

Luiza Zainotti Miguel Fahur Bottino

**PAPEL DA GASDERMINA-D NO CONTROLE DA
INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* EM
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci.

VERSÃO CORRIGIDA

São Paulo
2021

RESUMO:

Os inflamassomas são plataformas multiproteicas ativadoras de caspase-1, a qual é responsável pelo processamento das citocinas IL-1 β e IL-18 e indução da piroptose. A piroptose é uma morte celular inflamatória extremamente relevante no contexto do controle de infecções por patógenos intracelulares. No entanto, apenas recentemente os mecanismos moleculares envolvidos na regulação desse processo foram desvendados, os quais incluem a clivagem da Gasdermina-D (GSDMD) pelas caspases-1 e -11, alçando essa proteína como mediadora essencial da piroptose desencadeada pelos inflamassomas canônicos e não canônicos. Uma vez que o papel da GSDMD no controle da infecção por protozoários ainda não foi completamente elucidado, o objetivo desse trabalho é avaliar a capacidade do parasita *Toxoplasma gondii* de induzir a clivagem da GSDMD e verificar a influência desse processo na ativação da resposta inflamatória e seu impacto no controle da infecção por macrófagos. Como esperado, macrófagos deficientes para GSDMD se mostraram mais resistentes à morte celular em resposta a um agonista clássico dos inflamassomas. Nossos dados mostram que o *T. gondii* foi capaz de induzir a clivagem da GSDMD e a secreção de IL-1 β em macrófagos selvagens. Surpreendentemente, os macrófagos GSDMD^{-/-} apresentaram um maior controle da replicação do parasita, efeito não correlacionado à secreção de citocinas inflamatórias. Por outro lado, uma maior produção de NO nos macrófagos GSDMD^{-/-} – regulada a nível transcricional – figura como um mecanismo-chave no controle do *T. gondii* nessas células. Juntos, nossos dados sugerem um papel não-convencional para GSDMD na limitação da produção de NO, o que traz grandes impactos ao longo do curso da infecção pelo *T. gondii*. De importância, a molécula GSDMD parece atuar de maneira contexto-dependente uma vez que dados preliminares mostram que macrófagos GSDMD^{-/-} apresentam níveis reduzidos de NO em resposta ao *Trypanosoma cruzi* e são mais suscetíveis à replicação por esse protozoário. Nossos dados demonstram que a GSDMD participa do controle de infecções causadas por protozoários por um mecanismo que envolve a regulação de enzimas microbicidas e ilustram a complexidade das interações entre as vias moleculares induzidas pelos inflamassomas na relação patógeno-hospedeiro.

Palavras-chave: Gasdermina-D, piroptose, inflamassomas, *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT:

Canonical inflammasomes are multiprotein platforms that activate caspase-1, which is responsible for processing IL-1 β and IL-18 cytokines and pyroptosis induction. Pyroptosis is an extremely inflammatory cell death process that can be involved in the control of infections caused by intracellular pathogens. The molecular regulation of this process has been recently described and involves the cleavage of Gasdermin D (GSDMD) by caspases-1 and -11, raising this molecule as a key mediator of pyroptosis induced by canonical and non-canonical inflammasomes. Since the role of GSDMD in controlling protozoa infections has not been fully elucidated, the aim of this project is to evaluate the ability of *Toxoplasma gondii* to induce GSDMD cleavage and to verify the influence of this process in the control of infection by macrophages. As expected, GSDMD-deficient macrophages were more resistant to cell death in response to a well-documented inflammasome agonist. Our data demonstrates that *T. gondii* was able to induce GSDMD cleavage and IL-1 β secretion in wild-type macrophages. Surprisingly, the GSDMD^{-/-} macrophages presented higher efficiency in controlling *T. gondii* replication, which was not correlated with inflammatory cytokines secretion. On the other hand, a higher production of nitric oxide (NO) – induced at transcriptional level – was pointed as a key infection-limiting mechanism in GSDMD^{-/-} macrophages in response to *T. gondii*. Taken together, our data suggests a non-conventional role for GSDMD in limiting NO production, with significant consequences on the outcome of *T. gondii* infection. Of importance, GSDMD appears to act in a context-dependent fashion since preliminary data showed that GSDMD^{-/-} macrophages show attenuated levels of NO in response to *Trypanosoma cruzi* and are more susceptible to parasite replication. Our data demonstrates the participation of GSDMD in the control of protozoa infections by a mechanism that involves the regulation of microbicidal enzymes and highlight the complex connectivity between the molecular signaling pathways triggered by the inflammasomes in the pathogen-host interactions.

Keywords: Gasdermin-D, pyroptosis, inflammasomes, *Toxoplasma gondii*

1. INTRODUÇÃO

1.1. O *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* é um protozoário unicelular, intracelular obrigatório do filo Apicomplexa. Esse parasita é responsável por causar a Toxoplasmose, que representa uma causa frequente de infecções em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo aves, roedores e humanos^{1,2}. Os membros da família *Felidae* são hospedeiros definitivos para o *Toxoplasma*, onde o parasita completa a fase sexuada do seu desenvolvimento, no intestino desses animais^{1,2}.

Acredita-se que em todo mundo aproximadamente 1/3 da população seja portadora da infecção que pode ser contraída principalmente de três maneiras: pelo consumo de água e alimentos contaminados, por transmissão zoonótica (do animal contaminado para o humano) e por transmissão vertical ao longo da gravidez^{1,2}. Embora a infecção em humanos imunocompetentes seja geralmente assintomática, o *T. gondii* pode levar a uma doença fatal em fetos ou recém-nascidos de mães infectadas (infecção congênita) e em pacientes imunocomprometidos^{1,2}.

Após a invasão ativa das células do hospedeiro, o *T. gondii* se desassocia da membrana do hospedeiro e reside dentro de um vacúolo parasitóforo (VP), que fornece um nicho replicativo para o parasita^{3,4}. A membrana do VP é seletivamente permeável à entrada de pequenas moléculas e nutrientes, permitindo o crescimento e proliferação do parasita e – além de servir como uma barreira física para a detecção do *T. gondii* – a formação do PV evita processos como a fusão lisossomal, permitindo a sobrevivência do parasita^{3,4}.

Ao longo do curso da infecção, o *T. gondii* se dissemina através do sistema circulatório estabelecendo a infecção em diversos órgãos. Alguns taquizoítos – forma dominante do parasita na fase aguda - invadem células como neurônios e miócitos diferenciando-se nas formas de cistos de bradizoítos que residem de maneira latente principalmente nas musculaturas esquelética, cardíaca e no sistema nervoso central (SNC). Nessa fase, a liberação de diversas proteínas e fatores solúveis pelo parasita garantem a sua sobrevivência no hospedeiro através da proteção induzida frente às estratégias de eliminação orquestradas pelo sistema imunológico, caracterizando a fase de infecção crônica^{1,5-8}.

Uma vez dentro do cérebro, o *T. gondii* é capaz de invadir astrócitos,

neurônios e micróglia. Estudos *in vitro* mostraram que o parasita tem um tropismo seletivo por células neuronais sobre as células gliais e micróglia^{1,6,7,9}. Durante o estudo, diferentemente dos neurônios, astrócitos e micróglia foram capazes de inibir eficientemente o crescimento e a replicação dos parasitas. Esse dado vai de acordo com a informação de que neurônios apresentam menos habilidades de proteção imunológica frente ao parasita e por conta disso seriam a célula mais favorável para a persistência do cisto^{1,6,9}.

As respostas imunológicas detalhadas de macrófagos, micróglia e astrócitos ao longo da infecção por *T. gondii* ainda não foram completamente elucidadas⁹. Estudos recentes relataram um papel importante para as populações de micróglia residentes na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias essenciais como a interleucina (IL)-1 β , IL-10, TNF (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*) e IL-12. Os astrócitos, por sua vez, são conhecidos pela liberação de IL-1, IL-6 e IL-27^{8,9}. Alguns papéis também foram associados aos macrófagos, que participam do controle da infecção através da secreção de citocinas inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e da produção de ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)⁸⁻¹⁰.

Um princípio básico no qual se baseia a resistência frente a infecções é a capacidade de receptores da imunidade inata de reconhecerem microorganismos e desencadear uma resposta protetora frente a eles. Em camundongos, os TLRs (do inglês, *Toll-like Receptor*)-11 e -12 de macrófagos estão envolvidos no reconhecimento da profilina de *T. gondii*, que é essencial para o processo de invasão mediado pelo parasita; enquanto os receptores TLR7 e TLR9 parecem mediar o reconhecimento de RNA e DNA do parasita¹¹. Após o reconhecimento, esses receptores induzem a produção de IL-12 para mediar a resposta frente ao parasita^{12,13}. Nesse contexto, a participação da molécula adaptadora MyD88 (do inglês, *Myeloid Differentiation primary response 88*) é essencial na sinalização desencadeada pela maioria dos TLRs para produção de citocinas que atuam na resposta anti-Toxoplasma^{14,15}. A produção de IL-12 desencadeada pelo reconhecimento do *T. gondii* também pode ocorrer por meio do receptor CCR5 (do inglês, *C-C Chemokine Receptor type 5*)^{16,17}.

