

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**  
**Curso de Biomedicina**

**Mariana Donnantuoni Degello**

**UTILIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE  
MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DE INFLAMASSOMAS A PARTIR  
DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* E OUTROS ESTÍMULOS**

**São Paulo**  
**2019**

**Mariana Donnantuoni Degello**

**UTILIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE  
MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DE INFLAMASSOMAS A PARTIR  
DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* E OUTROS ESTÍMULOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa Dra. Renata Cristina Pardos Baida, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo**

**2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Radrizzani**

Degello, Mariana Donnantuoni

Utilização de camundongos geneticamente modificados para avaliação de inflamassomas a partir da infecção por *Trypanosoma cruzi* e outros estímulos / Mariana Donnantuoni Degello. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.

47 p.

Orientação de Renata Cristina Pardos Baida.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2019.

1. Camundongos endogâmicos C57BL 2. Citocinas 3. Inflamassomos  
4. Receptores de reconhecimento de padrão 5. *Trypanosoma cruzi* I.  
Baida, Renata Cristina Pardos II. Centro Universitário São Camilo III.  
Título

CDD: 573.21

**Mariana Donnantuoni Degello**

**UTILIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE  
MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DE INFLAMASSOMAS A PARTIR  
DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* E OUTROS ESTÍMULOS**

São Paulo, 18 de novembro de 2019

---

Professora Orientadora – Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Cristina Pardos Baida Andreoli

---

Professor Examinador - Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima

Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio e Marta que sempre batalharam pela minha educação, apoiando meus estudos e todas as minhas escolhas. Ao meu irmão, Sergio por tanto companheirismo e incentivo. À toda minha família que vibra pelo meu sucesso. Vocês são fundamentais!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, sou grata às oportunidades da vida, aos caminhos que me foram dados para que eu trilhasse da melhor forma buscando sempre evoluir e ser melhor todos os dias.

Quero agradecer aos responsáveis por tornar o sonho da Biomedicina e tantos outros sonhos reais em minha vida, meus pais. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por me proporcionarem o melhor sempre, por tanto cuidado e dedicação. Vocês não medem esforços para ver eu e meu irmão felizes. Obrigada Sergio, pelas conversas e risadas, por compartilhar histórias, momentos e por ser apoio. Vocês são a base de tudo.

Obrigada à minha professora orientadora, Renata, que desde meu primeiro semestre de faculdade se fez muito presente. Sempre incentivando minhas ideias e ajudando a torná-las reais. Você é inspiração.

Obrigada a todos do laboratório CTCMol, onde me inspirei para escrever esse trabalho. Lá tive o prazer de conhecer e conviver com pessoas maravilhosas. Obrigada professora Karina pelas oportunidades de que me deu e por todos os ensinamentos. Obrigada Priscila e Laurinha pela guarda compartilhada, pela paciência, por me ensinarem tanto e pela amizade, eu admiro muito vocês. Obrigada Felipe, por tantos momentos bons, por pegar no meu pé e se preocupar comigo como irmão. Obrigada Tuty por compartilhar seus conhecimentos e por fazer tudo ser mais leve apenas com sua risada contagiante. Obrigada Luiza, Ingrid e Lari por dividirem a IC comigo e compartilhar nossas angústias e alegrias. Obrigada Suellen, por me mostrar o tamanho do seu coração, ter sua amizade é um privilégio, você é incrível amiga, uma das mulheres mais inteligentes que conheço, obrigada por sempre me ajudar tanto. Obrigada Barbara, Isaú, Marcelo, Camila e Kely pelas histórias e por dividirem os dias no lab comigo, vocês são maravilhosos e excelentes profissionais.

Carol, agradecer você é no mínimo difícil. Obrigada por tanto incentivo, por aceitar co-orientar esse trabalho, por ouvir minhas histórias infinitas e estar sempre pronta para me dar os conselhos mais sinceros. Confio em você absurdos e morro de saudades de você todos os dias. Você é meu exemplo de profissional.

Biomédica, Doutora esforçada, dedicada e muito focada em tudo que se propõe a fazer.

Obrigada às amizades que fiz durante o curso. Conheci pessoas essenciais que me ajudam a chegar cada vez mais longe, que dividem angústias e compartilham alegrias. Obrigada Bia pelo companheirismo, Duda e Dani por tantas risadas e histórias, Lara por me ouvir tanto e me incentivar sempre. Obrigada Thaly, minha companheira, meu ponto de paz e dupla da vida, espero que saiba o quanto é importante na minha vida. Obrigada Kath, parceira de tudo, o jeito que nos ajudamos nessa vida é muito particular e eu sou eternamente grata por cada momento...Que venham mais histórias!

Obrigada às meninas do centro de pesquisa clínica. Marina, Mariana, Tatiana, Caroline e July. Foi um ano de estágio transformador. Vocês são incríveis e sou muito grata por cada ensinamento e conselho, por mostrarem caminhos novos e por iniciarem minha carreira profissional da melhor forma possível. Carol, gostaria que soubesse o tanto que me inspira, dividir as tarefas com você é um prazer, você sensacional. Ah... July, não esqueci em haha. Obrigada por me ajudar no pré-projeto e pelas sugestões no texto do trabalho.

Por fim, obrigada a todos que passaram pela minha vida nesses 4 anos de curso. Conheci muitas pessoas que me mostraram como ser melhor. Aprendi lições valiosas que levarei para a vida toda.

*“Eu vou indo e vou fluindo, evoluindo num voo lindo.”*

*- Autor desconhecido.*

## RESUMO

A partir da evolução da biologia molecular e o desenvolvimento de técnicas de alteração de genoma, foi possível gerar animais geneticamente modificados onde, a partir de então, muitos processos naturais do organismo puderam ser elucidados. Dentre a ampla gama de assuntos à serem estudados e, com a utilização desses animais, pesquisadores trabalham a fim de obter mais informações a respeito dos inflamassomas, um complexo multiproteico intracelular que atua na ativação de enzimas, que são essenciais para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e no reconhecimento de sinais de infecções como as provocadas pela doença de Chagas, doença causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudos recentes confirmaram o envolvimento da ativação do inflamassoma como sendo dependente no controle da infecção do hospedeiro. Além disso, os inflamassomas estabelecem uma ligação estreita com inflamações patológicas, uma vez que há ativação de vias de morte celular. Logo, o conhecimento deste complexo se torna importante por ser um alvo potencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças de base inflamatória.

**Palavras-chave:** 1. Camundongos endogâmicos C57BL 2. Citocinas  
3. Inflamassomos 4. Receptores de reconhecimento de padrão 5. *Trypanosoma cruzi*

## ABSTRACT

From the evolution of molecular biology and the development of genome alteration techniques, it was possible to generate genetically modified animals where, since then, many natural processes of the organism could be elucidated. Among a wide range of subjects to be studied, and with the use of these animals, researchers are seeking more information about the respect of inflammasomes, an intracellular multiprotein complex that acts on the activity of enzymes, which are essential for immunity under conditions. physiological and without recognition of signs of infections as caused by Chagas disease, a disease caused by *Trypanosoma cruzi*. Recent studies confirm or activate the inflammasome as being dependent on the control of host infection. In addition, inflammasomes establish a limited link with pathological inflammation as there is activation of cell death pathways. Therefore, knowledge of this complex becomes important as it is a potential target for the development of therapeutic strategies for inflammatory diseases.

**Keywords:** 1. C57BL inbred mice 2. Cytokines 3. Inflammation 4. Pattern recognition receptors 5. *Trypanosoma cruzi*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características do modelo experimental C57BL/6.....	16
Figura 2 - Ciclo celular do <i>T. cruzi</i> .....	19
Figura 3 - Receptores do sistema imunológico inato .....	24
Figura 4 - Classificação e estrutura proteica da família de receptores NOD .....	26
Figura 5 - Bases da piroptose .....	30
Figura 6 - Mecanismos efetores mediados pela caspase-1 ativa.....	31
Figura 7 - Componentes do inflamassoma formado por NLRP3.....	32
Figura 8 - Componentes dos inflamassomas formados por NLRC4 e NAIP.....	33
Figura 9 - Ativação do inflamassoma NLRP3 em resposta à infecção por <i>T. cruzi</i> ...	38
Figura 10 - Ativação de NLRP3 induzida por <i>T. cruzi</i> .....	39
Figura 11 - Ativação de macrófagos isolados frente a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	40

## LISTA DE SIGLAS

PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
TLR	Receptores do tipo Toll
NLR	Receptores do tipo NOD
NOD	Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa beta
NLRA	Domínio que contém AD
NLRB	Domínio que contém BIR
NLRC	Domínio que contém CARD
NLRP	Domínio que contém PIRINA
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-18	Interleucina 18
IFN- $\gamma$	Interferon gama
ATP	Adenosina trifosfato
CARD	Domínio de recrutamento da caspase
RLRs	Receptores tipo RIG
MDA5	Gene associado à diferenciação de melanoma 5
PYHIN	Proteína contendo domínio PIRINA e HIN
ASC	Proteína <i>speck-like</i> associada à apoptose contendo CARD
LRR	Domínio rico em repetição de leucina
TNF	Fator de necrose tumoral
IRFs	Fator Regulador de Interferon
NAIP	Proteína Inibidora da Apoptose Neuronal
T3SSs	Sistema de secreção tipo 3
PYD	Domínio Pirina

## LISTA DE ABREVIÇÕES

LPS	Lipopolissacarídeos
WT	<i>Wild-type</i> (selvagem)
KO	Knockouts
FLI	Flagelina
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
NO	Óxido nítrico
GSDMD	Gasdermina D
K <sup>+</sup>	Potássio
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
ROS/EROs	Espécies reativas de oxigênio

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Animais geneticamente modificados.....	14
1.2 Camundongos C57BL/6.....	15
1.3 Sistema imunológico.....	16
1.4 Aspectos gerais e reconhecimento imunológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 METODOLOGIA.....	22
4 DESENVOLVIMENTO.....	23
4.1 Imunidade natural ou inata e seus receptores de reconhecimentos.....	23
4.2 Ativação de inflamassomas e morte celular.....	26
4.3 Fagócitos.....	35
4.3.1 Macrófagos peritoneais.....	36
4.4 Estudos de inflamassoma envolvendo a utilização de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.....	37
4.5 Imunidade inata no controle da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Animais geneticamente modificados

A partir do século XIX os modelos experimentais de camundongos passaram a ser utilizados em trabalhos acadêmicos e na ciência para explorar estudos genéticos (CHORILLI *et al.*, 2017). Em 1909, o pesquisador geneticista Clarence Cook Little iniciou, por meio de acasalamento entre irmãos, a primeira linhagem consanguínea (*inbred*) geneticamente pura a partir de um casal de camundongos portadores de mutações recessivas para os genes responsáveis pela cor da pelagem (KEANE *et al.*, 2011).

Após a década de 80, diversas técnicas para obtenção de animais geneticamente modificados foram desenvolvidas e aperfeiçoadas, resultando na geração de novos modelos a serem explorados. Animais geneticamente modificados são linhagens cujo genoma foi artificialmente alterado pela engenharia genética. Dentre as metodologias utilizadas na biologia molecular para recombinação homóloga em células-tronco embrionárias (ES, do inglês, *Embryonic Stem Cell*), podemos citar brevemente: 1) Microinjeção no pró-núcleo: consiste na introdução de uma solução de DNA no pró-núcleo de um oócito. 2) Transgênese mediada por ES: baseia-se na diferenciação inicial de ES e posterior introdução dessas células no embrião em fase de mórula ou blastocisto. 3) Mecanismos de infecção por retrovírus: nos quais o DNA exógeno é inserido em um vetor retroviral que posteriormente será injetado no oócito fertilizado (ABDELHAY, 2002).

