021 Jun 25];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30323793/>
158. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016 Dec;524(18):3865–95.
159. Freeman MR. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. *Science* (80-) [Internet]. 2010;330(6005):774–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1190928>

160. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia [Internet]. Vol. 7, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers; 2013 [cited 2021 Jun 30]. p. 45. Available from: www.frontiersin.org
161. Huang Y, Xu Z, Xiong S, Sun F, Qin G, Hu G, et al. Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat Neurosci* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 Jul 3];21(4):530–40. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0090-8>
162. Fügen P, Hefendehl JK, Veeraraghavalu K, Wendeln AC, Schlosser C, Obermüller U, et al. Microglia turnover with aging and in an Alzheimer’s model via long-term in vivo single-cell imaging. *Nat Neurosci* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Jul 3];20(10):1371–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nn.4631>
163. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Sep 9 [cited 2021 Jul 3];333(6048):1456–8. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/333/6048/1456>
164. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* [Internet]. 2007 Dec 14 [cited 2021 Jul 3];131(6):1164–78. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867407013554/fulltext>
165. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Jul 3];29(13):3974–80. Available from: www.jneurosci.org
166. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* (80-) [Internet]. 2005 May 27 [cited 2021 Jul 3];308(5726):1314–8. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/308/5726/1314>
167. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V., Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* [Internet]. 2005 Jun 15 [cited 2021 Jul 3];8(6):752–8. Available from: <http://www.nature.com/natureneuroscience>

168. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* [Internet]. 2017 Jan 26 [cited 2021 Jul 3];541(7638):481–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature21029>
169. Ji RR, Donnelly CR, Nedergaard M. Astrocytes in chronic pain and itch [Internet]. Vol. 20, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2021 Jul 3]. p. 667–85. Available from: www.nature.com/nrn
170. Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport [Internet]. Vol. 93, *Physiological Reviews*. American Physiological Society Bethesda, MD; 2013 [cited 2021 Jul 3]. p. 1621–57. Available from: www.prv.org
171. Giaume C, McCarthy KD. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. Vol. 19, *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd; 1996. p. 319–25.
172. Haydon PG. Glia: Listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2001 [cited 2021 Jul 3];2(3):185–93. Available from: www.nature.com/reviews/neuro
173. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Vol. 28, *Trends in Immunology*. 2007. p. 138–45.
174. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. Vol. 46, *Immunity*. 2017. p. 957–67.
175. Liddelow SA, Sofroniew M V. Astrocytes usurp neurons as a disease focus. *Nat Neurosci* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Jul 3];22(4):512–3. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0362-y>
176. Hanamsagar R, Aldrich A, Kielian T. Critical role for the AIM2 inflammasome during acute CNS bacterial infection. *J Neurochem*. 2014;129(4):704–11.
177. Jamilloux Y, Pierini R, Querenet M, Juruj C, Fauchais AL, Jauberteau MO, et al. Inflammasome activation restricts *Legionella pneumophila* replication in primary microglial cells through flagellin detection. *Glia*. 2013;61(4):539–49.
178. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol*. 2008;9(8):857–65.
179. Pajarillo E, Rizor A, Lee J, Aschner M, Lee E. The role of astrocytic glutamate

- transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. Vol. 161, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 107559.
180. Sofroniew M V., Vinters H V. Astrocytes: Biology and pathology. Vol. 119, *Acta Neuropathologica*. 2010. p. 7–35.
181. Samartino CG, Delpino MV, Godoy CP, Di Genaro MS, Pasquevich KA, Zwerdling A, et al. *Brucella abortus* induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis. *Am J Pathol* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2021 Jul 2];176(3):1323–38. Available from: <http://ajp.amjpathol.org/article/S0002944010604440/fulltext>
182. Marim FM, Franco MMC, Gomes MTR, Miraglia MC, Giambartolomei GH, Oliveira SC. The role of NLRP3 and AIM2 in inflammasome activation during *Brucella abortus* infection. Vol. 39, *Seminars in Immunopathology*. 2017. p. 215–23.
183. Freeman L, Guo H, David CN, Brickey WJ, Jha S, Ting JP-Y. NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *J Exp Med*. 2017;
184. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2005 May 29 [cited 2021 Jul 3];1(2):112–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nchembio711>
185. Daniels BP, Snyder AG, Olsen TM, Orozco S, Oguin TH, Tait SWG, et al. RIPK3 Restricts Viral Pathogenesis via Cell Death-Independent Neuroinflammation. *Cell* [Internet]. 2017 Apr 6 [cited 2021 Jul 3];169(2):301-313.e11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.011>
186. Zelic M, Pontarelli F, Woodworth L, Zhu C, Mahan A, Ren Y, et al. RIPK1 activation mediates neuroinflammation and disease progression in multiple sclerosis. *Cell Rep* [Internet]. 2021 May 11 [cited 2021 Jul 3];35(6). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109112>
187. Zhu J, Yang LK, Wang QH, Lin W, Feng Y, Xu YP, et al. NDRG2 attenuates ischemia-induced astrocyte necroptosis via the repression of RIPK1. *Mol Med Rep* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Jul 3];22(4):3103–10. Available from: </pmc/articles/PMC7453600/>