De fato, a produção de IL-12 representa uma das melhores estabelecidas respostas imunológicas frente à infecção por *T. gondii*, conforme descrito por Gazzinelli e colaboradores¹⁸. A secreção dessa citocina pelas células imunes é

capaz de ativar linfócitos T e células NK (do inglês, *Natural Killers*) para liberação de interferon gamma (IFN- γ), sendo este considerado um dos mais efetivos mecanismos de resistência frente ao *Toxoplasma*^{1,5,8,18}. O IFN- γ propaga um sinal de ativação para a STAT1 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*)-1 através do seu receptor de superfície, IFN- γ R. A STAT1, por sua vez, é capaz de induzir a produção de moléculas efetoras como o NO (do inglês, *Nitric Oxide*) e o ROS, que desempenham importantes funções no controle do parasita^{3,4}. Outros importantes mecanismos pelos quais o IFN- γ suprime o crescimento do *T. gondii* incluem a indução da degradação do triptofano via ativação da indoleamina-2,3- dioxigenase (IDO) e a expressão de IRGs (do inglês, *Immunity-Related Guanosine triphosphatases*) e GBPs (do inglês, *Guanylate-binding Proteins*) que apresentam potentes efeitos microbicidas em microrganismos patogênicos intracelulares como o *T. gondii*^{1,3,5}.

É importante mencionar que, assim como o reconhecimento do parasita, a importância dos mecanismos efetores na resposta frente ao *T. gondii* parece diferir entre humanos e camundongos. Um exemplo disso é o fato de que a IDO, mas não a iNOS, representa um importante mecanismo de controle da infecção em diversas células de linhagens humanas^{19,20}. Ainda que células humanas apresentem um vasto repertório de GBPs, o envolvimento dessas proteínas na resposta anti-toxoplasma é controverso⁴. Assim, alguns dos mecanismos mais importantes na resistência frente ao parasita em células murinas parecem não ser tão efetivos em células humanas.

Apesar da ampla gama de mecanismos efetores capazes de limitar a replicação do *T. gondii*, a existência de diversas estratégias de escape imune possibilitam ao parasita sua sobrevivência em inúmeros tipos celulares, concedendo a ele a fama de ser considerado um dos mais bem sucedidos parasitas do mundo. Um elemento-chave para esse sucesso é a presença de organelas secretórias especializadas como os grânulos densos (GRAs) e as róprias (ROPs). Brevemente, essas organelas já se mostraram envolvidas em processos como a proteção do VP frente à ação dos IRGs^{21,22}; na supressão de STAT1 e da IDO^{23,24}; na degradação do fator de transcrição NF- κ B (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*) - e consequentemente na inibição da produção de IL-12²⁵; na inibição da produção de NO e na indução de uma resposta com perfil tolerigênico²⁶; entre outros. Vale mencionar que a expressão das moléculas

responsáveis por essa manipulação varia de acordo com a linhagem de *T. gondii* em questão, o que provavelmente reflete a pressão evolutiva de se ter uma ampla gama de hospedeiros intermediários na natureza.

Nesse sentido, diversas linhagens de *T. gondii* já foram identificadas sendo as do tipo I (RH), II (Me49) e III (VEG) as mais comuns na América do Norte e na Europa. De importância, essas diferentes linhagens diferem substancialmente em aspectos como a virulência, escape imune, habilidade de causar a forma encefálica da Toxoplasmose, e no perfil de citocinas induzidas pós a infecção^{4,27}. Nesse sentido, a linhagem tipo I RH é a mais virulenta e a mais eficaz em termos de mecanismos de subversão imunológica, enquanto as linhagens do tipo II e III são menos virulentas. Assim, caracterizar os mecanismos efetores induzidos nas células imunes e as estratégias de subversão imunológica adotadas pelo *T. gondii* RH contribuem para a compreensão da patogênese da doença.

1.2. REGULAÇÃO MOLECULAR DA PIROPTOSE

Células da imunidade inata como macrófagos e células dendríticas representam a primeira linha de reconhecimento e controle de infecções causadas por bactérias, fungos e parasitas, sendo responsáveis por orquestrar toda a resposta imune efetora subsequente. Por conta disso, muitos patógenos invadem as células do hospedeiro para evitar a detecção pelos fagócitos. Uma vez que a existência de células infectadas é uma ameaça ao hospedeiro, uma das soluções desencadeadas pelo sistema imune é a eliminação da célula invadida pelo processo de morte celular^{28,29}. A piroptose é um tipo de morte celular programada extremamente pró-inflamatória, que envolve a atividade de caspases inflamatórias e que induz o extravasamento do conteúdo intracelular por conta da formação de poros na membrana plasmática, causando um aumento da pressão osmótica^{30,31}. O termo piroptose, do grego *pyro* (*fogo*) e *ptosis* (*falha*), foi primeiramente descrito em 2001 por Cookson e Brennan³² e atualmente foi ampliado para abranger a morte celular executada pela maioria das caspases inflamatórias como é o caso da caspase-1, caspase-4, caspase-5 (em humanos) e caspase-11 (em camundongos)³¹.

O requerimento de caspases inflamatórias para a execução da piroptose é um dos aspectos que diferencia esse tipo de morte celular programada da

necroptose, igualmente inflamatória³³. Nesse contexto, as caspases inflamatórias são um grupo de proteases essenciais para a defesa imunológica inata do hospedeiro por serem mediadoras importantes do processo inflamatório e de morte celular³³. Essas proteases inflamatórias são ativadas em grandes complexos multiproteicos denominados inflamassomas, que se formam em resposta à detecção de alterações ou danos celulares (DAMPs - *Damage Associated Molecular Patterns*), como cristais de ácido úrico, ATP (do inglês, *Adenosine Triphosphate*), proteínas de choque térmico, ou de ligantes de patógenos (PAMPs - *Pathogen Associated Molecular Patterns*), como componentes da parede celular e produtos do sistema excretor de bactérias^{31,34-36}.

Uma vez oligomerizados, esses complexos proteicos são capazes de ativar a caspase-1 - nos inflamassomas “canônicos” - , responsável pela maturação das citocinas IL-1 β e IL-18 em sua forma bioativa e induzir o processo de piroptose^{37,38}. Por outro lado, a caspase-11 (ortólogo murino às caspases -4 e -5) compõe o inflamassoma “não-canônico”, ativado pelo lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular bacteriana, um dos mais fortes ativadores do sistema imunológico^{34,35,39}. Esse tipo de inflamassoma não induz diretamente a maturação de IL-1 β e IL-18 sendo necessária para isso uma interação sinérgica com inflamassomas canônicos ativados. Assim, nos inflamassomas não-canônicos, a pró-caspase-11 parece atuar tanto como um sensor quanto como a molécula efetora^{34,35,39,40}. A figura 1 apresenta um esquema representativo da estrutura e ativação dos inflamassomas canônicos (NLRP3 representado) e não-canônicos.