Há também a técnica de CRISPR (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Recentemente desenvolvida, CRISPR-Cas9 é utilizada para alteração de genoma a partir de sistemas de acionamento genético altamente eficientes. Resumidamente, a técnica possibilita a edição do genoma através de clivagem do DNA pela endonuclease Cas9. As alterações observadas em camundongos influenciam a herança dos alelos desejáveis o que torna esses animais potencialmente aplicáveis em pesquisas (GRUNWALD *et al.*, 2019).

Entre os animais geneticamente modificados, podemos encontrar mais frequentemente os transgênicos, que são distribuídos em quatro categorias: transgênicos por adição, nos quais o genoma foi modificado pela introdução de sequências de DNA de outro organismo; nocautes (KO, do inglês, *knockouts*),

modificação genética capaz de interromper ou anular um ou mais genes, impedindo sua expressão; *knockin*, onde a modificação de um ou mais genes gera a superexpressão dos mesmos e, por último, os animais *single knockouts*, onde se retira apenas uma fita de seu gene, normalmente esse processo é realizado para estudar genes que são essenciais para sobrevivência do animal avaliando assim o impacto da alteração. Tais variações são capazes de modificar em parte ou a totalidade o genoma de diferentes organismos de forma hereditária, ou seja, transmitindo aos seus descendentes as modificações de seu material genético (VALONES *et al.*, 2009).

A confirmação dos filhotes transgênicos é efetuada um mês após o nascimento. O material biológico desses animais é submetido à análise de DNA por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês: *Polymerase Chain Reaction*), técnica qualitativa que permite a visualização da amplificação do(s) gene(s) em bandas de DNA por meio de eletroforese (VALONES *et al.*, 2009).

Como mostrado acima, as técnicas de engenharia genética permitem diversas alterações no genoma. Possibilitam a geração de diferentes linhagens experimentais, que podem ser exploradas pela ciência para explicar seus fenótipos, contribuindo para ciência básica e entendimento fisiológico das doenças (ABDELHAY, 2002).

## **1.2 Camundongos C57BL/6**

Para o avanço das pesquisas, camundongos selvagens isogênicos *inbred* C57BL/6 são comumente empregados em estudos de oncologia, embriologia, citologia, toxicologia e imunologia, principalmente por representarem modelos experimentais de muitas condições patológicas humanas, além de sua utilização para o desenvolvimento de modelos transgênicos, foi também a primeira linhagem a ter seu genoma sequenciado e é amplamente utilizado para a contextualização de camundongos transgênicos e mutantes (MATSUO *et al.*, 2010). Suas principais características estão descritas na imagem 1.

**Figura 1 - Características do modelo experimental C57BL/6.**



Espécie: *Mus musculus*  
Ordem: Rodentia  
Família: Muridae  
Raça: C57BL/6  
Pelagem: Preto  
Genótipo: *a/a* (recessivo)  
Longevidade (dias): 561-fêmeas e 539-machos  
Performance reprodutiva: Ninhada média de 6-8 crias  
Desmame: Vigésimo dia pós-nascimento

Fonte: Adaptado de (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002)

Nota: Descrição das principais características dos Camundongos C57BL/6.

Essa linhagem possui os sistemas fisiológico e imunológico, bem como o mapa genético bem definidos, o que faz dos camundongos modelos ideais para a investigação patógeno-hospedeiro. Com a melhoria das técnicas de alteração genética, houve grandes avanços nos estudos em imunologia, anteriormente uma ciência meramente descritiva, cujos fenômenos puderam ser explicados em termos estruturais e bioquímicos. A utilização de camundongos como modelos genéticos revelou os detalhes mecanicistas importantes que sustentam as atividades inflamatórias, possibilitando um melhor entendimento das dinâmicas de funcionamento do sistema (KANNEGANTI, 2015).

### **1.3 Sistema imunológico**

O sistema imunológico tem como principal função fisiológica manter a homeostase do organismo, impedindo a atividade de micro-organismos infecciosos. Substâncias não infecciosas como o ATP proveniente de danos teciduais também podem desencadear reações imunológicas. De maneira inclusiva, podemos definir o sistema imunológico como uma reação aos componentes de micro-organismos e macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As células que compõem o sistema imunológico possuem papéis especializados frente a diferentes estímulos. Dentre a variedade celular do organismo, podemos citar os leucócitos: neutrófilos, monócitos/macrófagos, mastócitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas e os linfócitos. Os leucócitos podem ser subdivididos em células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen-Presenting Cell*), como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. A organização anatômica dessas células é de extrema importância, uma vez que suas habilidades em circular entre corrente sanguínea, linfa e sangue são cruciais para gerar respostas protetoras efetivas (SIMON; HOLLANDER; MCMICHAEL, 2015).

Respostas imunológicas dispõem de secreção de compostos como citocinas, que são proteínas com diversas estruturas e funções que regulam e coordenam a atividade celular por meio de reconhecimento por receptores específicos. Tais proteínas podem atuar na diferenciação de células do sistema imunológico, ativação das funções efetoras de linfócitos e fagócitos e movimento de migração celular. A nomenclatura dessas proteínas é variada, podendo ser interleucina seguida por um número, como, por exemplo, a IL-18. Também pode ser designada de acordo com sua atividade biológica, como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês: *Tumor necrosis factor*) e, por fim, há também os interferons e as quimiocinas (CHOW; BROWN; MERAD, 2011).

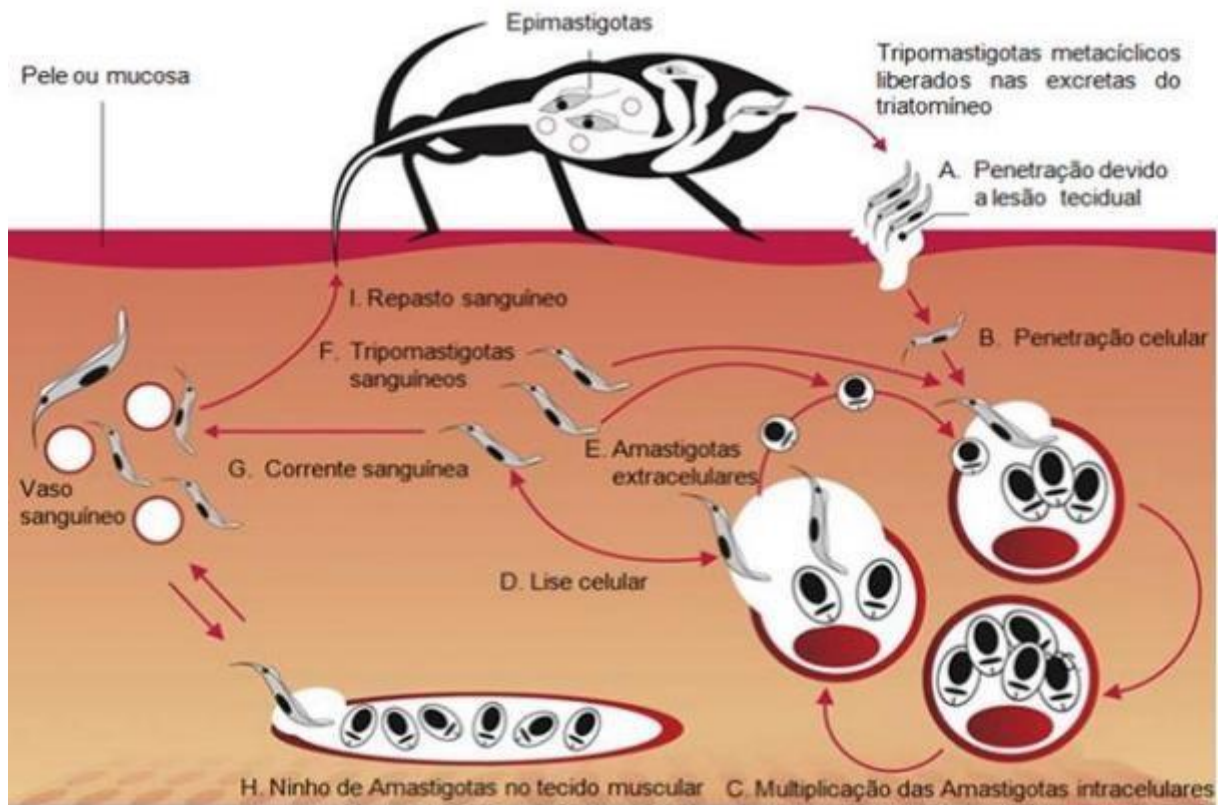
Os mecanismos naturais de uma reação imunológica consistem basicamente em dois tipos de resposta, a imunidade natural ou inata e a adaptativa ou adquirida. A primeira fornece a defesa inicial contra infecções, sendo os macrófagos, neutrófilos e células NK (do inglês: *natural killer*) as principais células ativas nessa resposta e o sistema complemento. A segunda resposta, desenvolve-se algumas horas após a apresentação do patógeno pelas células APCs, apresentando uma resposta específica para diferentes micro-organismos e moléculas. A resposta adaptativa é importante para a ativação de linfócitos e seus produtos, como anticorpos, que amplificam a resposta contra o patógeno e induzem a memória imunológica. Sabe-se que as respostas imunológicas natural e adaptativa são imprescindíveis para conter infecções como, por exemplo, por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Zamboni e Lima (2015) avaliaram a ativação de proteínas que compõem um complexo multiproteico utilizando a infecção por *T. cruzi* como modelo de estudo.

#### **1.4 Aspectos gerais e reconhecimento imunológico do *Trypanosoma cruzi***

Os estudos em modelos experimentais mostraram que macrófagos desempenham um papel importante no controle da infecção por *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, moléstia de alta prevalência na América Latina e que possui cerca de oito milhões de casos registrados, tornando-se uma doença de alta relevância para a saúde pública (WHO, 2017).

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado intracelular da família Trypanosomatidae, com características principais como flagelo, corpo alongado ou arredondado e cinetoplasto. Possui dois estágios diferenciados no hospedeiro mamífero que são a forma tripomastigota flagelada, localizada no meio extracelular e que infecta células nucleadas do hospedeiro mamífero, e sua forma replicável, o amastigota, como esquematizado na figura 2 (NEVES; MELO; LINARDI, 2011).

Figura 2 - Ciclo celular do *T. cruzi*



Fonte: Adaptado de (LIMA et al., 2010).

Nota: As formas epimastigotas presentes no intestino médio do triatomíneo (vetor hematófago) diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são liberadas nas excretas durante o repasto sanguíneo e penetram nas células (fagocíticas e não-fagocíticas) do hospedeiro mamífero, por meio de lesão tecidual (A, B). O parasito é internalizado permanecendo no vacúolo parasitóforo, onde a partir de mecanismos de evasão, o parasito distribui-se no citoplasma da célula hospedeira, diferencia-se em amastigotas que sofrem sucessivas divisões binárias (C). Amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos (F). As amastigotas são liberadas após o rompimento celular, atingindo a corrente sanguínea e infectando outras células e tecidos (G, H) ou outros triatomíneos, caso haja novo repasto sanguíneo (I). Alternativamente, amastigotas que são prematuramente liberadas das células infectadas, também podem invadir células e sustentar assim um ciclo infeccioso (E).