188. Ni Y, Gu WW, Liu ZH, Zhu YM, Rong JG, Kent TA, et al. RIP1K Contributes to Neuronal and Astrocytic Cell Death in Ischemic Stroke via Activating Autophagic-lysosomal Pathway. *Neuroscience*. 2018 Feb 10;371:60–74.
189. Moriwaki K, Chan FKM. Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation. Vol. 25, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd; 2014. p. 167–74.
190. Place DE, Lee SJ, Kanneganti TD. PANoptosis in microbial infection. Vol. 59, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 42–9.
191. Brewer GJ, Torricelli JR. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat Protoc* [Internet]. 2007;2(6):1490–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2007.207>
192. Samidurai M, Tarale P, Janarthanam C, Estrada CG, Gordon R, Zenitsky G, et al. Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK) Enhances Activation of STAT3/NLRC4 Inflammasome Signaling Axis through PKC δ in Astrocytes: Implications for Parkinson's Disease. *Cells* [Internet]. 2020 Aug 4 [cited 2021 Jul 5];9(8):1831. Available from: www.mdpi.com/journal/cells
193. Liu L, Chan C. IPAF inflammasome is involved in interleukin-1 β production from astrocytes, induced by palmitate; implications for Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Feb 1;35(2):309–21.
194. Wen C, Yu Y, Gao C, Qi X, Cardona CJ, Xing Z. RIPK3-Dependent Necroptosis Is Induced and Restricts Viral Replication in Human Astrocytes Infected With Zika Virus. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 Mar 16 [cited 2021 Jul 2];11:1. Available from: [/pmc/articles/PMC8007970/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.6807970)
195. Luz NF, Khouri R, Van Weyenbergh J, Zanette DL, Fiuza PP, Noronha A, et al. Leishmania braziliensis Subverts Necroptosis by Modulating RIPK3 Expression. *Front Microbiol*. 2018;
196. Barbosa LA, Fiuza PP, Borges LJ, Rolim FA, Andrade MB, Luz NF, et al. RIPK1-RIPK3-MLKL-associated necroptosis drives Leishmania infantum killing in neutrophils. *Front Immunol*. 2018;
197. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* [Internet].

- 2012 Jan 20 [cited 2021 Jul 2];148(1–2):228–43. Available from:
<http://www.cell.com/article/S0092867411014218/fulltext>
198. Speir M, Lawlor KE. RIP-roaring inflammation: RIPK1 and RIPK3 driven NLRP3 inflammasome activation and autoinflammatory disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2021 Jan 1;109:114–24.
199. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-Mcdermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* [Internet]. 2013 Apr 11 [cited 2021 Jul 3];496(7444):238–42. Available from:
<https://www.nature.com/articles/nature11986>
200. Bambouskova M, Potuckova L, Paulenda T, Kerndl M, Mogilenko DA, Lizotte K, et al. Itaconate confers tolerance to late NLRP3 inflammasome activation. *Cell Rep*. 2021 Mar 9;34(10):108756.
201. Silva GK, Costa RS, Silveira TN, Caetano BC, Horta C V., Gutierrez FRS, et al. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1 Response and Host Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* [Internet]. 2013;191(6):3373–83. Available from:
<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1203293>
202. Qu Y, Misaghi S, Newton K, Maltzman A, Izrael-Tomasevic A, Arnott D, et al. NLRP3 recruitment by NLRC4 during *Salmonella* infection. *J Exp Med* [Internet]. 2016 May 30 [cited 2021 Jun 28];213(6):877–85. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27139490/>
203. Man SM, Hopkins LJ, Nugent E, Cox S, Glück IM, Tourlomousis P, et al. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 May 20 [cited 2021 Jul 3];111(20):7403–8. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1402911111
204. De Alencar BCG, Persechini PM, Haolla FA, De Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun* [Internet]. 2009 Oct [cited 2021 Jul 1];77(10):4383–95. Available from:
[/pmc/articles/PMC2747960/](http://pmc/articles/PMC2747960/)