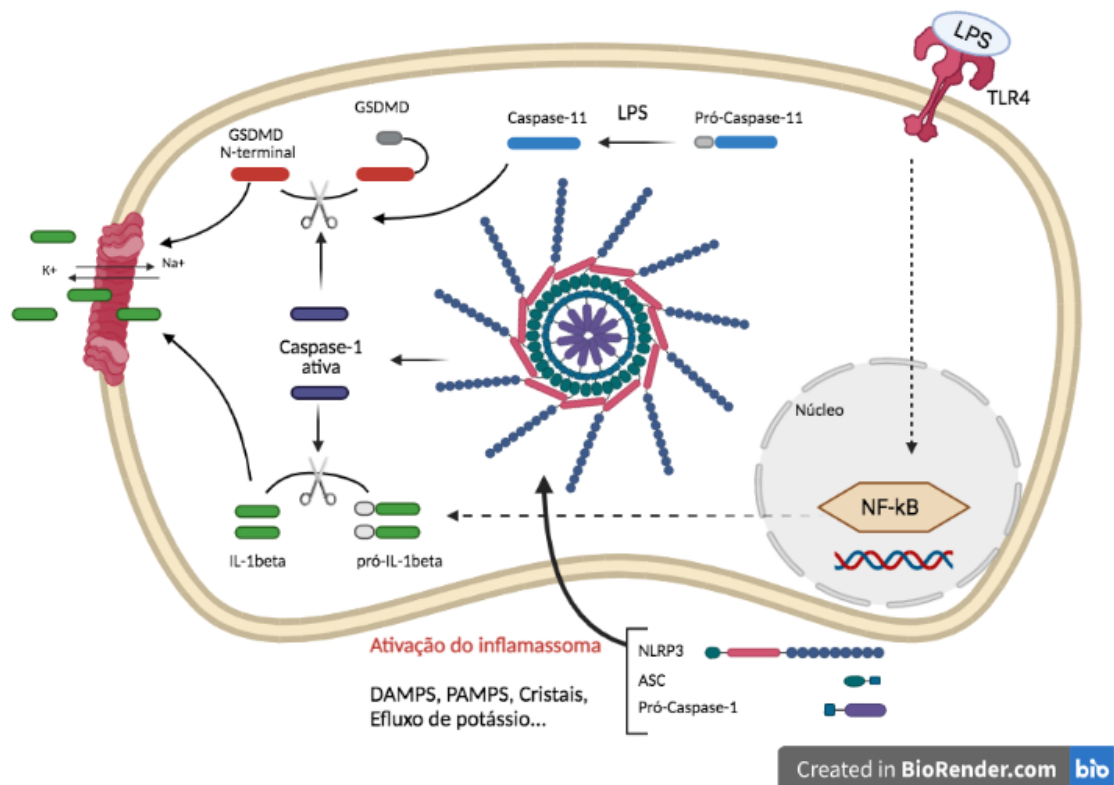


Figura 1. Imagem representativa da formação e ativação dos inflamassomas canônicos e não canônicos. Diferentes PAMPs e DAMPs ativam proteínas sensoras distintas incluindo NLRP3 aqui representado, induzindo alterações conformacionais que permitem o recrutamento e ativação da caspase-1 nos inflamassomas canônicos. Subsequentemente, a caspase-1 ativa é responsável por mediar o processamento da IL-1 β e da GSDMD, induzindo a secreção da forma ativa da citocina e piroptose. Já os inflamassomas não canônicos são compostos pela Caspase-11 e ativados através do reconhecimento do LPS citosólico. Diferente da caspase-1, a caspase-11 é capaz apenas de induzir o processamento da GSDMD e portanto o processo de piroptose.

Estruturalmente, os inflamassomas canônicos podem ser formados pelas proteínas NLR (do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* [NOD], *Leucine Rich Repeats [LRR]-containing protein*), como NLRP1 (do inglês, *NLR Pyrin domain-containing 1*), NLRP3 (do inglês, *NLR Pyrin domain-containing 3*), NAIP (do inglês, *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*) e NLRC4 (do inglês, *NLR CARD-containing 4*) ou por proteínas da família PYHIN (do inglês, *Pyrin Domain [PYD] and Hematopoietic Interferon-inducible Nuclear protein [HIN] domain*) como AIM2 (do inglês, *Absent In Melanoma 2*). Além da proteína sensora, esses complexos incluem a proforma inativa da caspase-1 e, em alguns casos, a molécula adaptadora ASC (do inglês, *Apoptosis associated Speck-like protein containing a Caspase Recruitment Domain [CARD]*)⁴¹.

As proteínas sensoras da família NLR apresentam três domínios comuns: um domínio LRR na região C- terminal, um domínio NOD central de oligomerização e ligação ao nucleotídeo altamente conservado e um domínio de interação

proteína-proteína na região N-terminal, que pode ser do tipo PYD, CARD ou BIR (do inglês, *Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat*)^{36,38}. Inflamassomas que apresentam apenas o domínio PYD na região N-terminal (como p.e. os inflamassomas NLRP3 e AIM2) sinalizam exclusivamente na presença da molécula adaptadora ASC, composta pelos domínios PYD e CARD. A interação PYD-PYD entre a ASC e o inflamassoma possibilita o recrutamento da caspase-1 pelo domínio CARD da molécula adaptadora. Enquanto isso, inflamassomas com o domínio CARD (NLRC4, NLRP1, NLRP1a, NLRP1b) são capazes de interagir diretamente com a caspase-1^{36,37}.

Os inflamassomas melhor caracterizados são NLRP3, AIM2, NLRC4 e NLRP1. A detecção de DNA dupla fita pelo inflamassoma AIM2 no citosol é crucial na resposta a infecções intracelulares. Além disso, o inflamassoma AIM2 também é capaz de reconhecer o DNA dupla fita liberado por células do próprio hospedeiro, resultando na liberação de citocinas inflamatórias e na progressão de doenças estéreis⁴². O inflamassoma NLRP3 por sua vez, é ativado em resposta a uma ampla variedade de estímulos, incluindo bactérias, vírus, protozoários, toxinas formadoras de poros, DAMPs, colesterol, entre outros^{34,37,43}. Levando em consideração a variedade de estímulos capazes de ativar o NLRP3 e as diferenças nas suas propriedades químicas e estruturais, é pouco provável que o sensor interaja diretamente com qualquer um dos seus agonistas. Assim, sua ativação parece ser regulada indiretamente, refletindo a natureza homeostática da célula⁴⁴⁻⁴⁶.

Atualmente, alguns eventos induzidos pelos agonistas do NLRP3 que poderiam estar envolvidos na ativação do inflamassoma já foram identificados, incluindo fluxo iônico (p.e. efluxo de potássio, mobilização de cálcio)^{47,48}, disfunção mitocondrial (produção de ROS mitocondrial)⁴⁹⁻⁵¹, danos lisossomais⁵² e dispersão da rede trans-Golgi⁵³. Ainda, recentemente, as proteínas NEK7 (do inglês, *NIMA-related kinase 7*) e DDX3X (do inglês, *DEAD-box helicase X-linked*) foram identificadas como importantes reguladoras do processo de ativação do NLRP3⁵⁴⁻⁵⁶. Ainda que muito esforço tenha sido investido na compreensão dos eventos que ocorrem *upstream* a montagem do NLRP3, não existe até o momento um modelo unificado que defina como ocorre sua ativação. Assim, ainda existem algumas controvérsias a respeito dos sinais que estão crucialmente envolvidos ou apenas associados a ativação desse inflamassoma.

No outro extremo, os inflamassomas NLRP1b murino e NLRC4 são mais restritos; seus agonistas melhor caracterizados são a toxina letal secretada por *Bacillus anthracis* e componentes bacterianos que alcançam o citoplasma (p.e. flagelina, e proteínas do sistema de secreção tipo 3), respectivamente^{34,35,37}. No entanto, dados da literatura mostram o envolvimento do NLRC4 em patologias estéreis⁵⁷ e em resposta a fungos^{58,59}, assim como o papel importante de NLRP1b no controle da infecção por *T. gondii*^{60,61}, indicando que essas plataformas são mais dinâmicas do que anteriormente se supunha.

A relação direta entre o inflamassoma NLRP1 e a infecção por *T. gondii* foi inicialmente relatada em 2011 por Witola e colaboradores, em um estudo que demonstrou que o gene do NLRP1 tinha alelos associados à suscetibilidade da toxoplasmose congênita⁶². Em 2013, Gov e colaboradores demonstraram em monócitos e células THP-1 que a secreção de IL-1 β induzida pela infecção por *T. gondii* era dependente de ASC e caspase-1⁶³. Em 2014, Ewald e colaboradores demonstraram que a transfecção de macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) de camundongos selvagens com o gene *nlrp1* de camundongos 129 (que secretam IL-1 β em resposta às cepas do tipo I e tipo II de *T. gondii*) resultou numa secreção de IL-1 β cinco vezes maior em comparação aos MDMO não transfectados, posicionando o NLRP1 como um sensor chave para detecção do *T. gondii* em roedores envolvido na resposta protetora frente ao parasita⁶¹. Coerentemente, outros estudos no mesmo ano identificaram o *T. gondii* como um agonista do inflamassoma NLRP1 em macrófagos derivados de ratos. De maior importância, nesse estudos se observou a associação entre o NLRP1, a piroptose e a resistência frente à infecção pelo *T. gondii*, posicionando a piroptose como um importante mecanismo de controle da infecção em ratos^{64,65}.

Ainda em 2014, Gofu e colaboradores demonstraram que os inflamassomas NLRP1 e NLRP3 estavam envolvidos na resistência frente à infecção por *T. gondii*, principalmente por conta da secreção de IL-18. Nesse estudo, foi observado que essa resistência também era dependente da presença das caspases-1/11 e da molécula adaptadora ASC⁶⁰. Além disso, um estudo realizado por Jia-Qi Chu e colaboradores demonstrou que a infecção por *T. gondii* elevou significativamente os níveis de mRNA de NLRP1, NLRP3, ASC, NLRC4, NLRP6, NLRP8, NLRP13, AIM2 e NAIP e caspase-1, indicando que outros

inflamassomas poderiam atuar na resposta imune inata frente ao *T. gondii*⁶⁶. Nesse mesmo contexto, em 2019 foi mostrado em um estudo de Lodoen e colaboradores que monócitos primários humanos e células THP-1 também eram capazes de secretar IL-1 β frente à infecção com *T. gondii* e que o inflamassoma NLRP3 estava envolvido nessa secreção⁶⁷.