A invasão do parasita em macrófagos pode ser independente de fagocitose. Com a internalização do parasita, pode ocorrer a fusão do fagossomo com lisossomo, resultando no fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo, local onde o parasita pode ser degradado. Este processo é dependente de vias de sinalização de cálcio, fornecendo membranas para a formação do vacúolo parasitóforo, onde os tripomastigotas são inicialmente contidos (TARDIEUX, 1994). Estes parasitas podem evadir-se para o citosol e se replicar de forma binária. Os amastigotas podem se diferenciar em tripomastigotas sanguíneos rompendo a membrana celular, atingindo

a corrente sanguínea, dispersando-se e infectando outros tecidos ou novos vetores por repasto sanguíneo (LIMA *et al.*, 2010).

O reconhecimento do *T. cruzi* pelos macrófagos ocorre por meio dos receptores de reconhecimento de padrões associados a patógenos. Diferentes componentes do *T. cruzi* são reconhecidos pelos receptores semelhantes a Toll (TLR, do inglês: *Toll like receptor*), incluindo âncoras de glicosilfosfatidilinositol e glicoinositolfosfolípidios, RNA e DNA presentes no *T. cruzi*. A partir do reconhecimento do parasita, inicia-se a cascata de sinalização com a ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (do inglês: *Nuclear Factor Kappa B*), culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (NO), um importante agente anti-tripanosomal. Além disso, esta célula pode destruir o parasita apresentando seus epítopos via MHCII aos linfócitos T CD4+, seguidos de moléculas co-estimulatórias e citocinas pró-inflamatórias, o que leva à ativação e diferenciação dos linfócitos T CD4+ em perfil T-helper 1 (Th1). Há também o reconhecimento pelos receptores de tipo NOD (NLRs, do inglês: *NOD-like receptors*), resultando no processo de recrutamento de proteínas que se oligomerizam formando o complexo multiproteico denominado inflamassoma, que uma vez ativado amplifica a resposta inflamatória (FRANCHI *et al.*, 2009).

Zamboni e Lima descreveram, em 2015, que compreender esses processos pode colaborar com o desenvolvimento de novos métodos tanto para combater infecções quanto para evitar uma inflamação exacerbada e lesiva ao organismo. Por isso, faz-se necessário o entendimento das funções dos inflamassomas e suas regulações, uma vez que são fundamentais para o avanço da elaboração de estratégias terapêuticas. Um dos métodos aplicados para compreensão desses processos é a utilização de macrófagos peritonais de camundongos geneticamente modificados, onde as células são mantidas em cultura e, posteriormente, submetidas a estímulos inflamatórios para que seja possível observar os componentes de ativação dos inflamassomas. A presença de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante da cultura celular indica a atividade deste complexo multiproteico, como será detalhado a seguir.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Realizar uma revisão bibliográfica a fim de elucidar a utilização de camundongos geneticamente modificados em estudos de pesquisa que citam os complexos multiproteicos, conhecidos como inflamassomas, para discutir sua ativação em macrófagos peritoneais a partir da resposta a infecção por *T. cruzi*.

### 2.2 Objetivos específicos

- I. Realizar levantamento bibliográfico sobre a utilização de camundongos em laboratórios de pesquisa.
- II. Descrever a importância da pesquisa com *T. cruzi* abordando aspectos gerais de sua morfologia e ciclo de vida.
- III. Sintetizar e discutir informações a respeito do sistema imunológico bem como ativação de inflamassomas, principalmente NLRP3 e NLRC4.
- IV. Abordar as principais aplicações, na pesquisa acadêmica, dos macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, tanto para camundongos selvagens (*wild-type*) como geneticamente modificados.
- V. Citar pesquisas recentes realizadas a partir da infecção de macrófagos peritoneais de animais geneticamente modificados para discutir a ativação do inflamassoma NLRP3.

### 3 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica com base em artigos científicos obtidos a partir dos portais de revistas eletrônicas, tais como: SciELO, PubMed, LILACS e por meio do uso de ferramentas de busca como o Google Acadêmico. Utilizando os descritores: Inflamassomos, citocinas, receptores de reconhecimento padrão, piroptose, C57BL/6, macrófagos peritoneais e *T. cruzi*. Os artigos científicos selecionados estavam nos idiomas português e inglês. Além disso foram utilizados livros didáticos impressos do Sistema integrado de Bibliotecas Pe. Inocente Radrizzani do Centro Universitário São Camilo, bem como livros digitais. Não houve delimitação de data.

## 4 DESENVOLVIMENTO

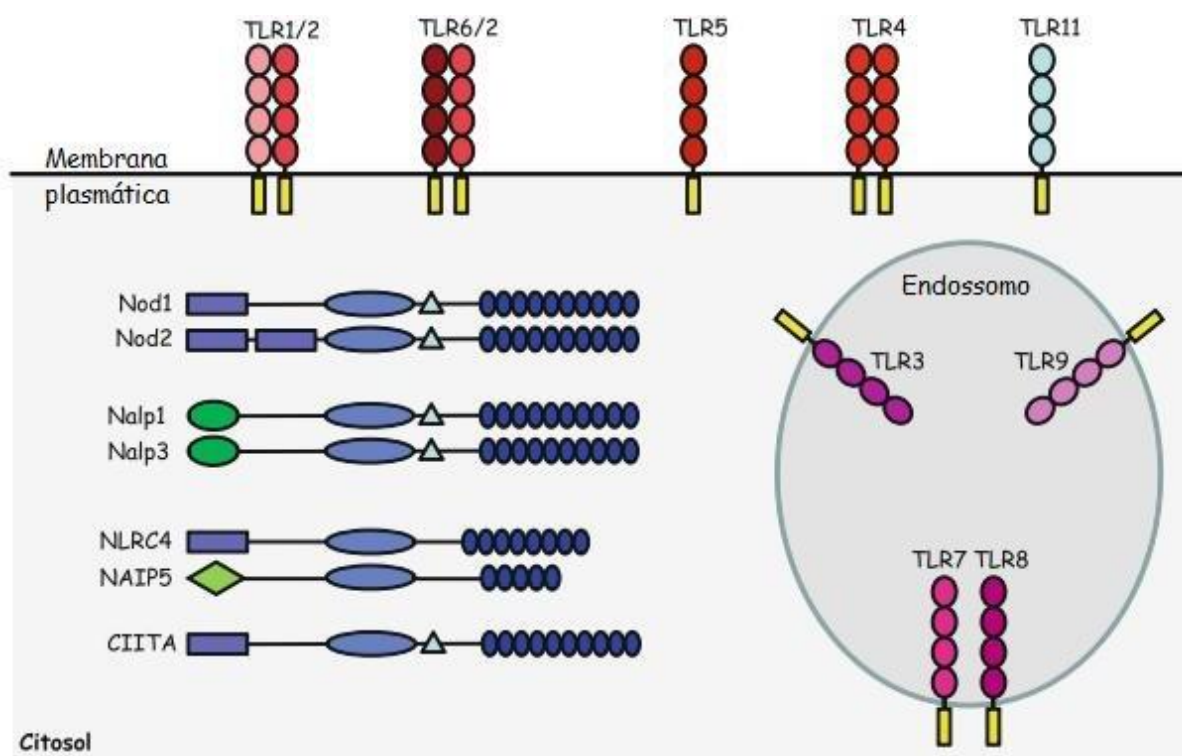
### 4.1 Imunidade natural ou inata e seus receptores de reconhecimentos

Como descrito por Abbas, Lichtman e Pillai (2015), a imunidade inata é induzida como resposta inicial contra a micro-organismos, impedindo ou controlando a infecção do hospedeiro. Como é a primeira linha de defesa contra infecções, os mecanismos da imunidade inata encontram-se estabelecidos e dispostos a qualquer sinal de mudança na homeostase. As substâncias dos micro-organismos com estrutura preservada que estimulam a imunidade inata são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês: *Pathogen-associated molecular pattern*). Para cada classe de micro-organismo, um PAMP é expresso diferentemente como, por exemplo, os complexos de lipopolissacarídeos (LPS), componentes estruturais da parede celular bacteriana necessários para sua sobrevivência sintetizados por bactérias gram negativas e que, no corpo humano, são identificados por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (CRUVINEL, 2010).

Janeway (1989) descreve que os PRRs são proteínas capazes de distinguir o que é próprio ou não próprio do organismo e emergiram filogeneticamente antes do surgimento de imunidade adaptativa, portanto, são considerados parte do sistema imunológico inato.

Há diversos tipos de PRRs encontrados na membrana celular, membranas endossômicas e no citoplasma da célula. Podem estar presentes na corrente sanguínea e fluidos intersticiais e são capazes de realizar reconhecimento específico de epítomos, como esquematizado na figura 3 (WALSH *et al.*, 2013). Os PRRs desempenham duas funções importantes: culminam na ativação de funções pró ou anti-inflamatórias e facilitam processo de fagocitose, internalização do micro-organismo para o interior da célula e degradação. A eliminação de micro-organismos do sangue e líquidos corporais envolve receptores solúveis que aumentam a captação para o interior da célula ou ativam mecanismos de morte celular programada ou inflamatórias como, por exemplo, apoptose, necroptose e piroptose. Além dos produtos microbianos, o sistema imunológico inato pode reconhecer células do hospedeiro que estejam estressadas, lesadas e/ou infectadas as eliminando e mantendo a homeostase do organismo (PARSLOW *et al.*, 2004).

**Figura 3 - Receptores do sistema imunológico inato**



Fonte: Adaptado de (BORTOLUCI; MEDZHITOV, 2010)

Nota: TLRs são proteínas transmembrana que podem ser encontradas na membrana plasmática (TLR1, 2, 4, 5, 6 e 11) ou nos endossomas (TLR3, 7, 8 e TLR9) e NODs que são proteínas citosólicas.

Dentre os receptores de reconhecimento de padrões descritos, podemos citar quatro subfamílias: receptores de gene induzido por ácido retinóico 1 (RIG-1)-like receptors (do inglês: *retinoic acid-inducible gene 1*), receptores de lectina tipo C (CLR, do inglês: *C-type lectin receptors*), receptores semelhantes a Toll (TLR) e os de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD, do inglês: *nucleotide-binding oligomerization domain*) (WALSH *et al.*, 2013).

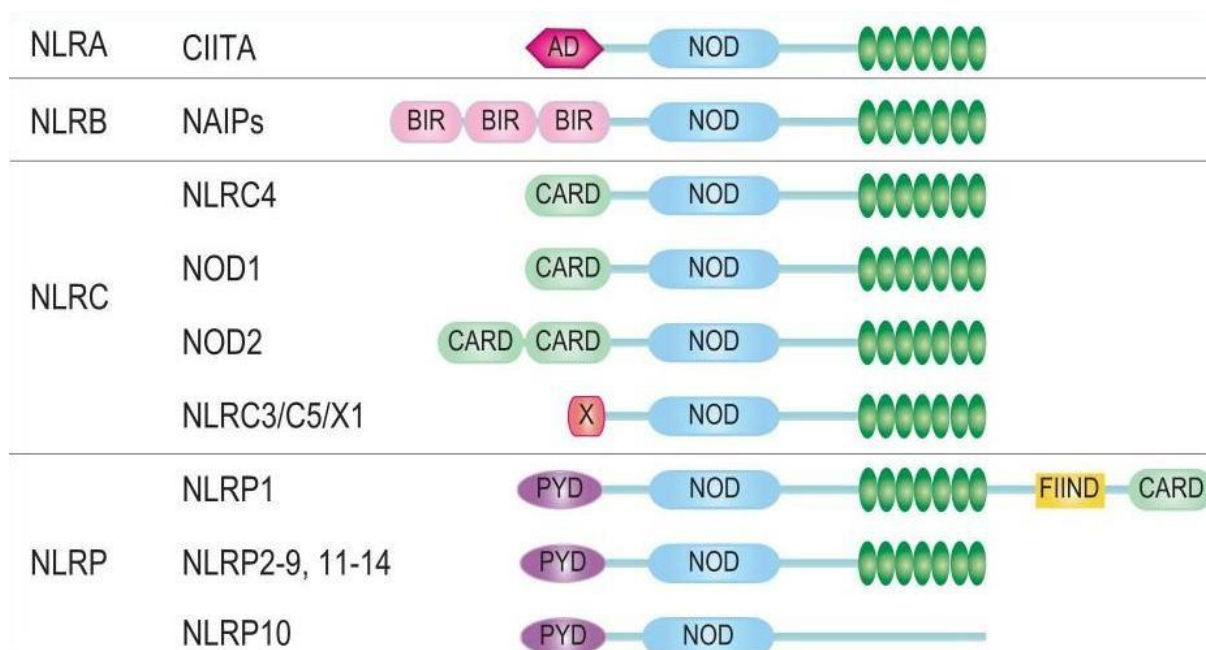
Os receptores da subfamília TLR são moléculas transmembrana que se localizam principalmente na membrana plasmática e membranas endossômicas de fagócitos e células endoteliais, reconhecendo PAMPs de moléculas bacterianas e virais. A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas, promovendo a sua dimerização. Essas proteínas adaptadoras processam o sinal recebido e estimulam a produção de cinases e fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e STAT-1. O estímulo de fatores de transcrição resulta na expressão de genes que codificam moléculas importantes para a resposta

do sistema imunológico inato, como a citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , moléculas de adesão como E-selectina e quimiocinas (LEIFER; MEDVEDEV, 2016).