205. Ferreira CP, Cariste LM, Virgílio FDS, Moraschi BF, Monteiro CB, Machado AMV, et al. LFA-1 mediates cytotoxicity and tissue migration of specific CD8+ T cells after heterologous prime-boost vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Oct 13 [cited 2021 Jul 1];8(OCT):1291. Available from: [/pmc/articles/PMC5645645/](#)
206. Moraschi BF, Noronha IH, Ferreira CP, Cariste LM, Monteiro CB, Denapoli P, et al. Rapamycin Improves the Response of Effector and Memory CD8+ T Cells Induced by Immunization With ASP2 of *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 May 25 [cited 2021 Jul 1];11. Available from: [/pmc/articles/PMC8191465/](#)
207. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* (80-). 2009;
208. Sharma M, Gadang V, Jaeschke A. Critical role for mixed-lineage kinase 3 in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2021 Jul 3];82(5):1001–7. Available from: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/82/5/1001>
209. Vince JE, Wong WWL, Gentle I, Lawlor KE, Allam R, O'Reilly L, et al. Inhibitor of Apoptosis Proteins Limit RIP3 Kinase-Dependent Interleukin-1 Activation. *Immunity*. 2012;
210. Chen KW, Lawlor KE, von Pein JB, Boucher D, Gerlic M, Croker BA, et al. Cutting Edge: Blockade of Inhibitor of Apoptosis Proteins Sensitizes Neutrophils to TNF- but Not Lipopolysaccharide-Mediated Cell Death and IL-1 β Secretion. *J Immunol* [Internet]. 2018 May 15 [cited 2021 Jul 1];200(10):3341–6. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/200/10/3341>
211. Lawlor KE, Khan N, Mildenhall A, Gerlic M, Croker BA, D'Cruz AA, et al. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nat Commun*. 2015;
212. Yabal M, Müller N, Adler H, Knies N, Groß CJ, Damgaard RB, et al. XIAP Restricts TNF- and RIP3-Dependent Cell Death and Inflammasome Activation. *Cell Rep*. 2014;
213. Kang TB, Yang SH, Toth B, Kovalenko A, Wallach D. Caspase-8 Blocks Kinase RIPK3-Mediated Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Immunity*. 2013 Jan 24;38(1):27–40.

214. Gurung P, Anand PK, Malireddi RKS, Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Dillon CP, et al. FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes. *J Immunol* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2021 Jul 1];192(4):1835–46. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/192/4/1835>
215. Moriwaki K, Bertin J, Gough PJ, Chan FK-M. A RIPK3–Caspase 8 Complex Mediates Atypical Pro–IL-1 β Processing. *J Immunol*. 2015;
216. Zhang X, Fan C, Zhang H, Zhao Q, Liu Y, Xu C, et al. MLKL and FADD Are Critical for Suppressing Progressive Lymphoproliferative Disease and Activating the NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep*. 2016 Sep 20;16(12):3247–59.
217. Da JR, Camargos MERS, Chiari E, Machado CRS. Trypanosoma cruzi infection and the rat central nervous system: Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull*. 2000 Sep 15;53(2):153–62.
218. Sanabria A. Ultrastructure of Trypanosoma cruzi in mouse brain. *Exp Parasitol*. 1968 Dec 1;23(3):379–91.
219. Vargas-Zambrano JC, Lasso P, Cuellar A, Puerta CJ, González JM. A human astrocytoma cell line is highly susceptible to infection with Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 3];108(2):212–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23579802/>
220. Silva RR, Mariante RM, Silva AA, Dos Santos ALB, Roffê E, Santiago H, et al. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by Trypanosoma cruzi. *PLoS One*. 2015;10(2).
221. Silva, Andrea AlicSilva, A. A., Silva, R. R., Gibaldi, D., Mariante, R. M., dos Santos, J. B., Pereira, I. R., ... Lannes-Vieira J (2017). P astrocytes with T enhances their susceptibility to T cruzi infection and creates a self-sustaining inflammatory milieu. *J of N* <https://doi.org/10.1186/s1297.-017-0952-0e>, Silva RR, Gibaldi D, Mariante RM, dos Santos JB, Pereira IR, et al. Priming astrocytes with TNF enhances their susceptibility to Trypanosoma cruzi infection and creates a self-sustaining inflammatory milieu. *J Neuroinflammation*. 2017;
222. Gosselin D, Rivest S. Role of IL-1 and TNF in the brain: Twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. Vol. 21, *Brain, Behavior, and Immunity*. Academic Press; 2007. p. 281–9.
223. Miraglia MC, Scian R, Samartino CG, Barrionuevo P, Rodriguez AM, Ibañez AE, et al.