Estudos recentes foram realizados com o objetivo de compreender os mecanismos por trás da ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos murinos infectados pelo *T. gondii*. Por exemplo, o envolvimento do receptor purinérgico P2X7 na ativação do inflamassoma e no controle do parasita em células epiteliais humanas⁶⁸ e murinas⁶⁹ já foi observado. Vale mencionar que, além dos conhecidos sensores NLRP3 e NLRP1, a importância dos sensores NOD2⁷⁰ e AIM2⁷¹ na indução de uma resposta protetora frente ao parasita em camundongos e células humanas também já foi reconhecida. Nesse sentido, os pesquisadores observaram que o parasita é capaz de induzir uma via de morte celular apoptótica não convencional que envolve a ativação do inflamassoma AIM2, ASC e Caspase-8 em células humanas estimuladas com IFN- γ ⁷¹. Juntos, esses dados mostram que o reconhecimento do *T. gondii*, assim como os mecanismos efetores desencadeados pelo mesmo, se baseiam em uma complexa interação de diversas vias de sinalização, com consequências célula- e contexto-dependentes.

A contribuição da caspase-11 também já foi explorada nas fases aguda e crônica da Toxoplasmose. Um estudo realizado em 2016 mostrou que, durante a fase aguda, os animais caspase-11^{-/-} eram mais resistentes frente à infecção quando comparados com animais selvagens ou ASC^{-/-}, apresentando menores níveis de citocinas inflamatórias. Curiosamente, na fase crônica, os animais caspase-11^{-/-} apresentaram maiores níveis de neuroinflamação e uma maior quantidade de cistos cerebrais em comparação aos outros genótipos. Esses dados indicam que a redução na inflamação local causada pela ausência da caspase-11 poderia resultar em um aumento da sobrevivência dos camundongos durante a fase aguda ao mesmo tempo que cria um ambiente favorável para expansão sistêmica do parasita em direção ao cérebro⁷².

O sucesso da infecção pelo *T. gondii* depende de um fino equilíbrio entre indução e evasão da resposta imunológica. Nesse sentido, algumas moléculas efetoras que interferem nas vias de ativação dos inflamassomas também já foram constatadas no repertório de estratégias do *T. gondii*. Um exemplo disso pode ser

observado no paradoxal papel da iNOS nos modelos humano e murino: enquanto a produção de NO figura como um mecanismo chave no controle da infecção em camundongos, um aumento da expressão da iNOS - que ocorre em resposta à produção de IL-1 β , de maneira GRA-15 dependente - se correlaciona com uma forte inibição da IDO, molécula extremamente relevante no controle do parasita em células humanas⁷³. Assim, nesse caso o NLRP3 exerce um papel pró-Toxoplasma, no qual o parasita usa a iNOS para antagonizar a imunidade medida pela IDO via GRA15. Ainda que esse seja um claro exemplo da existência de um crosstalk entre moléculas efetoras do *T. gondii* e a ativação dos inflamassomas, os mecanismos exatos pelos quais o parasita lida com essa cascata de sinalização, principalmente no modelo murino, permanecem pouco compreendidos.

1.3. GSDMD E PIROPTOSE

A importância da ativação do inflamassoma e da piroptose na contenção de patógenos do nicho intracelular é evidenciada pelo fato de que muitos patógenos evoluíram de modo a subverter a ativação desses mecanismos como por exemplo através da restrição da expressão ou modificação de ligantes dos inflamassomas, inibindo sua função. Exemplos de patógenos conhecidos por desempenhar essas funções são: *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *L. pneumophila*, *S. flexneri* entre outros⁷⁴.

As consequências da piroptose no curso de infecções se refletem na eliminação do nicho replicativo de patógenos e na consequente reexposição dos mesmos a células e mediadores inflamatórios, sendo portanto considerada um processo teoricamente crítico para defesa do hospedeiro contra infecções causadas por patógenos intracelulares obrigatórios, como é o caso do *T. gondii*^{29,37}. Além disso, uma vez que a célula é morta por piroptose, os patógenos podem ser aprisionados dentro de estruturas chamadas PITs (do inglês, *Pore Induced Traps*), que impedem sua disseminação e induzem o aumento de moléculas quimioatratantes de neutrófilos, intensificando a resposta protetora⁷⁵. No entanto, ainda que um grande esforço tenha sido investido para determinar a relevância da piroptose no controle de algumas infecções bacterianas, a importância desse processo para o controle de infecções causadas por protozoários permanece menos explorada.

O substrato das caspases-1 e -11 responsável pela indução da piroptose foi identificado em dois estudos de referência realizados em 2015 por grupos liderados por Shao e Dixit: a GSDMD, um membro da família de proteínas Gasderminas com atividade de formação de poros^{76,77}. Nesses estudos, macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) de camundongos com mutações funcionais ou deleção do gene da GSDMD não eram capazes de sofrer piroptose e apresentavam secreção de IL-1 β prejudicada em resposta ao LPS. Assim, a conclusão obtida foi que a GSDMD seria a molécula efetora da piroptose mediada por inflamassomas não canônicos, sendo necessária para a secreção de IL-1 β em resposta ao LPS intracelular^{76,77}. Posteriormente, dados publicados por He e colaboradores confirmaram os achados anteriormente mencionados, corroborando a hipótese de que a GSDMD seria um fator crítico para os eventos de sinalização mediados pela caspase-11⁷⁸.

Shao e colaboradores também observaram o envolvimento da GSDMD na resposta dos inflamassomas canônicos: MDMOs deficientes em GSDMD não sofriam piroptose quando estimulados com agonistas clássicos dos inflamassomas NLRP3, NLRC4 e AIM2. De importância, nesses macrófagos, a ausência da GSDMD não prejudicou o processamento da IL-1 β pela caspase-1. Em conjunto, os dados realçaram a importância da GSDMD na piroptose mediada pelas caspases-11 e -1 e na secreção de IL-1 β nas vias de diversos inflamassomas^{77,79}.

A GSDMD é principalmente expressa em células imunes, na placenta e no epitélio gastrointestinal^{30,80} e sua transcrição pode ser impulsionada pelo IRF (do inglês, *Interferon Regulator Factor*) 2, que é um supressor transcricional dos interferons⁸¹. Os mecanismos efetores associados à maioria dos membros da família das gasderminas só são observados quando a molécula encontra-se clivada. De fato, posteriormente, alguns trabalhos publicados simultaneamente mostraram que as caspases-1 e -11 clivam a GSDMD em resíduos de aspartato, liberando o fragmento N-terminal (GSDMD^{NTERM}) do domínio autoinibitório C-terminal (GSDMD^{CTERM})⁸²⁻⁸⁵. Uma vez liberado, o GSDMD^{NTERM} - também chamado de domínio formador de poros (*Pore Forming Domain - PFD*) - interage com fosfolípidios da parte interna da membrana plasmática, se oligomerizando. A oligomeração facilita sua inserção na membrana, onde são formados poros de 10-15nm de diâmetro que dissipam o gradiente iônico, causando extravasamento do

conteúdo celular e, em alguns casos, ruptura da membrana plasmática⁸²⁻⁸⁵. O diâmetro dos poros formados é suficientemente grande para que os mesmos sirvam como condutas para saída de moléculas pequenas como a IL-1 β madura – mediando a “secreção não-convencional de citocinas” - (Figura 1) e, caso os poros não estejam presentes em grandes quantidades, possibilitam a secreção de IL-1 β mesmo na ausência de lise celular⁸⁶⁻⁸⁸. Assim, o reparo da membrana plasmática é um processo crítico que regula a morte celular induzida por proteínas formadoras de poros⁸⁹. Nesse contexto, os mecanismos de reparo dependentes de cálcio e do ESCRT-III (do inglês, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport III*) foram reconhecidos pela sua capacidade de limitar a piroptose em MDMO infectados com *S. Thiphymurim* e transfectados com LPS^{88,89}.

Outra evidência que contraria a ideia de que a ativação da GSDMD seria apenas imediata e terminal é observada na interação entre a caspase-11 e o inflamassoma NLRP3 para secreção de IL-1 β em resposta ao LPS citoplasmático. O modelo mais comumente sugerido propõe que os poros induzidos pela ativação da caspase-11 frente ao LPS induziriam o efluxo de potássio na célula, promovendo posteriormente a ativação do NLRP3. Essa condição posiciona a GSDMD tanto ao final da curta cascata dos inflamassomas não canônicos como no início de uma resposta secundária mediada pelo NLRP3^{89,90}.