Já a subfamília conhecida como NODs é subdividida em outras duas subfamílias, denominadas LRRs (do inglês: *Leucin Rich Repeats*) e NACHT-LRRs (do inglês: *nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat-containing receptor*). Essas moléculas estimulam a ativação de NF- $\kappa$ B e IRFs (do inglês: *Interferon Regulatory Factor*), acarretando a produção de citocinas e mediadores da imunidade inata que possuem um papel crucial na resposta imunológica (CAMPOS *et al.*, 2001).

Os receptores NODs estão localizados no citoplasma dos fagócitos, eles reconhecem PAMPs e padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês: *Damage-associated molecular patterns*). São definidos pela conservação de seu domínio N-terminal, agindo como sensor intracelular e podendo ser apresentado de quatro maneiras diferentes: NLRA (do inglês: *AD-domain-containing*), NLRB (do inglês: *BIR-domain-containing*), NLRC (do inglês: *CARD-domain-containing*) e NLRP (do inglês: *pyrin-domain-containing*) como esquematizado na figura 4. Uma vez ativadas, essas proteínas são capazes de se oligomerizar resultando no complexo multiproteico inflamassoma (KIM; SHIN; NAHM, 2016).

**Figura 4 - Classificação e estrutura proteica da família de receptores NOD**



Fonte: Adaptado de (KIM; SHIN; NAHM, 2016).

Nota: AD, domínio de transativação ácida; NACHT, para NAIP, CIITA, HET-T e TIRAP-1; BIR, inibidor de baculovírus de repetição de apoptose ou NOD, domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização; CARD, ativação de cisteína-aspartato proteases (caspase) e domínio de recrutamento; PYD, domínio pirina; FIIND, função para encontrar domínio; LRR, repetição rica em leucina; X, domínio desconhecido.

## 4.2 Ativação de inflamassomas e morte celular

A presença de patógenos capazes de ser reconhecidos pelos inflamassomas, resulta no extravasamento de proteínas para o citoplasma, podendo representar um sinal de estresse celular, na qual desencadeia a ativação de um complexo multiproteico denominado inflamassoma que, por sua vez, culmina na secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18, cujas ações biológicas seguem descritas na tabela 1 (GONÇALVES *et al.*, 2013).

**Tabela 1 - Ação biológica das citocinas IL-1beta e IL-18**

Citocina	Ação
<b>Interleucina IL1-β</b> Citocina proinflamatória Massa molecular: 15-kDa	Induz COX-2 e iNOS com produção de NO causando vasodilatação; Aumenta a produção de citocinas como TNF-alfa e IL-6 Ativa célula endotelial; Aumenta a expressão de moléculas de adesão e produção de quimiocinas; Aumenta a produção e atividade de metaloproteases; Inibe a síntese de proteoglicanas; Estimula hematopoese e aumenta o número de progenitores mielóides; Promove a liberação de neutrófilos (neutrofilia) pela medula óssea; Atividade pirogênica endógena (indução de febre); Influencia no controle da saciedade, sono e temperatura; Ativação de linfócitos T e macrófagos.
<b>Interleucina IL-18</b> Citocina proinflamatória Massa molecular: 24-kDa	Estimula a proliferação de células T ativadas; Diferenciação de células T helper em Th1, Aumento da toxicidade de NK; Adesão de moléculas em superfícies; Aumento do fator de crescimento de macrófagos (GM-CSF); Induz resposta alérgica, atuando em células Th2, linfócitos B, basófilos/mastócitos.

Fonte: (OLIVEIRA *et al.*, 2012)

Os NLRs são classificados em categorias funcionais como montagem de inflamassoma, transdução de sinalização, ativação de transcrição e morte celular programada, como autofagia e piroptose. A autofagia é crucial para a sobrevivência da célula em situações de estresse metabólico por falta de nutrientes, gerando homeostase citoplasmática por degradar e reciclar proteínas e organelas velhas e/ou danificadas e contribuindo para a modulação do sistema imunológico na presença de patógenos, além de seu potencial regulatório de piroptose (KIM; SHIN; NAHM, 2016).

A piroptose é uma morte celular inflamatória em resposta à ativação dos PRRs capazes de ativar os inflamassomas. O resultado da ativação da pró-caspase-1 por via canônica e/ou pró-caspase 11 pela via não canônica (a caspase 11 em camundongos, corresponde a caspase 4 e 5 em humanos) como é a formação de poros na membrana plasmática, que aumenta a pressão osmótica líquida resultando em lise osmótica e, conseqüentemente, a liberação do conteúdo intracelular, incluindo citocinas pró-inflamatórias e DAMPs. Dessa forma, a piroptose resulta em uma rápida remoção de células infectadas levando à eliminação dos nichos de

replicação parasitária. Em casos de respostas exacerbadas, foram descritas associações significativas entre NLRs e doenças relacionadas à infecção e imunidade, como mostrado na tabela 2 (SBORGI *et al.*, 2016).

Recentemente, foi demonstrado que a piroptose não mata as bactérias intracelulares, como a *Salmonella typhimurium* (JORGENSEN *et al.*, 2016). Em vez disso, as bactérias permanecem presas dentro de restos piroptóticos. Essa estrutura é denominada armadilha induzida por poros (PIT, do inglês: *pore-induced trap*) e impede a disseminação bacteriana. O meio inflamatório criado pela liberação do conteúdo intracelular recruta neutrófilos circulantes para o local da infecção. Subsequentemente, os neutrófilos liberam PITs e eliminam o patógeno por um mecanismo dependente de espécies reativas de oxigênio (ROS) e independente de IL-1 $\beta$ . Bactérias extracelulares também podem ser controladas pela ação de peptídeos antimicrobianos e, potencialmente, pelo domínio N-terminal GSDMD liberado durante a lise celular devido à sua afinidade com cardiolipina e fosfatidilserina, expressa em algumas membranas celulares bacterianas, como *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (JORGENSEN *et al.*, 2016).

**Tabela 2 - Funções e doenças associadas a Receptores de reconhecimento humano semelhantes a NOD**

Subfamília	NLR	Função	Doença Associada
NLRA	CIITA	Regulação da expressão do MHC-II	Síndrome do linfócito nu, doença de Hodgkin e linfoma mediastinal de células B primário
NLRB	NAIP	Reconhece flagelina, mecanismo de piroptose e inibição de apoptose	Distrofia muscular espinhal e aumento da suscetibilidade à legionela
NLRC	NLRC4	Formação de inflamassoma	Susceptibilidade a infecções bacterianas
NLRP	NLRP3	PRR para DAMPs	Síndrome da febre periódica associada à criopirina, gota, diabetes tipo I e II, doença celíaca, psoríase, aumento da suscetibilidade a infecções por HIV-1, doenças inflamatórias intestinais

Fonte: adaptado de (KIM; SHIN; NAHM, 2016)

A família de receptores NOD, descrita anteriormente, caracteriza-se por possuir três domínios: a região carboxi-terminal contém motivos repetitivos, em sua maioria repetição rica em leucina (LRR); na região central são encontrados motivos de ligação e clivagem de ATP ou GTP (*nucleotide binding oligomerization domain* – denominado NOD, NBS ou NACHT) e a região amino-terminal é constituída por um domínio efetor, de interação proteína-proteína (MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017).

Há também as proteínas que contêm o domínio de ativação e recrutamento da caspase (CARD, do inglês: *Caspase recruitment domain*), que incluem os receptores citoplasmáticos que se ligam ao RNA viral como, por exemplo, os receptores do tipo RIG (RLRs, do inglês: *RIG-like receptors*) e o gene associado à diferenciação de melanoma 5 (MDA5, do inglês: *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) que induzem a produção de interferons antivirais do tipo 1 (LOO; GALE JUNIOR, 2011).

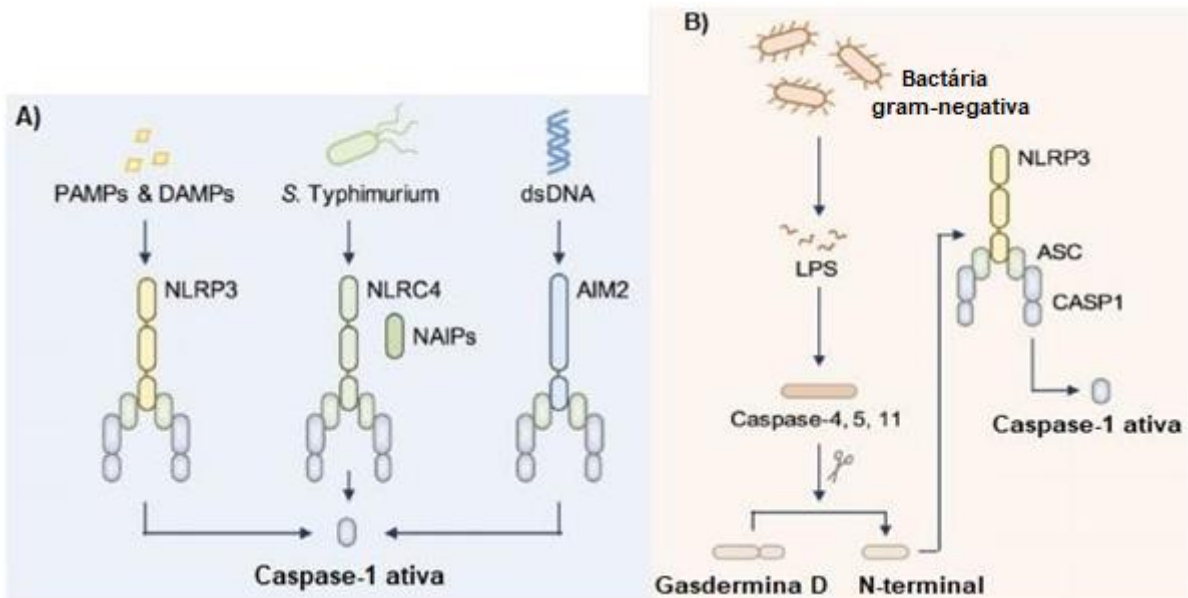
A ativação de alguns dos componentes da família dos receptores citosólicos NLRs culmina na formação do inflamassoma, que é pertencente à família de PRRs e atua como modulador das respostas de defesa do organismo por meio de seu mecanismo efetor central de ativação (MARIATHASAN et al., 2005). Os inflamassomas são compostos por sensores proteicos como NLRs, sensores das famílias da proteína Pirina e proteína contendo o domínio HIN (PYHIN, do inglês: *pyrin and HIN domain-containing protein*), a molécula adaptadora associada à apoptose (ASC, do inglês: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e pró-caspase-1 (PEREIRA; AMARANTE-MENDES, 2011).