- Brucella abortus induces TNF- α -dependent astroglial MMP-9 secretion through mitogen-activated protein kinases. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2013 Apr 12 [cited 2021 Jul 2];10(1):1–14. Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/10/1/47>
224. Megale de Almeida-Leite C, da Cunha Galvão LM, Afonso LCC, de Queiróz Cunha F, Arantes RME. Interferon- γ induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Neurobiol Dis*. 2007 Jan 1;25(1):170–8.
225. Urquiza JM, Burgos JM, Ojeda DS, Pascuale CA, Leguizamón MS, Quarleri JF. Astrocyte apoptosis and HIV replication are modulated in host cells coinfecting with *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 Aug 2 [cited 2021 Jul 2];7(AUG):345. Available from: [/pmc/articles/PMC5539089/](http://pmc/articles/PMC5539089/)
226. Dermentzaki G, Politi KA, Lu L, Mishra V, Pérez-Torres EJ, Sosunov AA, et al. Deletion of Ripk3 prevents motor neuron death in Vitro but not in Vivo. *eNeuro* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Jul 2];6(1). Available from: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0308-18.2018>
227. Farias Luz N, Balaji S, Okuda K, Barreto AS, Bertin J, Gough PJ, et al. RIPK1 and PGAM5 Control Leishmania Replication through Distinct Mechanisms. *J Immunol* [Internet]. 2016 Jun 15 [cited 2021 Jul 2];196(12):5056–63. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/196/12/5056><http://www.jimmunol.org/content/196/12/5056.full#ref-list-1>
228. Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: An emerging frontier. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):81–3.
229. Chen JY, Zhou JK, Pan W. Immunometabolism: Towards a Better Understanding the Mechanism of Parasitic Infection and Immunity [Internet]. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021 [cited 2021 Jul 3]. p. 2056. Available from: www.frontiersin.org
230. Moreira D, Estaquier J, Cordeiro-da-Silva A, Silvestre R. Metabolic Crosstalk Between Host and Parasitic Pathogens. *Exp Suppl* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Jul 3];109:421–58. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-74932-7_12
231. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic

- glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Oct 25 [cited 2021 Jul 3];91(22):10625–9. Available from: <https://www.pnas.org/content/91/22/10625>
232. Pallett LJ, Dimeloe S, Sinclair L V, Byrne AJ, Schurich A. A glutamine “tug-of-war”: Targets to manipulate glutamine metabolism for cancer immunotherapy. *Immunother Adv* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Jul 3];1(1). Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
233. Macnamee SE, Liu KE, Gerhard S, Tran CT, Fetter RD, Cardona A, et al. Astrocytic glutamate transport regulates a *Drosophila* CNS synapse that lacks astrocyte ensheathment. *J Comp Neurol*. 2016;524(10):1979–98.
234. Koo S jie, Szczesny B, Wan X, Putluri N, Garg NJ. Pentose phosphate shunt modulates reactive oxygen species and nitric oxide production controlling *Trypanosoma cruzi* in Macrophages. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Feb 16 [cited 2021 Jul 3];9(FEB):16. Available from: www.frontiersin.org
235. Mattos EC, Canuto G, Manchola NC, Magalhães RDM, Crozier TWM, Lamont DJ, et al. Reprogramming of *trypanosoma cruzi* metabolism triggered by parasite interaction with the host cell extracellular matrix. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Jul 3];13(2):e0007103. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007103>
236. Stempin CC, Tanos TB, Coso OA, Cerbán FM. Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication of Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur J Immunol* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2021 Jul 3];34(1):200–9. Available from: www.eji.de
237. Todd AC, Hardingham GE. The regulation of astrocytic glutamate transporters in health and neurodegenerative diseases [Internet]. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020 [cited 2021 Jul 3]. p. 1–32. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
238. Duarte-Silva E, Maes M, Macedo D, Savino W, Peixoto CA. Shared neuroimmune and oxidative pathways underpinning Chagas disease and major depressive disorder [Internet]. Vol. 10, *Translational Psychiatry*. Springer Nature; 2020 [cited 2021 Jun 8]. Available from: [/pmc/articles/PMC7710744/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37710744/)