A GSDMD também é capaz de exercer efeitos citotóxicos e causar a morte de bactérias Gram⁺ e Gram⁻ *in vitro* uma vez que a GSDMD^{NTERM} também tem afinidade pela cardiolipina, um componente da membrana de bactérias^{28,82,83}. Um exemplo disso foi observado por Liu e colaboradores: a expressão do fragmento GSDMD^{NTERM} é altamente tóxica para *Escherichia coli*, enquanto quase não foi observada atividade citotóxica associada à expressão da proteína não clivada ou na presença apenas do GSDMD^{CTERM}⁸⁴. O efeito citotóxico da GSDMD na membrana das bactérias também foi evidenciado em 2019 por Re e colaboradores: além da bactéria *B. thailandensis* ter tido sua viabilidade consideravelmente reduzida quando incubada na presença simultânea de caspase-1 e GSDMD, os pesquisadores também observaram que bactérias obtidas a partir de MDMO selvagens eram mais suscetíveis à atividade microbicida do peróxido de hidrogênio e estavam em menor quantidade do que aquelas obtidas a partir de MDMOS deficientes para GSDMD, corroborando a desestabilização de membranas bacterianas causada pela GSDMD⁹¹.

A cardiolipina e outros fosfolipídios que interagem com a GSDMD^{NTERM} também podem ser encontrados na membrana das mitocôndrias, fagossomos e lisossomos. Assim, a ativação da GSDMD também pode levar à perda do potencial da membrana das mitocôndrias e ao rompimento dos lisossomos, com importantes consequências na resposta inflamatória⁸⁹. Curiosamente, a GSDMD também pode ser clivada pela caspase-3 em um sítio na porção N-terminal. Nesse caso, a clivagem acaba afetando a habilidade de formar poros da GSDMD e, portanto, as consequências da piroptose. A caspase-3 também é capaz de clivar a Gasdermina E (GSDME) e converter uma morte inicialmente não inflamatória e apoptótica em piroptose⁸⁹. Por fim, além das caspases inflamatórias, sabe-se que a caspase-8 e a catepsina G também são capazes de induzir a clivagem da GSDMD e consequentemente a formação de poros na membrana celular³⁰.

A clivagem da GSDMD – e as respostas subsequentes a esta – dependem do contexto da infecção e do tipo celular em questão. Nos neutrófilos, acredita-se que essa clivagem ocorra, ainda que não exclusivamente, pela elastase neutrofilica ELANE⁹². Nessas células, a GSDMD também parece ser importante na formação das NETs (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*)^{92,93}. Além disso, por apresentarem uma expressão de caspase-1 menor do que outros fagócitos, os neutrófilos apresentam uma maior resistência à morte celular, permanecendo viáveis e secretando IL-1 β por mais tempo^{92,93}, o que pode caracterizar um estado conhecido como “hiper-ativação”⁸⁶.

Desde a sua identificação em 2015, a GSDMD vem sendo colocada como mediadora central da piroptose. Interessante, dados publicados em 2021 pelo grupo do Vishva Dixit mostram que o processo de ruptura da membrana celular que caracteriza a piroptose também depende da atividade da proteína Ninjurin-1 (NINJ-1)⁹⁴. A NINJ-1 é uma proteína de superfície com aproximadamente 16kDA expressa em células mielóides e em células do SNC com uma função inicialmente restrita à adesão celular. Utilizando uma abordagem genética, os autores identificaram que um fenótipo caracterizado por uma menor secreção de LDH (do inglês, *Lactate Dehydrogenase*) estava associado a mutações no gene NINJ-1. Dando continuidade aos estudos que pretendiam elucidar o papel da proteína na lise celular, os pesquisadores confirmaram que MDMOs deficientes para NINJ-1 foram negativamente afetados em termos de lise celular em resposta a indutores

da piroptose, necroptose e apoptose e na secreção de LDH em resposta à agonistas clássicos dos inflamassomas⁹⁴. De importância, a deficiência de NINJ-1 não afetou o processamento da GSDMD, a formação de poros pela mesma e nem a secreção de IL-1 β ou IL-18. Além disso, vale ressaltar que a deficiência da NINJ-1 não impediu que os macrófagos morressem eventualmente. No entanto, a morfologia observada após a morte celular se distinguiu daquela característica do processo de piroptose. Juntos, esses dados mostraram que – de fato – ainda que a secreção de citocinas inicialmente ocorra através dos poros da GSDMD esse processo não está necessariamente acoplado à lise celular e liberação de moléculas de alto peso molecular como LDH.

Nesse sentido, ainda que os poros formados pela oligomerização da GSDMD na membrana plasmática de fato funcionem como canais para a secreção não-convencional da IL-1 β – tanto em células piroptóticas quanto em células viáveis -, a secreção de IL-1 β independente de GSDMD já foi identificada em diversas situações e modelos^{67,95,96}, inclusive por células THP-1 e monócitos primários humanos frente ao *T. gondii*, sendo muitas vezes caracterizada por uma cinética mais lenta e uma secreção menos eficiente. Juntos, esses dados exemplificam bem a complexidade dos fatores que governam o destino final da célula e realçam a importância de compreender a dinâmica e a regulação da morte celular em diferentes contextos.

1.4 PIROPTOSE NO CONTROLE DE INFECÇÕES

Apesar do papel fundamental já estabelecido para a IL-1 β e IL-18 dentre os mecanismos efetores dos inflamassomas, diversas evidências apontam para a relevância dos mecanismos adicionais desempenhados por essas plataformas para a resposta imune, por exemplo o fato de que camundongos deficientes para IL-1 β e IL-18 são menos suscetíveis à infecção com *Francisella tularensis* do que camundongos deficientes para caspase-1⁹⁷.

Além disso, o choque letal induzido por LPS é impulsionado pela ativação de inflamassomas não canônicos. Uma vez que a liberação de IL-1 β e IL-18 não é um resultado direto da ativação da caspase-11, a resposta inflamatória exacerbada nesses casos parece ser impulsionada principalmente pela piroptose^{98,99}. Por fim, sabe-se também que a proteção induzida pela deficiência da caspase-1 nos casos

de insuficiência renal não é observada nos casos em que só as citocinas IL-1 β e IL-18 são neutralizadas¹⁰⁰.

A evidência mais direta do efeito da piroptose na eliminação de infecções vem da investigação em cepas bacterianas. Em 2010 um estudo realizado por Miao e colaboradores mostrou que a eliminação de *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila* e *Burkholderia thailandensis* mediada pelo reconhecimento da flagelina era independente da secreção de IL-1 β e IL-18, ocorrendo via piroptose. Esse achado demonstrou, portanto, que mecanismos dependentes de caspase-1 atuariam na eliminação de patógenos intracelulares de maneira independente de seus principais substratos, IL-1 β e IL-18, através da piroptose²⁹. Além disso, o efeito da piroptose no controle de infecções também já havia sido notado em modelos de *Bacillus anthracis*¹⁰¹.

Alguns dados *in vivo* do efeito da piroptose no controle da infecção por *Burkholderia thailandensis* foram apresentados por Re e colaboradores que demonstraram que camundongos deficientes para GSDMD eram mais suscetíveis à infecção, apresentando uma maior proliferação de bactérias no fígado e baço em comparação aos animais selvagens e sucumbindo rapidamente. De importância, esse estudo *in vivo* também mostrou que os níveis de IL-1 β no soro dos animais não diferiam entre nocautes e selvagens enquanto os níveis de IL-18 eram bem menores nos nocautes⁹¹. Resultados similares a respeito da maior suscetibilidade de camundongos GSDMD^{-/-} também foram obtidos nos modelos de infecção por *Francisella novicida*¹⁰² e *Brucella abortus*¹⁰³. Ainda no modelo de infecção por bactérias, a GSDMD também já mostrou seus efeitos protetivos em resposta a *Burkholderia cenocepacia in vitro* e *in vivo*. Curiosamente, esse estudo mostrou que o efeito da GSDMD na restrição da replicação da bactéria era independente da sua função na morte celular e posicionou essa molécula como uma importante reguladora da produção de ROS mitocondrial¹⁰⁴. De maior importância, um estudo recente destacou a importância da GSDMD para a secreção de IL-1 α por células mononucleares do cérebro durante a fase crônica da infecção pelo *T. gondii*. Nesse estudo, os camundongos GSDMD^{-/-} apresentaram um significativo aumento na quantidade de cistos cerebrais acompanhado de um declínio na quantidade de células imunes infiltradas no cérebro¹⁰⁵.

A deficiência da GSDMD também já foi previamente associada a menores

taxas de suscetibilidade em contextos infecciosos, como exemplificado na mortalidade tardia de camundongos GSDMD^{-/-} frente à infecção pelo norovírus murino, provavelmente por conta da menor inflamação causada pela prevenção da piroptose¹⁰⁶. Esses animais nocautes também já demonstraram apresentar um controle mais efetivo da infecção por *Escherichia coli*. Nesse caso, o controle se dá por conta de um retardo na morte de neutrófilos, que acabam por se acumular no local de infecção, aumentando a resposta do hospedeiro⁹². Esse estudo reitera a noção de que a GSDMD pode exercer tanto efeitos pró inflamatórios como anti-inflamatórios, de acordo com o contexto. Em outro estudo, a piroptose e secreção de citocinas mediadas pela GSDMD induzidas pela infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos humanos foram responsáveis pelo aumento da propagação da infecção¹⁰⁷. Juntos, esses estudos realçam a importância de um regulado equilíbrio entre a produção e liberação de mediadores inflamatórios para estimular uma resposta e a limitação dos danos teciduais que podem ser gerados pela resposta inflamatória.