Além disso, os receptores NLRs são caracterizados por três domínios estruturais: um rico em repetições de leucina (LRR, do inglês: *leucine-rich repeat*), central de ligação nucleotídica e oligomerização NOD e o domínio efetor iniciador da sinalização, que pode ser um domínio de recrutamento de caspase (CARD) ou domínio pirina (PYD, do inglês: *pyrin domain*) (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

A formação do complexo se dá inicialmente pela ativação da proteína receptora e, a partir disso, ocorre o recrutamento de proteínas citosólicas, podendo ser de forma canônica, onde há ativação da molécula adaptadora ASC, que consiste em dois domínios: PYD e CARD e que recruta a forma inativa da protease caspase-1 (pró-caspase-1), ou de forma não canônica, onde as caspases são recrutadas independente da ativação de inflamassoma (Figura 5) (MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017). A caspase-1 ativa realiza a clivagem das citocinas pró-inflamatórias pró-IL-1 $\beta$

e pró-IL-18, assim como a proteína gasdermina D (GSDMD), cujo fragmento N-terminal induz a piroptose (Figura 6) (BROZ; DIXIT, 2016).

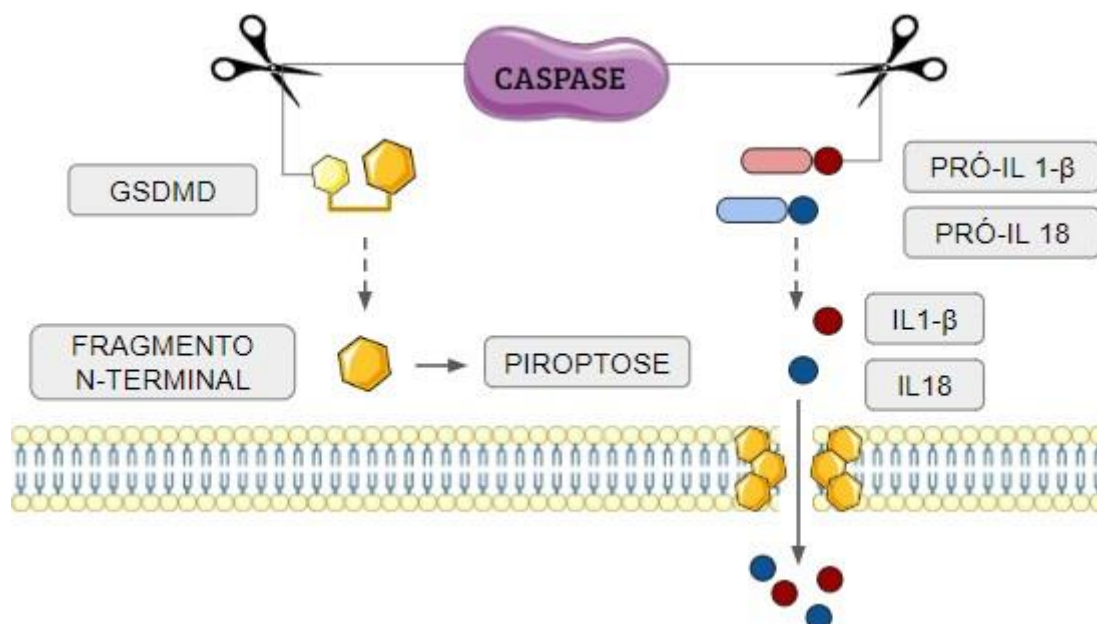
**Figura 5 - Bases da piroptose**



Fonte: Modificado de (MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017)

Nota: **(A)** A via canônica de piroptose consiste no reconhecimento de PAMPs, DAMPs ou distúrbios citosólicos diretamente pelos sensores proteicos que necessitam da proteína adaptadora ASC para recrutar pró-caspase-1. **(B)** A via não canônica identifica lipídio A de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas no citoplasma celular recrutando caspase-4, 5 e 11 com função principal na clivagem do fragmento N-terminal da GSDMD promovendo piroptose e maturação de interleucinas.

**Figura 6 - Mecanismos efetores mediados pela caspase-1 ativa**

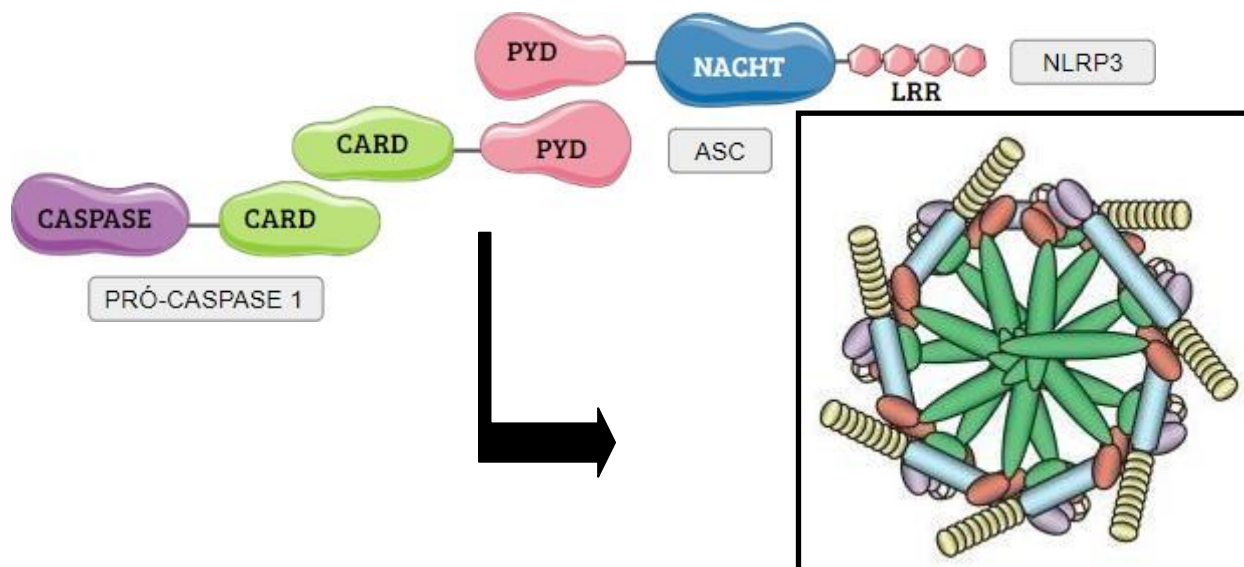


Fonte: Adaptado de (BROZ; DIXIT, 2016)

Nota: A Caspase-1 ativa induz a clivagem de pró-IL-1 $\beta$  em sua forma madura IL-1 $\beta$ . Alternativamente, ocorre clivagem da GSDMD e seu fragmento N-terminal chamado também de domínio de formação de poros, se insere na membrana celular induzindo a formação de poros na mesma, resultando no processo denominado piroptose.

Este complexo de alto peso molecular, o inflamassoma, pode ser formado por outros PRR citosólicos, como NLRP1, NLRP10, NLRC4, NOD1 e NAIPs. Os inflamassomas formados pelas proteínas NLRP3 (Figura 7) e NLRC4 (Figura 8) são os mais estudados na literatura (BROZ; DIXIT, 2016), entretanto, a sua ativação ainda não foi totalmente esclarecida. Van de Laar e colaboradores (2016) indicaram que o NLRP3 pode ser ativado por diversos estímulos, como infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias, sugerindo que sinais comuns promovem sua ativação, além de sinais incluindo PAMPs, DAMPs, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês: *Reactive Oxygen Species*), liberação de potássio, alterações intracelulares nos níveis de cálcio, cristais de ácido úrico, amianto, sílica e alúmen, danos no fagossomo e liberação de catepsina B, disfunção mitocondrial, DNA mitocondrial oxidado e ATP.

Figura 7 - Componentes do inflamassoma formado por NLRP3



Fonte: Adaptado de (TANG et al., 2018)

Nota: O NLRP3 contém um domínio-terminal LRR, domínio central NOD e N-terminal PYD. ASC consiste em um domínio N-terminal PYD e C-terminal CARD. Quando o sensor NLRP3 é ativado, ocorre recrutamento da molécula adaptadora ASC via PYD-PYD e ativação da pró-caspase-1 por interação homotípica CARD-CARD.

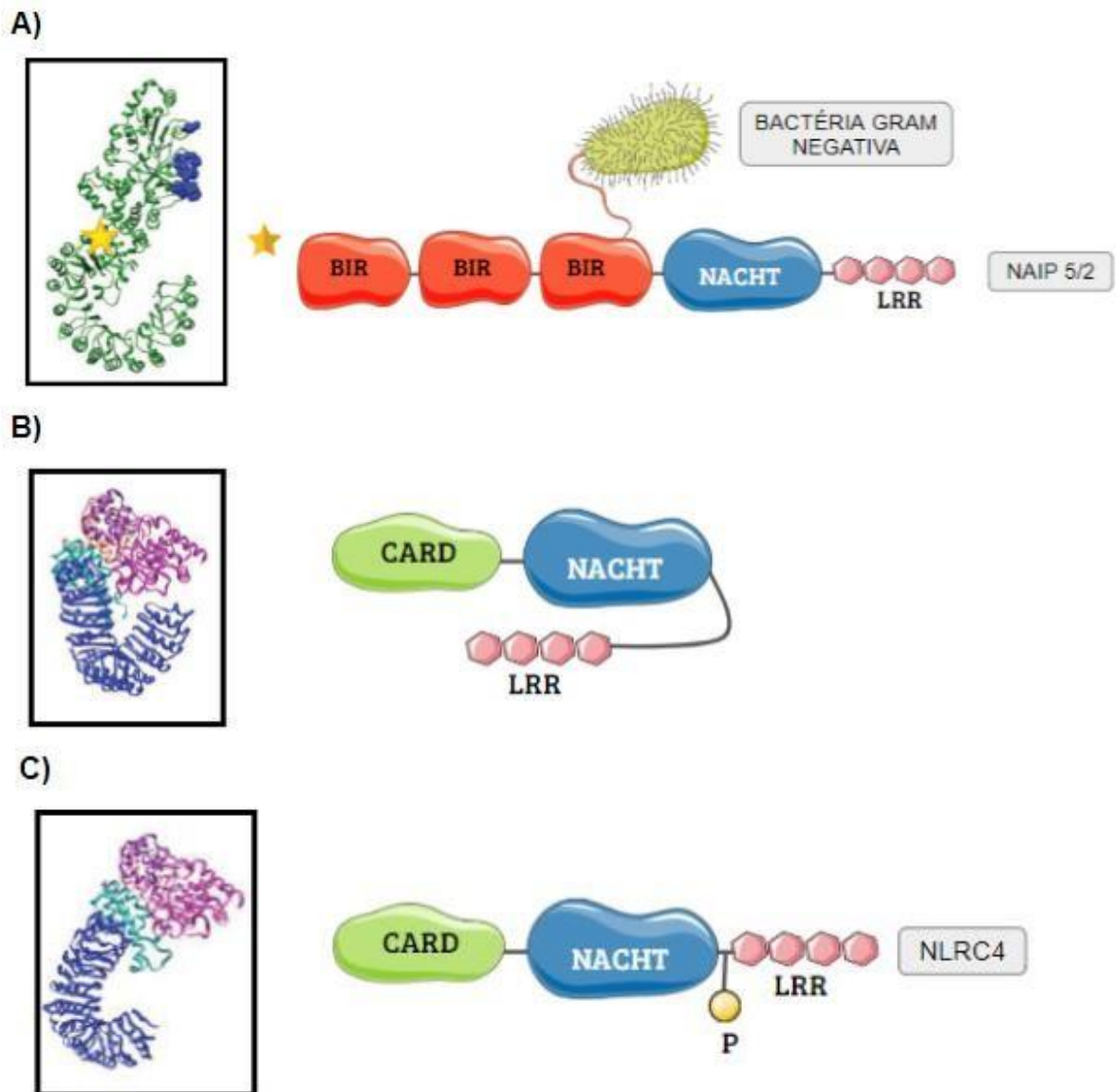
O receptor NLRC4 responde principalmente à flagelina (FLI), subunidade monomérica do flagelo de bactérias móveis e uma das poucas estruturas de proteínas que podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico inato, agindo como um agonista natural dos sensores TLR e NLR. NLRC4 reconhece também sistemas de secreção bacterianos, contudo, não possui capacidade de reconhecimento de ligante e, por isso, é dependente da proteína da subfamília NAIP (do inglês: *Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein*) para sua ativação. NAIP tem capacidade de reconhecer o ligante, porém, possui em sua região N-terminal o domínio BIR que não é capaz de interagir com ASC e nem com caspase-1 por não dispor de domínios homólogos a elas. Sendo assim, após o reconhecimento feito por esse receptor, NLRC4 é ativado e realiza seus mecanismos efetores (MARIATHASAN et al., 2004).