239. Chen Y, Xu J, Chen Y. Regulation of neurotransmitters by the gut microbiota and effects on cognition in neurological disorders [Internet]. Vol. 13, *Nutrients*. MDPI AG; 2021 [cited 2021 Jul 3]. p. 2099. Available from: <https://doi.org/10.3390/nu13062099>
240. Vilar-Pereira G, Silva AA da, Pereira IR, Silva RR, Moreira OC, de Almeida LR, et al. Trypanosoma cruzi-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. *Brain Behav Immun*. 2012 Oct 1;26(7):1136–49.
241. Vilar-Pereira G, De Souza Ruivo LA, Lannes-Vieira J. Behavioural alterations are independent of sickness behaviour in chronic experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Dec 1;110(8):1042–50.
242. Vilar-Pereira G, Barrios LC, da Silva AA, MartinsBatista A, Pereira IR, Moreira OC, et al. Memory impairment in chronic experimental Chagas disease: Benznidazole therapy reversed cognitive deficit in association with reduction of parasite load and oxidative stress in the nervous tissue. *PLoS One* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Jul 3];16(1 January 2021):e0244710. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244710>
243. Gil-Jaramillo N, Rocha AP, Raiol T, Motta FN, Favali C, Brigido MM, et al. The First Contact of Human Dendritic Cells With Trypanosoma cruzi Reveals Response to Virus as an Unexplored Central Pathway. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Apr 9 [cited 2021 Jun 16];12. Available from: [/pmc/articles/PMC8062726/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8062726/)

Apêndices

Lista de Publicações

1. Pacheco, A. d. O. L. ; Amaral, M. P. ; de Farias, I. S. ; Bottino, L. Z. M. F. ; BORTOLUCI, K. R. . Concomitant Isolation of Primary Astrocytes and Microglia for Protozoa Parasite Infection. Jove-Journal of Visualized Experiments, p. e60680, 2020.
2. Pacheco AL, Vicentini G, Matteucci KC, Ribeiro RR, Weinlich R, Bortoluci KR. The impairment in the NLRP3-induced NO secretion renders astrocytes highly permissive to *T. cruzi* replication. J Leukoc Biol. doi: 10.1002/JLB.4AB1118-416RR, 2019.

Anexos

Anexo A – Certificado de aceite do Comitê de ética (ICB)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 00
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Papel do RIPK3 no controle da infecção pelo Trypanosoma cruzi**", registrado sob o protocolo nº **3/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **27/03/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Karina Ramalho Bortoluci**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Aline Pacheco de Oliveira Lima (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**The role of RIPK3 on the control of Trypanosoma cruzi infection**", protocol nº **3/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **3/27/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Karina Ramalho Bortoluci**

- Team members: *Aline Pacheco de Oliveira Lima (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C58BL/6		8-10 semanas/weeks	864
	C57BL/6 deficientes p/ caspase-1		8-10 semanas/weeks	864
	C57BL/6 deficientes p/ NLRP3		8-10 semanas/weeks	864
	C57BL/6 deficientes p/ RIPK3		8-10 semanas/weeks	864
	C57BL/6 deficientes p/ RIPK3 e Caspase-1 (duplo KO)		8-10 semanas/weeks	864

São Paulo, 03 de abril de 2017.


Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP


Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel do RIPK3 sem controle da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*", protocolada sob o CEUA nº 2967120117, sob a responsabilidade de **Aline Pacheco de Oliveira Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 07/08/2017.