O papel da piroptose também já foi descrito em infecções virais, como por exemplo aquelas causadas pelo vírus da coriomeninge linfocítica, influenza, vírus da imunodeficiência humana e citomegalovírus murino. No entanto, nesses casos a piroptose pode ser um pouco controversa atuando tanto no controle da replicação viral quanto no desenvolvimento da doença^{30,108}. Quanto às infecções causadas por protozoários, ainda que a ativação dos inflamassomas esteja envolvida na resposta frente a diversos patógenos como *Neospora Caninum*, *Typanosoma cruzi*, *Plasmodium spp*, e o próprio *T.gondii*^{36,109} - entre outros, a importância da clivagem da GSDMD e da ocorrência de piroptose ao longo do curso da infecção permanecem pouco compreendidos. Ainda assim, vale mencionar que alguns aspectos importantes sobre a GSDMD já foram identificados nesse contexto, como por exemplo o envolvimento da molécula na citólise induzida pela infecção por *Trichomonas vaginalis* em macrófagos humanos¹¹⁰, e a participação da GSDMD na secreção de IL-1 β em resposta a infecção por *Entamoeba histolytica*¹¹¹.

Em resumo, as diversas evidências acumuladas ao longo do tempo no campo da morte celular sugerem que a GSDMD pode tanto controlar infecções quanto promover patologia, realçando a interconectividade complexa que existe entre inflamação e piroptose no contexto do desenvolvimento e progressão de

doenças³⁰. Por mais que alguns aspectos relacionados à ativação dos inflamassomas e a ocorrência de morte celular tenham sido identificados em resposta ao *T. gondii*^{60,61,63,67,71} - como por exemplo sua capacidade de induzir morte celular e secreção de IL-1 β de maneira GSDMD-independente em células humanas -, sabe-se que as consequências induzidas pela ativação dessas plataformas são extremamente dependentes de alguns fatores como o tipo celular, o hospedeiro e o patógeno em questão⁷¹, ressaltando a complexidade e a necessidade de melhor compreendermos a regulação da GSDMD ao longo da infecção pelo *T. gondii*.

A dinâmica da morte celular na infecção pelo *T. gondii* é ainda mais complexa devido ao fato de que esse aspecto ainda parece ser extremamente controverso. Sendo um parasita intracelular, o *T. gondii* depende da sobrevivência da célula hospedeira infectada. De acordo com a ameaça que a perda do nicho replicativo representa para o ciclo do parasita, a modulação de vias de morte celular faz parte das estratégias desempenhadas pelo parasita para garantir sua perpetuação. Alguns mecanismos incluem (i) a diminuição da liberação de citocromo-c^{112,113}, (ii) a fosforilação de proteínas pró-apoptóticas¹¹⁴, (iii) indução da maior produção de proteínas anti-apoptóticas¹¹⁵, (iv) interferência na montagem de “apoptossomos”¹¹⁶, entre outros. Ao mesmo tempo, já foi constatado que proteínas efetoras liberadas pelo *T. gondii* aumentam as taxas de apoptose de macrófagos *bystander* não infectados, o que poderia ser um regulador negativo da resposta imune desencadeada frente à infecção^{117,118}.

Assim, a maior parte do nosso conhecimento acerca das estratégias de escape imune que envolvem a manipulação de processos de morte celular desempenhadas pelo *T. gondii* se restringem à modulação da apoptose. No entanto, a presença de proteínas derivadas do *T. gondii* que inibem a necroptose também já foi observada¹¹⁹. Ainda que a apoptose e a piroptose sejam mortes molecular e imunologicamente distintas, é coerente imaginar que o sucesso do parasita envolva a manipulação dessas diversas vias de morte celular. Nesse sentido, elucidar o papel da piroptose e da GSDMD em resposta à infecção pelo *T. gondii* é de grande importância na compreensão de diversos aspectos da patogênese do parasita.

Ainda que, de fato, a piroptose possa ser associada com a eliminação de

alguns patógenos e, conseqüentemente, com o controle de infecções, a desregulação da ativação do inflamassoma e da indução desse tipo de morte celular fazem com que estas também estejam associadas ao desenvolvimento de doenças autoinflamatórias e até mesmo com a progressão do câncer¹²⁰. Recentemente, alguns inibidores da atividade da GSDMD foram identificados. Em 2018, por exemplo, Rathkey e colaboradores identificaram a Necrosulfonamida (NSA) como um inibidor da piroptose mediada pela GSDMD com capacidade de induzir proteção em um modelo de choque séptico em camundongos¹²¹. Em 2020, o dissulfiram, substância ativa utilizada no tratamento da dependência alcoólica, também foi identificado como uma droga capaz de inibir a capacidade de formar poros da GSDMD. Diferentemente da NSA, o tratamento com dissulfiram ainda permitiu o processamento da caspase-1 e da IL-1 β , afetando apenas a oligomerização da GSDMD e conseqüentemente a secreção de citocinas e indução da piroptose¹²². De importância, ambos os inibidores exercem seus efeitos através de modificações em resíduos de cisteína (Cys191 em humanos e Cys192 em camundongos), que são críticos para a oligomerização da GSDMD, justificando assim sua efetividade e destacando a importância desses resíduos na busca por alvos durante o desenvolvimento e identificação de novos inibidores da GSDMD¹²⁰⁻¹²².

Nesse contexto, um trabalho publicado recentemente por Fiachra Humpries e colaboradores revelou um importante papel para o intermediário metabólico fumarato na inibição da piroptose mediada pela GSDMD. Nesse trabalho, os pesquisadores observaram que tanto o tratamento de MDMOs com fumarato exógeno – dimetil fumarato (DMF) - quanto o acúmulo de fumarato endógeno nessas células eram capazes de impactar negativamente a morte celular e a secreção de citocinas. De maneira similar aos dois inibidores anteriormente mencionados, o fumarato também demonstrou a capacidade de interagir com a GSDMD através dos resíduos Cys191/Cys192 causando alterações que afetavam sua capacidade de oligomerização e interação com a caspase-1, limitando a formação de poros e, conseqüentemente, a indução de piroptose¹²³. De importância, o uso do DMF *in vivo* se mostrou protetor nos modelos animais experimentais de choque séptico, esclerose múltipla e Febre Familiar do Mediterrâneo (FFM)¹²³. Juntos, esses dados reforçam o papel da GSDMD no

desenvolvimento de diversas doenças e mais uma vez destacam a importância de expandirmos o panorama regulatório desta molécula.

2. CONCLUSÕES

Juntos, os dados apresentados nesse trabalho de mestrado nos permitem concluir que:

1- O *T. gondii* é capaz de induzir a clivagem e ativação da GSDMD em macrófagos selvagens.

2- Macrófagos GSDMD^{-/-} são prejudicados na secreção de IL-1β em resposta ao *T. gondii*.

3- Macrófagos deficientes para GSDMD são mais eficientes no controle da infecção pelo *T. gondii* quando comparados aos macrófagos selvagens

4- O controle da infecção observado nos macrófagos GSDMD^{-/-} não se correlaciona com uma maior secreção de citocinas inflamatórias

5- Macrófagos GSDMD^{-/-} são caracterizados por uma maior expressão de iNOS e uma maior produção de NO após a infecção pelo *T. gondii*.

6- A maior produção de NO nos macrófagos GSDMD^{-/-} se correlaciona com o melhor desempenho dessas células no controle da infecção.

7- A GSDMD parece estar envolvida na capacidade tripanocida de macrófagos por um mecanismo que envolve a secreção de IL-1β e NO.

Assim, nossos dados sugerem a identificação de um papel não-convencional para GSDMD na limitação da produção de NO, o que parece ter um impacto significativo ao longo do curso da infecção pelo *T. gondii*.

3. REFERÊNCIAS:

1. Tyebji, S., Seizova, S., Hannan, A. J. & Tonkin, C. J. Toxoplasmosis: A pathway to neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **96**, 72–92 (2019).
2. Sasai, M. & Yamamoto, M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp. Mol. Med.* **51**, (2019).
3. Frickel, E.-M. & Hunter, C. A. Lessons from *Toxoplasma*: Host responses that mediate parasite control and the microbial effectors that subvert them. *J. Exp. Med.* **218**, (2021).
4. Zhu, W., Li, J., Pappoe, F., Shen, J. & Yu, L. Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to Survive in the Host. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
5. Yarovinsky, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 109–121 (2014).
6. Mendez, O. A. & Koshy, A. A. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathog.* **13**, 1–12 (2017).
7. Atmaca, H. T. *et al.* Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroscience* **269**, 184–191 (2014).
8. Suzuki, Y., Claflin, J., Wang, X., Lengi, A. & Kikuchi, T. Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **35**, 83–90 (2005).
9. Blanchard, N., Dunay, I. R. & Schlüter, D. Persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system: A fine-tuned balance between the parasite, the brain and the immune system. *Parasite Immunol.* **37**, 150–158 (2015).
10. Almeida, F. *et al.* *Toxoplasma gondii* chitinase induces macrophage activation. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
11. Andrade, W. A. *et al.* Combined action of nucleic acid-sensing toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host Microbe* **13**, 42–53 (2013).
12. Plattner, F. *et al.* *Toxoplasma* Profilin Is Essential for Host Cell Invasion and TLR11-Dependent Induction of an Interleukin-12 Response. *Cell Host Microbe* **3**, 77–87 (2008).
13. Koblansky, A. A. *et al.* Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* **38**, 119–130 (2013).
14. Scanga, C. A. *et al.* Cutting Edge: MyD88 Is Required for Resistance to *Toxoplasma gondii* Infection and Regulates Parasite-Induced IL-12 Production by Dendritic Cells. *J. Immunol.* **168**, 5997–6001 (2002).
15. Sukhumavasi, W. *et al.* TLR Adaptor MyD88 Is Essential for Pathogen Control during Oral *Toxoplasma gondii* Infection but Not Adaptive Immunity Induced by a Vaccine Strain of the Parasite. *J. Immunol.* **181**, 3464–3473 (2008).
16. Aliberti, J. *et al.* CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 α ⁺ dendritic cells. *Nat. Immunol.* **1**, 83–87 (2000).
17. Sher, A. *et al.* Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunologic Research* **27**, 521–527 (2003).
18. Gazzinelli, R. T. *et al.* Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **153**, 2533 LP – 2543 (1994).

19. Pfefferkorn, E. R., Eckel, M. & Rebhun, S. Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**, 215–224 (1986).
20. Nagineni, C. N., Pardhasaradhi, K., Martins, M. C., Detrick, B. & Hooks, J. J. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 4188–4196 (1996).
21. Behnke, M. S. *et al.* The Polymorphic Pseudokinase ROP5 Controls Virulence in *Toxoplasma gondii* by Regulating the Active Kinase ROP18. *PLoS Pathog.* **8**, e1002992 (2012).
22. Etheridge, R. D. *et al.* The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell Host Microbe* **15**, 537–550 (2014).
23. Olias, P., Etheridge, R. D., Zhang, Y., Holtzman, M. J. & Sibley, L. D. *Toxoplasma* Effector Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN- γ -Dependent Gene Expression. *Cell Host Microbe* **20**, 72–82 (2016).
24. Bando, H. *et al.* *Toxoplasma* effector TgIST targets host IDO1 to antagonize the IFN- γ -induced anti-parasitic response in human cells. *Front. Immunol.* **9**, 2073 (2018).
25. Du, J. *et al.* *Toxoplasma gondii* Virulence Factor ROP18 Inhibits the Host NF- κ B Pathway by Promoting p65 Degradation *. *J. Biol. Chem.* **289**, 12578–12592 (2014).
26. Butcher, B. A. *et al.* *Toxoplasma gondii* Rhopty Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. *PLoS Pathog.* **7**, e1002236 (2011).
27. Saeij, J. P. J., Boyle, J. P. & Boothroyd, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* **21**, 476–481 (2005).
28. Jorgensen, I., Rayamajhi, M. & Miao, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. **17**, 151–164 (2018).
29. Miao, E. A. *et al.* Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **11**, 1136–1142 (2010).
30. Liu, X., Xia, S., Zhang, Z., Wu, H. & Lieberman, J. Channelling inflammation: gasdermins in physiology and disease. (2021). doi:10.1038/s41573-021-00154-z
31. Snyder, A. G. & Oberst, A. The Antisocial Network: Cross Talk Between Cell Death Programs in Host Defense. *Annu. Rev. Immunol.* **39**, 77–101 (2021).
32. Cookson, B. T. & Brennan, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. *TRENDS Microbiol. J. Cereb. Blood Flow Metab. J. Exp. Med* **9**, 1099–1108 (2001).
33. Man, S. M., Karki, R. & Kanneganti, T. D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews* (2017). doi:10.1111/imr.12534
34. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407 (2016).
35. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
36. Babamale, A. O. & Chen, S. T. Nod-like Receptors: Critical Intracellular Sensors for Host Protection and Cell Death in Microbial and Parasitic Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, Vol. 22, Page 11398 **22**, 11398 (2021).
37. Lu, F. *et al.* Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases. *J. Cell. Physiol.* **235**, 3207–3221

- (2020).
38. Wang, Y., Zhu, J., Cao, Y., Shen, J. & Yu, L. Insight Into Inflammasome Signaling: Implications for *Toxoplasma gondii* Infection. (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.583193
 39. Jon A. Hagar, Daniel A. Powell, Youssef Achoui, Robert K. Ernst, and E. A. & Miao. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4- independent endotoxic shock. *PLoS One* **32**, 736–740 (2017).
 40. Kayagaki, N. *et al.* Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science (80-.)*. **130**, 1246–1249 (2013).
 41. Malik, A. & Kanneganti, T.-D. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J. Cell Sci.* **130**, 3955–3963 (2017).
 42. Sharma, B. R., Karki, R. & Kanneganti, T. D. Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. *Eur. J. Immunol.* **49**, 1998 (2019).
 43. Amarante-Mendes, G. P. *et al.* Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front. Immunol.* **9**, 1–19 (2018).
 44. Christgen, S., Place, D. E. & Kanneganti, T. D. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. *Cell Research* **30**, 315–327 (2020).
 45. Swanson, K. V., Deng, M. & Ting, J. P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology* **19**, 477–489 (2019).
 46. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y. & He, Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, (2019).
 47. Muñoz-Planillo, R. *et al.* K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* **38**, 1142–1153 (2013).
 48. Murakami, T. *et al.* Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 11282–11287 (2012).
 49. Groß, C. J. *et al.* K⁺ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* **45**, 761–773 (2016).
 50. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221–226 (2011).
 51. Iyer, S. S. *et al.* Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* **39**, 311–323 (2013).
 52. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847–856 (2008).
 53. Chen, J. & Chen, Z. J. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **564**, 71–76 (2018).
 54. He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B. & Núñez, G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* **530**, 354–357 (2016).
 55. Schmid-Burgk, J. L. *et al.* A genome-wide CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) screen identifies NEK7 as an essential component of NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* **291**, 103–109 (2016).
 56. Samir, P. *et al.* DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome. *Nature* **573**, 590–595 (2019).
 57. Freeman, L. *et al.* NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *J. Exp. Med.* **214**, 1351–1370 (2017).
 58. Tavares, A. H., Bürgel, P. H. & Bocca, A. L. Turning Up the Heat: Inflammasome

- Activation by Fungal Pathogens. *PLoS Pathog.* **11**, e1004948 (2015).
59. Ni Liang, Yan-Ping Yang, W. L. *et al.* Overexpression of NLRP3, NLRC4 and AIM2 inflammasomes and their priming -associated molecules (TLR2, TLR4, Dectin -1, Dectin -2 and NFκB) in Malassezia folliculitis. *Int. J. Lab. Hematol.* **38**, 42–49 (2016).
 60. Gorfu G Fau - Cirelli, K. M. *et al.* Dual Role for Inflammasome Sensors NLRP1 and NLRP3 in Murine Resistance to Toxoplasma gondii. LID - 10.1128/mBio.01117-13 [doi] LID - e01117-13 [pii]. *MBio* **5**, 1–12 (2014).
 61. Ewald, S. E., Chavarria-Smith, J. & Boothroyd, J. C. NLRP1 is an inflammasome sensor for Toxoplasma gondii. *Infect. Immun.* **82**, 460–468 (2014).
 62. Witola, W. H. *et al.* NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of Toxoplasma gondii-infected monocytic cells. *Infect. Immun.* **79**, 756–766 (2011).
 63. Gov, L., Karimzadeh, A., Ueno, N. & Lodoen, M. B. Human innate immunity to Toxoplasma gondii is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. *MBio* (2013). doi:10.1128/mBio.00255-13
 64. Cirelli, K. M. *et al.* Inflammasome Sensor NLRP1 Controls Rat Macrophage Susceptibility to Toxoplasma gondii. *PLoS Pathog.* **10**, e1003927 (2014).
 65. Cavailles, P. *et al.* A Highly Conserved Toxo1 Haplotype Directs Resistance to Toxoplasmosis and Its Associated Caspase-1 Dependent Killing of Parasite and Host Macrophage. *PLoS Pathog.* **10**, e1004005 (2014).
 66. Chu, J. Q. *et al.* Production of IL-1β and inflammasome with Up-regulated expressions of NOD-like receptor related genes in toxoplasma gondii-infected THP-1 macrophages. *Korean J. Parasitol.* **54**, 711–717 (2016).
 67. Pandori, W. J. *et al.* Toxoplasma gondii activates a Syk-CARD9-NF-κB signaling axis and gasdermin D independent release of IL-1β during infection of primary human monocytes. *PLoS Pathog.* **15**, 1–24 (2019).
 68. Quan, J. H. *et al.* P2X7 receptor mediates NLRP3-dependent IL-1β secretion and parasite proliferation in Toxoplasma gondii-infected human small intestinal epithelial cells. *Parasit. Vectors* **11**, (2018).
 69. Lees, M. P. *et al.* P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, Toxoplasma gondii, by human and murine macrophages. *J. Immunol.* **184**, 7040 (2010).
 70. Shaw, M. H. *et al.* T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to Toxoplasma gondii. *Nat. Immunol.* **2009 1012** **10**, 1267–1274 (2009).
 71. Fisch, D. *et al.* Human GBP 1 is a microbe-specific gatekeeper of macrophage apoptosis and pyroptosis. *EMBO J.* (2019). doi:10.15252/embj.2018100926
 72. Coutermarsh-Ott, S. L. *et al.* Caspase-11 Modulates Inflammation and Attenuates Toxoplasma gondii Pathogenesis. (2016). doi:10.1155/2016/9848263
 73. Bando, H. *et al.* Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for Toxoplasma GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response. *MBio* **9**, (2018).
 74. Jorgensen, I. Pyroptotic Cell Death Defends Against Intracellular Pathogens. *Immunol. Rev.* **265**, 130–142 (2016).
 75. Jorgensen, I., Zhang, Y., Krantz, B. A. & Miao, E. A. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *J. Exp. Med.* **213**, 2113–2128 (2016).
 76. Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666–671 (2015).

77. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
78. He, W. T. *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res.* **25**, 1285–1298 (2015).
79. Man, S. M. & Kanneganti, T. D. Gasdermin D: The long-awaited executioner of pyroptosis. *Cell Res.* **25**, 1183–1184 (2015).
80. Liu, X. & Lieberman, J. Knocking 'em Dead: Pore-Forming Proteins in Immune Defense. *Annu. Rev. Immunol.* **38**, 455–485 (2020).
81. Kayagaki, N. *et al.* IRF2 transcriptionally induces GSDMD expression for pyroptosis. *Sci. Signal.* **12**, (2019).
82. Aglietti, R. A. *et al.* GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 7858–7863 (2016).
83. Ding, J. *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* **535**, 111–116 (2016).
84. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
85. Sborgi, L. *et al.* GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* **35**, 1766–1778 (2016).
86. Evavold, C. L. *et al.* The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* **48**, 35-44.e6 (2018).
87. Kuriakose, T. & Kanneganti, T. D. Gasdermin D Flashes an Exit Signal for IL-1. *Immunity* **48**, 1–3 (2018).
88. Rühl, S. *et al.* ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science (80-.).* **362**, 956–960 (2018).
89. Lieberman, J., Wu, H. & Kagan, J. C. Gasdermin D activity in inflammation and host defense. *Sci. Immunol.* **4**, 1–9 (2019).
90. Rühl, S. & Broz, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁺ efflux. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2927–2936 (2015).
91. Wang, J., Deobald, K. & Re, F. Gasdermin D Protects from Melioidosis through Pyroptosis and Direct Killing of Bacteria. *J. Immunol.* **202**, 3468–3473 (2019).
92. Hiroto Kambara *et al.* Gasdermin D Exerts Anti-inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death. *Cell Rep.* **176**, 139–148 (2018).
93. Sollberger, G. *et al.* Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* **3**, 6689 (2018).
94. Kayagaki, N. *et al.* NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature* (2021). doi:10.1038/s41586-021-03218-7
95. Monteleone, M. *et al.* Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep.* **24**, 1425–1433 (2018).
96. Rashidi, M. *et al.* The Pyroptotic Cell Death Effector Gasdermin D Is Activated by Gout-Associated Uric Acid Crystals but Is Dispensable for Cell Death and IL-1 β Release. *J. Immunol.* (2019). doi:10.4049/jimmunol.1900228
97. Henry, T. & Monack, D. M. Activation of the inflammasome upon *Francisella tularensis* infection: Interplay of innate immune pathways and virulence factors. *Cell. Microbiol.* **9**, 2543–2551 (2007).
98. Ming Man, S. *et al.* Differential roles of caspase-1 and caspase-11 in infection and inflammation. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
99. Kayagaki, N. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117–121 (2011).

100. Wang, W. *et al.* Endotoxemic acute renal failure is attenuated in caspase-1-deficient mice. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **288**, 997–1004 (2005).
101. Terra, J. K. *et al.* Cutting Edge: Resistance to Bacillus anthracis Infection Mediated by a Lethal Toxin Sensitive Allele of Nalp1b/Nlrp1b . *J. Immunol.* **184**, 17–20 (2010).
102. Qifan Zhu, Zheng, M., Balakrishnan, A., Karki, R. & Kanneganti, T.-D. Gasdermin D promotes AIM2 inflammasome activation and is required for host protection against Francisella novicida. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2016).
103. Cerqueira, D. M. *et al.* Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to Brucella abortus infection. *PLoS Pathog.* **14**, (2018).
104. Estfanous, S. *et al.* Gasdermin D restricts Burkholderia cenocepacia infection in vitro and in vivo. *Sci. Reports 2021 111* **11**, 1–20 (2021).
105. Batista, S. J. *et al.* Gasdermin-D-dependent IL-1 α release from microglia promotes protective immunity during chronic Toxoplasma gondii infection. *Nat. Commun.* (2020). doi:10.1038/s41467-020-17491-z
106. Dubois, H. *et al.* Nlrp3 inflammasome activation and Gasdermin D-driven pyroptosis are immunopathogenic upon gastrointestinal norovirus infection. *PLoS Pathog.* **15**, 1–22 (2019).
107. Beckwith, K. S. *et al.* Plasma membrane damage causes NLRP3 activation and pyroptosis during Mycobacterium tuberculosis infection. *Nat. Commun.* **11**, 1–18 (2020).
108. Kuriakose, T. & Kanneganti, T.-D. Pyroptosis in Antiviral Immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (2019). doi:10.1007/82_2019_189
109. de Carvalho, R. V. H. & Zamboni, D. S. Inflammasome Activation in Response to Intracellular Protozoan Parasites. *Trends in Parasitology* **36**, 459–472 (2020).
110. Riestra, A. M. *et al.* Trichomonas vaginalis Induces NLRP3 Inflammasome Activation and Pyroptotic Cell Death in Human Macrophages. *J. Innate Immun.* **11**, 86 (2018).
111. Quach, J., Moreau, F., Sandall, C. & Chadee, K. Entamoeba histolytica-induced IL-1 β secretion is dependent on caspase-4 and gasdermin D. *Mucosal Immunol.* **12**, 323–339 (2019).
112. Goebel S, Gross U, L. C. Inhibition of host cell apoptosis by Toxoplasma gondii is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression - PubMed. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11682609/>. (Accessed: 15th November 2021)
113. Hippe, D., Lytovchenko, O., Schmitz, I. & Lüder, C. G. K. Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by Toxoplasma gondii primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. *Infect. Immun.* **76**, 2905–2912 (2008).
114. Quan, J. H. *et al.* Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent Bad phosphorylation in Toxoplasma gondii-mediated inhibition of host cell apoptosis. *Exp. Parasitol.* **133**, 462–471 (2013).
115. Hwang, I. Y. *et al.* Toxoplasma gondii infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitol. Res.* **107**, 1313–1321 (2010).
116. Graumann, K. *et al.* Toxoplasma gondii inhibits cytochrome c-induced caspase activation in its host cell by interference with holo-apoptosome assembly. *Microb. Cell* **2**, 150 (2015).

117. Bannai, H. *et al.* Overproduction of the pro-apoptotic molecule, programmed cell death 5, in *Toxoplasma gondii* leads to increased apoptosis of host macrophages. *J. Vet. Med. Sci.* **71**, 1183–1189 (2009).
118. Bannai, H. *et al.* Programmed Cell Death 5 from *Toxoplasma gondii*: A secreted molecule that exerts a pro-apoptotic effect on host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **159**, 112–120 (2008).
119. Rosenberg, A. & Sibley, L. D. *Toxoplasma gondii* secreted effectors co-opt host repressor complexes to inhibit necroptosis. *Cell Host Microbe* **29**, 1186-1198.e8 (2021).
120. Place, D. E. & Kanneganti, T. D. Metabolic regulation of pyroptotic cell death expands the therapeutic landscape for treating inflammatory disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2021). doi:10.1038/s41392-021-00467-w
121. Rathkey, J. K. *et al.* Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis. *Sci. Immunol.* (2018). doi:10.1126/sciimmunol.aat2738
122. Hu, J. J. *et al.* FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation. *Nat. Immunol.* (2020). doi:10.1038/s41590-020-0669-6
123. Humphries, F. *et al.* Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science (80-.).* (2020). doi:10.1126/science.abb9818