Em humanos, existe apenas um NAIP funcional capaz de reconhecer tanto a flagelina bacteriana quanto a estrutura do sistema de secreção tipo 3 (T3SSs, do inglês, *Type 3 Secretion System*), enquanto que em camundongos existem sete proteínas NAIP (NAIP1-7). Sabe-se que tanto NAIP1 quanto NAIP2 reconhecem T3SSs bacterianos, enquanto NAIP5 e NAIP6 são ativados pela flagelina (KOFOED;

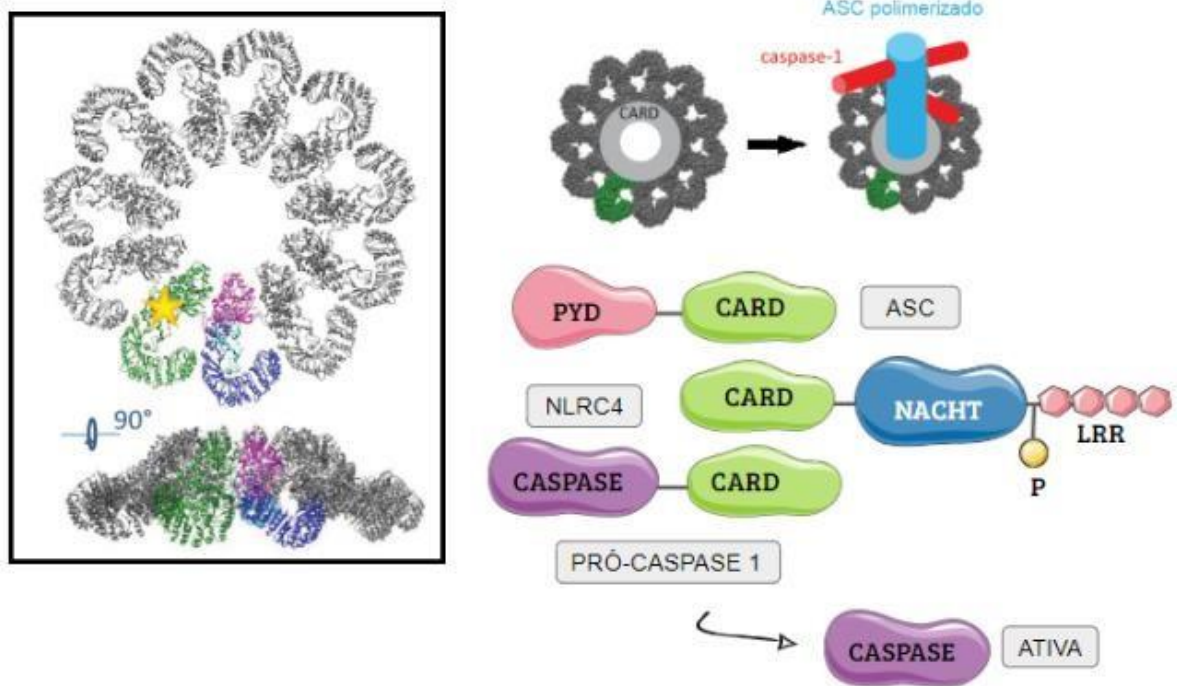
VANCE, 2011). O papel dos demais NAIPs murinos na ativação do inflamassoma ainda não foi elucidado (ZHAO *et al.*, 2011).

Os inflamassomas NLRC4 diferem-se de NLRP3 pela sua porção C-terminal, onde há a presença de domínio CARD, capaz de interagir com a caspase-1 por interação homóloga entre CARD-CARD promovendo sua ativação. Além disso, esse inflamassoma possui a propriedade de recrutar a proteína adaptadora ASC, aumentando o processamento de IL-1 $\beta$  e, conseqüentemente, ampliando sua efetividade (BROZ *et al.*, 2010).

**Figuras 8 - Componentes dos inflamassomas formados por NLRC4 e NAIP**



D)



Fonte: Adaptado de (SULJAN; ROLKAR; HAFNER-BRATKOVIČ, 2017).

Nota: **A)** NAIP possui uma região C-terminal LRR, domínio central NACHT e a região N-terminal BIR. A proteína NAIP após ser ativada em resposta ao reconhecimento da flagelina bacteriana **B)** A proteína NLRP4 em seu estado inativo **C)** A proteína NLRP4 em seu estado ativo. O NLRC4 é composto por três domínios, sendo o N-terminal LRR, o domínio central NACHT e o C-terminal CARD. **D)** Receptores são ativados e há o recrutamento da molécula adaptadora ASC via CARD-CARD e ativação da pró-caspase-1 por interação homotípica CARD-CARD.

O mecanismo de ativação de NLRC4 é dependente da fosforilação que ocorre no resíduo serina 533, localizado entre os domínios NOD e LRR do receptor. Tal fosforilação é necessária para o recrutamento da pró-caspase-1. Qu e colaboradores (2012) desenvolveram um modelo experimental *knockin* hiperfosforilado, que possibilitou elucidar que, mesmo na ausência de infecção, o ganho de função de NLRC4 por meio da mutação pontual do aminoácido serina pelo aspartato (S533D) levando à hiperfosforilação, induz piroptose rapidamente em macrófagos. Esse dado reforça o papel essencial da fosforilação para funcionamento do inflamassoma NLRC4. Comumente, NLRC4 hiperfosforilado é conhecido como DIPAF e essa alteração genética é utilizada para os estudos de ativação do inflamassoma a partir de estímulos inflamatórios ou não como descrito.

Com base nesses estímulos já estudados na literatura, foi demonstrado que a resposta inflamatória é de extrema importância para o controle da homeostase. Qu et al. (2016) descreve que NLRC4 e NLRP3, da família de proteínas intracelulares de receptores do tipo NOD (NLR), são expressos em células do sistema imunológico inato e, tais células, possuem uma ampla variedade, logo cada trabalho apresenta como foco principal e uma amostra celular específica. Observamos então, que dentre as células estudadas, os fagócitos são comumente observados por serem uma população com funções eminentemente relevantes.

### 4.3 Fagócitos

Como citado anteriormente, os fagócitos são células amplamente estudadas. O primeiro pesquisador que observou sua atividade móvel e capacidade de ingerir partículas estranhas foi o biólogo russo Élie Metchnikoff (1845-1916), que introduziu o conceito de fagocitose em 1882 (ELLIS, 2016). Posteriormente, em 1969, foi proposta uma classificação para essas células, levando em consideração sua morfologia, função e cinética de produção. A partir disso, foi possível classificar as células mononucleares fagocíticas e seus precursores no sistema nomeado de Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), definido como uma família de células originadas da medula óssea, além das características já citadas, como similaridade morfológica e funcional (GHOSN *et al.*, 2010). Na década de 60, Ralph van Furth descreveu em detalhes as células do SFM, em especial a cinética de produção dessas células sob condições fisiológicas ou inflamatórias.

Os macrófagos residem em tecidos distintos, representando uma população altamente heterogênea refletida tanto em seus aspectos morfológicos e fenotípicos, como metabólicos e funcionais. Nos adultos, as células da linhagem de macrófagos surgem a partir de células precursoras na medula óssea, direcionadas pela proteína denominada fator estimulador de colônia de monócito (M-CSF). Os precursores evoluem para monócitos que circulam no sangue e migram para os tecidos, especialmente durante reações inflamatórias, quando amadurecem em macrófagos. De modo geral, em humanos são caracterizados fenotipicamente pela expressão de altos níveis de marcador da superfície celular de CD14 e sem expressão de CD16, e seu equivalente em camundongos é Ly6<sup>alto</sup>. Além disso, sabe-se que em um mesmo

microambiente podemos encontrar populações heterogêneas dessas células (SCHMID *et al.*, 2018).

De maneira geral, durante um processo inflamatório e/ou infeccioso, monócitos podem ser recrutados da corrente sanguínea e, por serem uma população inflamatória que apresenta rápido recrutamento do tecido, migram para os sítios de inflamação. No tecido, os macrófagos exercem diversas funções, além de induzirem uma resposta inflamatória ou anti-inflamatória que são fundamentais para garantir a homeostasia. Entre suas diversas funções, os macrófagos participam na defesa de hospedeiro contra patógenos, finalizam o processo inflamatório ao eliminar os restos celulares, participam do processo fisiológico fagocitando e eliminando células apoptóticas, regulam a resposta imunológica e reparo tecidual por secreção de citocinas e/ou quimiocinas e induzem a resposta adaptativa através da apresentação de antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Ademais, os macrófagos podem adquirir capacidades funcionais distintas dependendo dos tipos de estímulos ativadores aos quais são expostos, logo, o processo de ativação da célula a partir de citocinas com o objetivo de tornar-se eficientes para eliminação de micro-organismo, é intitulado de ativação clássica. Se a ativação de macrófago é feita para reparos teciduais e remodelamento, o processo passa a ser denominado como via alternativa (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

#### **4.3.1 Macrófagos peritoneais**

Pesquisas realizadas a partir dos organismos vivos utilizam técnicas de cultura celular para investigações imunológicas. Segundo Cohn (1962), grande parte das células de interesse são encontradas no local que abriga a maior parte dos órgãos, a cavidade peritoneal. Dentre as células presentes nessa região, podemos citar os linfócitos T, linfócitos B, células NK, granulócitos e fagócitos do sistema mononuclear, células que participam da resposta imunológica (CASSADO, 2011).

Macrófagos peritoneais podem expressar níveis diferentes de glicoproteína em sua superfície de acordo com as condições encontradas no microambiente. Na ausência de estimulação e/ou inflamação da cavidade peritoneal, os macrófagos peritoneais, também chamados de macrófagos residentes, são caracterizados pelo fenótipo F4/80<sup>alto</sup>. Em contrapartida, quando estimulado, o peritônio passa a ser composto por macrófagos inflamatórios, os quais apresentam o fenótipo F4/80<sup>+</sup>

(SCHMID et al., 2018). Sua característica funcional pode ser dividida em M1, provenientes de camundongos de linhagens Th1 como C57BL/6 e caracterizados por alta expressão da enzima NO-sintase induzida (iNOS), com consequente produção de níveis elevados de NO em resposta aos LPS ou interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ou a característica funcional M2 que são macrófagos provenientes de camundongos de linhagens Th2 como BALB/c com predominante geração de ornitina e poliaminas (CASSADO, 2011).

#### **4.4 Estudos de inflamassoma envolvendo a utilização de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6**

Comumente, camundongos C57BL/6 *wild-type* são utilizados como grupo controle e seus macrófagos peritoneais são comparados aos dos camundongos C57BL/6 geneticamente modificados, visando assim, elucidar cada vez mais o papel das proteínas sensoras que formam o complexo inflamassoma, principalmente os NLRP3 e NLRC4/NAIP, especialmente, no controle de infecções, como por *T. cruzi*, como mostrado por Gonçalves e colaboradores em 2013.

Outros estudos como os de Lage e colaboradores (2013) abordaram a resposta regulatória do sistema imunológico dependente de inflamassomas e independente de macrófagos a partir de estímulos gerados pela flagelina. Além disso, existem outras possibilidades como, por exemplo, o esclarecimento da atuação de NLRC4 independente de NAIP, ou até mesmo, a elucidação do papel da proteína NAIP e sua atuação como molécula adaptadora.

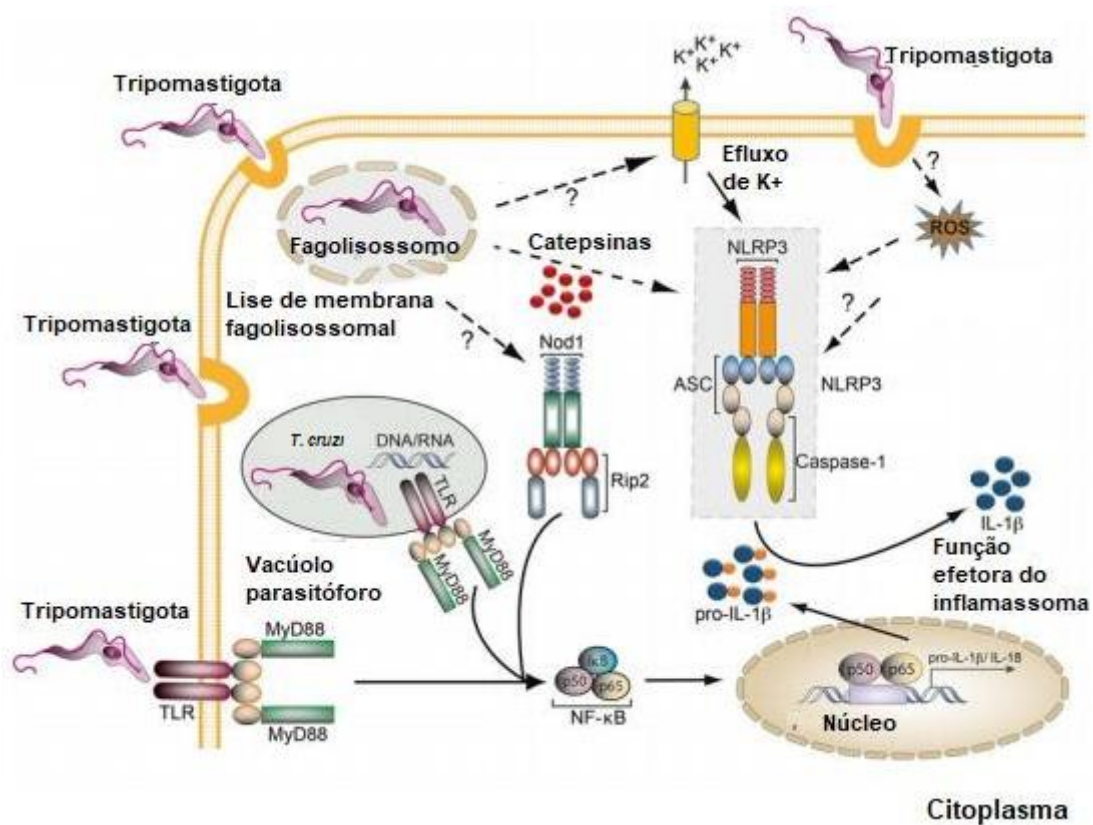
Essas questões têm sido amplamente discutidas no mundo acadêmico com o intuito de compreender detalhadamente o funcionamento dos sensores do complexo multiproteico. Abderrazak e colaboradores (2015) mostraram que há um número crescente de estudos vinculando a detecção de sinais de estresse celular a um papel fisiopatológico direto da ativação do inflamassoma em uma ampla gama de distúrbios auto inflamatórios e autoimunes, além da relação entre ativação de complexo e a suscetibilidade às infecções. Isso pode fornecer um novo mecanismo racional sobre como essas moléculas desencadeiam doenças inflamatórias estéreis o que criou um grande interesse em desvendar as formas como ocorrem as ativações, uma vez que a percepção mecanicista é o pré-requisito para um desenvolvimento baseado em conhecimento de estratégias de intervenção

terapêutica que visem especificamente a produção de IL-1 $\beta$  desencadeada por inflamassoma (DINARELLO, 2011).

#### 4.5 Imunidade inata no controle da infecção por *Trypanosoma cruzi*

Pensando no controle da infecção mediado por NLRP3, Zamboni e Lima (2015) revisaram a ativação e os papéis específicos dos inflamassomas no reconhecimento e nas respostas do hospedeiro a parasitas protozoários intracelulares, descrevendo os mecanismos de reconhecimento e ativação das proteínas formadoras do NLRP3, como mostrado na figura 9.

Figura 9 - Ativação do inflamassoma NLRP3 em resposta à infecção por *T. cruzi*

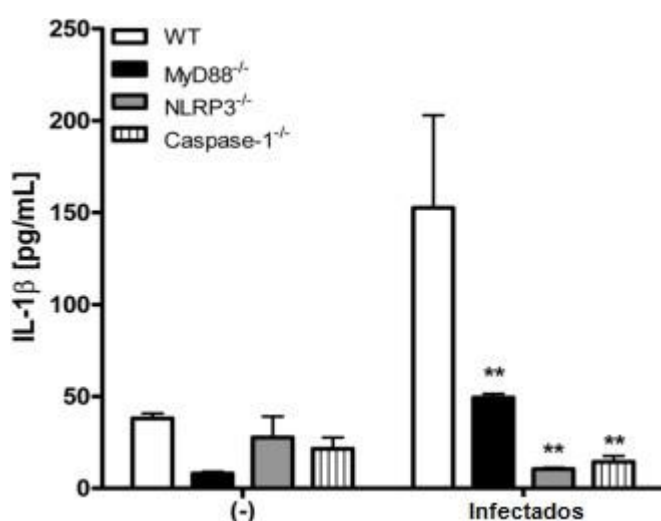


Fonte: Adaptado de (ZAMBONI; LIMA, 2015).

Nota: Receptores de reconhecimento de padrões, como TLRs são ativados por PAMPs *T. cruzi*. A ativação de TLRs e NOD1 aciona o recrutamento de a proteína adaptadora MyD88 e a serina-treonina-quinase 2 que interage com o receptor (RIP2), respectivamente. Isso ativa a sinalização de NF- $\kappa$ B. Infecção por *T. cruzi* em macrófagos levam a efluxo de K<sup>+</sup>, geração de EROs (espécies reativas de oxigênio) e ruptura da membrana fagossômica, levando à liberação de catepsinas vacuolares em citoplasma da célula hospedeira. Esses processos culminam na montagem e ativação do inflamassoma NLRP3<sup>-/-</sup> ASC<sup>-/-</sup> caspase-1, levando a clivagem da Caspase-1 e processamento de pro-IL-1 $\beta$  para sua forma madura.

Dados obtidos por Gonçalves e colaboradores (2013) demonstraram a capacidade do *T. cruzi* ativar NLRP3 por meio da avaliação da secreção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais infectados. Concluiu-se então que a infecção induz a secreção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais isoladas de camundongos WT, mas não de macrófagos peritoneais isoladas de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> e caspase-1<sup>-/-</sup> como mostrado na figura 10.

**Figura 10 - Ativação de NLRP3 induzida por *T. cruzi***

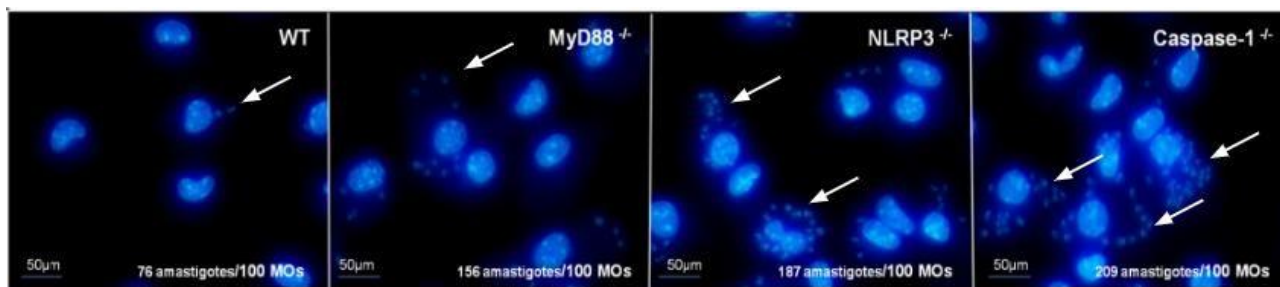


Fonte: Adaptado de (GONÇALVES et al., 2013).

Nota: Macrófagos peritoneais de camundongos WT, MyD88<sup>-/-</sup>, NLRP3<sup>-/-</sup> e Caspase-1<sup>-/-</sup> infectados com tripomastigotas de *T. cruzi*. A avaliação da produção de IL-1 $\beta$  foi feita a partir dos sobrenadantes coletados em cultura celular após a infecção utilizando a técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

O mesmo estudo demonstrou pela primeira vez que a infecção por *T. cruzi* induz a produção de IL-1 $\beta$  de maneira dependente de NLRP3 e Caspase-1, onde foi observado também que a catepsina B parece ser necessária para a ativação do NLRP3 em resposta à infecção. Os pesquisadores utilizaram inibição farmacológica da catepsina B para demonstrar a anulação da secreção de IL-1 $\beta$ . Para esse estudo, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos geneticamente modificados para observar que exibiram uma quantidade maior de parasitas como mostrado na figura 11.

**Figura 11 - Ativação de macrófagos isolados frente a infecção por *Trypanosoma cruzi***



Fonte: Adaptado de (GONÇALVES *et al.*, 2013)

Nota: Quantificação do número de amastigotas (indicados pelas setas brancas) presentes após 1-2h de infecção com *T. cruzi*. Observa-se o aumento da contagem de amastigotas em camundongos MyD88<sup>-/-</sup>, NLRP3<sup>-/-</sup> e caspase-1<sup>-/-</sup>.

Logo, foi visualizado que esses camundongos exibiram deficiência na produção de NO e comprometimento da atividade celular mediada por macrófagos na eliminação dos parasitas por ter apresentado picos de parasitemia comparável aos camundongos MyD88<sup>-/-</sup> (modelos suscetíveis à infecção por *T. cruzi*), indicando assim, o envolvimento e necessidade do inflamassoma NLRP3 no controle da infecção (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Adicionalmente, um estudo feito por Compan e colaboradores (2014) mostrou também que animais NLRP3<sup>-/-</sup> tiveram alta carga parasitária e inflamação nos tecidos cardíacos. Este trabalho teve como objetivo principal observar a atividade de oligomerização da molécula adaptadora ASC. O papel dessa molécula é altamente inexplorado e, nesse estudo foi descrito sua importância. Em um meio hipotônico verificou-se a formação de pontas de ASC o que mostrou um potencial de auto-oligomerização, porém, as mesmas não foram suficientes para ativar caspase-1 e desencadear piroptose. No entanto, quando houve a interação com NLRP3 foi constatado uma melhor formação de partículas ASC e constituição de inflamassomas totalmente funcionais.

Em conclusão, Franchi e colaboradores (2009) descreveram que o modo pelo qual se dá a ativação de NLRP3 ainda precisa ser elucidado, pois, mesmo com muitos trabalhos publicados mostrando o envolvimento do inflamassoma no controle de infecções, nenhum descreve de fato como ocorre o reconhecimento pelas proteínas formadoras do complexo. Atualmente a teoria mais aceita é que ele responde a eventos celulares comuns que englobam danos mitocondrial, desestabilização lisossomal, mudanças nos níveis de cálcio intracelular e especialmente, efluxo de potássio.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a melhoria das técnicas de alteração genética em modelos experimentais, foi possível observar avanços importantes no âmbito de pesquisas acadêmicas, permitindo a compreensão de muitos detalhes referentes a processos imunológicos. Assim, a imunologia deixou de ser uma ciência meramente descritiva, o que vem possibilitando um melhor entendimento das dinâmicas de funcionamento de um sistema integrado.

A detecção dos sinais de estresse celular observada pelas proteínas da família de receptores NOD que compõem o inflamassoma pode englobar uma ampla gama de distúrbios auto inflamatórios e autoimunes, por outro lado, essa resposta é importante também para o controle de infecção como a causada pelo *T. cruzi*.

Em conjunto, o envolvimento de NLRP3 no controle da infecção por *T. cruzi* é bem estabelecido uma vez que os dados levantados a partir da literatura mostram que:

1) Macrófagos peritoneais derivados de camundongos deficientes em NLRP3 apresentam altos níveis de parasitemia e mortalidade em comparação às células selvagens.

2) Os macrófagos infectados com *T. cruzi* secretam IL-1 $\beta$  de maneira dependente de NLRP3, caspase-1 e ASC.

3) Macrófagos peritoneais deficientes em componentes do inflamassoma NLRP3 não controlam a infecção por *T. cruzi*.

4) A carga parasitária de células derivadas de camundongos deficientes em NLRP3 é maior em relação aos macrófagos selvagens, devido sua diminuição na produção de NO.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2015. 567 p.

ABDELHAY, Eliana Saul Furquim Werneck. Criação e produção de animais transgênicos e nocautes. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIR, Rosilene Santos de. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 1-9. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acesso em: 27 ago. 2019.

ABDERRAZAK, Amna et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. **Elsevier B.v**, Paris, p.296-307, abr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4315937/>>. Acesso em: 13 ago. 2019.

ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

BORTOLUCI, Karina R.; MEDZHITOV, Ruslan. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 67, n. 10, p.1643-1651, 13 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC.

BROZ , Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**. 2016;16(7):407–20.

BROZ, Petr et al. Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. **Cell Host & Microbe**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.471-483, dez. 2010. Elsevier BV.

CASSADO, Alexandra dos Anjos. **Heterogeneidade dos macrófagos peritoneais**. 2011. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CAMPOS, Marco A. S. et al. Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 167, n. 1, p.416-423, 1 jul. 2001. The American Association of Immunologists.

CHORILLI; MICHELIN; SALGADO. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada: Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**. Araraquara, p. 11-23. jul. 2017.

CHOW, Andrew; BROWN, Brian D.; MERAD, Miriam. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.788-798, 25 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC.

COHN Za. Determinants of infection in the peritoneal cavity. I. Response to and fate of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* in the mouse. **Yale J Biol Med**. 1962;35:12-28.

COMPAN, Vincent et al. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a CARD Forms Specks but Does Not Activate Caspase-1 in the Absence of NLRP3 during Macrophage Swelling. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 194, n. 3, p.1261-1273, 31 dez. 2014. The American Association of Immunologists.

CRUVINEL, Wilson de Melo. **Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória**. 2010. Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, São Paulo, 2010.

DINARELLO, Charles A.. A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 41, n. 5, p.1203-1217, 26 abr. 2011. Wiley.

ELLIS, Harold. Élie Metchnikoff, father of phagocytosis. **British Journal Of Hospital Medicine**, [s.l.], v. 77, n. 3, p.192-192, 2 mar. 2016. Mark Allen Group.

FRANCHI, Luigi et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 227, n. 1, p.106-128, jan. 2009. Wiley.

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):1–11.

GHOSN, E. E. B. et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 6, p.2568-2573, 25 jan. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences.

GRUNWALD, Hannah A. et al. Super-Mendelian inheritance mediated by CRISPR–Cas9 in the female mouse germline. **Nature**, [s.l.], v. 566, n. 7742, p.105-109, 23 jan. 2019. Springer Nature.

JANEWAY, C.a.. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, [s.l.], v. 54, p.1-13, 1 jan. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory.

JORGENSEN, Ine et al. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 213, n. 10, p.2113-2128, 29 ago. 2016. Rockefeller University Press.

JORGENSEN, Ine et al. IL-1 $\beta$ , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 46, n. 12, p.2761-2766, 19 out. 2016. Wiley

KANNEGANTI, Thirumala-devi. **The inflammasome: firing up innate immunity.** *Immunological Reviews*, [s.l.], v. 265, n. 1, p.1-5, 16 abr. 2015

KEANE, Thomas M. et al. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. **Nature**, [s.l.], v. 477, n. 7364, p.289-294, set. 2011. Springer Science and Business Media LLC.

KIM, Jovem Keun; SHIN, Jeon-soo; NAHM, Lua H.. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. **Yonsei Medical Journal**, Birmingham, v. 1, n. 57, p.5-14, jan. 2016.

KOFOED, Eric M.; VANCE, Russell E.. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. **Nature**, [s.l.], v. 477, n. 7366, p.592-595, 28 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC.

LAGE, S. L. et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 35, p.1-10, 13 ago. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences.

LAGE, Silvia Lucena et al. Emerging Concepts about NAIP/NLRC4 Inflammasomes. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 5, p.1-10, 2 jul. 2014. Frontiers Media SA.

LAGE, Silvia L.; AMARANTE-MENDES, Gustavo P.; BORTOLUCI, Karina R.. Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin. **Methods**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.110-116, jun. 2013. Elsevier BV.

LAGE, Silvia Lucena. **Papel de inflamassomas e vias lisossomais na morte celular e resposta imune induzidas pela flagelina.** 2015. 53 f. Tese (Doutorado) - Curso de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

LIMA FM, Oliveira P, Mortara RA, Silveira JF, Bahia D. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **N Biotechnol** [Internet]. 2010;27(6):837–43.

LEIFER, Cynthia A.; MEDVEDEV, Andrei E.. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. **Journal Of Leukocyte Biology**, Connecticut, v. 100, n. 1, p.927-942, nov. 2016.

LOO, Yueh-ming; GALE JUNIOR, Michael. Immune signaling by RIG-I-like receptors. **National Institutes Of Health**, Seattle, v. 5, n. 34, p.680-692, 27 maio 2011.

MAN, Si Ming; KARKI, Rajendra; KANNEGANTI, Thirumala-devi. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 277, n. 1, p.61-75, 30 abr. 2017. Wiley.

MATSUO, Naoki et al. Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [s.l.], p.1-12, 2010. Frontiers Media SA.

MATZINGER, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.991-1045, abr. 1994. Annual Reviews.

MARIATHASAN, Sanjeev et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, [s.l.], v. 430, n. 6996, p.213-218, 9 jun. 2004. Springer Nature.

MARIATHASAN, Sanjeev et al. Innate immunity against *Francisella tularensis* dependent on the ASC/caspase-1 axis. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 202, n. 8, p.1043-1049, 17 out. 2005. Rockefeller University Press.

NEVES, David Pereira; MELO, Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marcos. **Parasitologia Humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011. 498 p.

OLIVEIRA, Eustaquio Luiz Paiva et al. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 11, n. 1, p.96-102, abr. 2012.

PARSLOW, Tristram G. et al. **Imunologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2004. 665 p.

PEREIRA, W. O.; AMARANTE-MENDES, G. P.. Apoptosis: A Programme of Cell Death or Cell Disposal?. **Scandinavian Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 73, n. 5, p.401-407, 25 mar. 2011. Wiley.

QU, Yan et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. **Nature**, [s.l.], v. 490, n. 7421, p.539-542, 12 ago. 2012. Springer Nature.

QU, Yan et al. NLRP3 recruitment by NLRC4 during *Salmonella* infection. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 213, n. 6, p.877-885, 2 maio 2016. Rockefeller University Press.

SBORGI L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H, et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. **EMBO J**. 2016;35(16):1766–78.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The Inflammasomes. **Cell**, Australia, v. 6, n. 140, p.821-832, 19 mar. 2010.

SCHMID, Michael C. et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. **Nature Communications**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-14, dez. 2018. Springer Nature.

SILVEIRA, T. N.; ZAMBONI, D. S.. Pore Formation Triggered by *Legionella* spp. Is an Nlr4 Inflammasome-Dependent Host Cell Response That Precedes Pyroptosis. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 78, n. 3, p.1403-1413, 4 jan. 2010. American Society for Microbiology.

SIMON, A. Katharina; HOLLANDER, Georg A.; MCMICHAEL, Andrew. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 282, n. 1821, p.1-9, 22 dez. 2015. The Royal Society.

SULJAN, Petra; ROLKAR, Samo; HAFNER-BRATKOVIČ, Iva. The mechanism of NLRP3 inflammasome initiation: Trimerization but not dimerization of the NLRP3 pyrin domain induces robust activation of IL-1 $\beta$ . **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 483, n. 2, p.823-828, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.008>.

TANG T, Gong T, Jiang W, Zhou R. GPCRs in **NLRP3 Inflammasome Activation, Regulation, and Therapeutics**. *Trends Pharmacol Sci*. 39(9):798–811.

TARDIEUX, I.. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> transients. **Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 179, n. 3, p.1017-1022, 1 mar. 1994. Rockefeller University Press.

VALONES, Marcela Agne Alves et al. PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN MEDICAL DIAGNOSTIC FIELDS:: A REVIEW. **Brazilian Journal Of Microbiology**. Pernambuco, p. 1-11. 25 fev. 2009.

VAN de Laar L, Saelens W, De Prijck S, Martens L, Scott CL, Van Isterdael G, et al. *Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages*. **Immunity**. 2016;44(4):755–68.

WALSH, David et al. Pattern recognition receptors—**Molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease**. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, [s.l.], v. 24, n. 2, p.91-104, abr. 2013. Elsevier BV.

WHO | **Chagas disease** (American trypanosomiasis). WHO [Internet]. 2017 [cited 2017 Nov 22]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340>

WYNN, Thomas A.; CHAWLA, Ajay; POLLARD, Jeffrey W.. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, [s.l.], v. 496, n. 7446, p.445-455, abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

ZAMBONI, Dario S.; LIMA, Djalma SJ.. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 265, n. 1, p.156-171, 16 abr. 2015. Wiley.

ZHAO, Yue et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, [s.l.], v. 477, n. 7366, p.596-600, set. 2011. Springer Science and Business Media LLC.