We certify that the proposal "The role of RIPK3 without control of *Trypanosoma cruzi* infection", utilizing 200 Isogenics mice (200 males), 1000 Knockout mice (1000 males), protocol number CEUA 2967120117, under the responsibility of **Aline Pacheco de Oliveira Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 08/07/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2017](#) a [12/2021](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	idade: 6 a 12 semanas
Linhagem:	C57BL/6		Peso: 5 a 20 g
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia		
Espécie:	Camundongos Knockout	sexo: Machos	idade: 6 a 12 semanas
Linhagem:	NLRP3		Peso: 5 a 20 g
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia		
Espécie:	Camundongos Knockout	sexo: Machos	idade: 6 a 12 semanas
Linhagem:	CAPASE-1		Peso: 5 a 20 g
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia		
Espécie:	Camundongos Knockout	sexo: Machos	idade: 6 a 12 semanas
Linhagem:	NLRP3		Peso: 5 a 20 g
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (USP)		
Espécie:	Camundongos Knockout	sexo: Machos	idade: 6 a 12 semanas
Linhagem:	RIPK3		Peso: 5 a 20 g
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (USP)		
Espécie:	Camundongos Knockout	sexo: Machos	idade: 6 a 12 semanas
Linhagem:	RIPK3/CASPASE-1 (duplo KO)		Peso: 5 a 20 g

Resumo: O protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da Doença de Chagas, uma patologia grave e crônica que afeta milhões de pessoas em todo mundo. Sabe-se que o controle da infecção pelo *T. cruzi* requer as ações de múltiplos mecanismos iniciais da imunidade inata que são desencadeados pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), TLRs e NODs. Recentemente, nosso grupo demonstrou o envolvimento do inflamassoma NLRP3 e da protease caspase-1 no controle da infecção por *T. cruzi*. Camundongos NLRP3^{-/-} e caspase-1^{-/-} apresentaram parasitemias elevadas e seus macrófagos não foram capazes de produzir óxido nítrico e controlar a infecção, diferente do que foi observado em camundongos selvagens. Além dos mecanismos microbicidas induzidos pelos PRRs, a necroptose, um tipo de morte celular regulada com fenótipo similar à necrose, vem sendo apontada como um mecanismo importante no controle de infecções ocasionadas por diversos patógenos. Estudos demonstraram que na ausência de moléculas essenciais para a necroptose, como RIPK3, os animais se tornam mais susceptíveis a diversos tipos de infecção, tais como infecções virais e bacterianas. Além de induzir morte por necroptose, RIPK3 também está envolvido na ativação de respostas inflamatórias, incluindo aquelas mediadas pelo inflamassoma NLRP3. Sendo assim, é possível que RIPK3 e NLRP3 colaborem para modular a ativação dos inflamassomas, bem como para a secreção de citocinas inflamatórias

Comissão de Ética no Uso de Animais

de maneira não-canônica, necessárias para o controle de determinadas infecções. Surpreendentemente, não há, até o momento, nenhum trabalho que tenha investigado o papel na necroptose no controle da infecção pelo *T. cruzi* e nem sobre o papel do RIPK3 na ativação do inflamassoma NLRP3 em resposta à infecção por este parasita. Sendo assim, a proposta central deste projeto é investigar o papel de RIPK3 tanto na indução da via de necroptose quanto na regulação da ativação dos inflamassomas e seu impacto para o controle da infecção por *T. cruzi*. ANIMAIS Serão utilizados: Camundongos isogênicos C57BL/6, machos, de 5 a 20 g, de 6 a 12 semanas Procedência: biotério/CEDEME Manutenção: biotério/CTCMol Camundongos Knockout NLRP3 , machos, de 5 a 20 g, de 6 a 12 semanas Camundongos Knockout CASPASE-1, machos, de 5 a 20 g, de 6 a 12 semanas Camundongos Knockout NLRC4 (IPAF), machos, de 5 a 20 g, de 6 a 12 semanas Camundongos Knockout RIPK3, machos, de 5 a 20 g, de 6 a 12 semanas Camundongos Knockout RIPK3/CASPASE-1 (duplo KO), machos, de 5 a 20 g, de 6 a 12 semanas Procedência: biotério/ICB-USP Manutenção: biotério/CTCMol Cronograma do estudo, início previsto para: 06/2017 com término previsto para: 12/2021

Local do experimento: biotério e laboratório do CTCMol

São Paulo, 07 de agosto de 2017



Prof. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo



Prof. Dra. Tatiana Helfenstein
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo