



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Cláudia de Souza

**O papel da molécula adaptadora STING durante a infecção causada pelo
parasito *Schistosoma mansoni***

Belo Horizonte - Outubro/2020



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Cláudia de Souza

**O papel da molécula adaptadora STING durante a infecção causada pelo
parasito *Schistosoma mansoni***

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira

Belo Horizonte - Outubro/2020

043

Souza, Cláudia de.

O papel da molécula adaptadora STING durante a infecção causada pelo parasito *Schistosoma mansoni* [manuscrito] / Cláudia de Souza. - 2020.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Esquistossomose. 3. DNA. 4. Interferons. 5. Fatores Reguladores de Interferon. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE CLÁUDIA DE SOUZA. Aos trinta dias do mês de outubro de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se, de forma remota utilizando a Plataforma Zoom, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O papel da molécula adaptadora STING durante a infecção causada pelo parasito *Schistosoma mansoni*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Luciana Santos Cardoso (Universidade Federal da Bahia), aprovada; Dra. Cristina Toscano Fonseca (Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ - CPqRR), aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de outubro de 2020.

Dra. Luciana Santos Cardoso (Universidade Federal da Bahia)

Dra. Cristina Toscano Fonseca (Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ - CPqRR))

Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)

Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)

Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas
causados pela forma como nos
acostumamos a ver
o mundo”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me guiar nessa longa jornada;

Aos meus pais, Sebastião e Miraci, e familiares pelo apoio, dedicação e por acreditarem em mim sempre;

Ao professor e orientador Sergio Costa Oliveira pela oportunidade e confiança depositada em mim para que este estudo pudesse ser realizado;

À Sandra Fernandes, administradora do laboratório, pelos ensinamentos, puxões de orelha, amizade, carinho e por me ajudar sempre. Como ela mesma diz, ela é a nossa mãe em Belo Horizonte;

Aos colegas de laboratório pelos momentos de descontração vividos no dia-a-dia.

Aos membros atuais e anteriores do grupo Xisto (Natan, Bárbara, Suellen, Rodrigo, Fábio Mambelli, Enrico, Nathiery e Carla) pelo aprendizado, discussões, amizade e pela colaboração na realização de todos os experimentos desse trabalho. Sem vocês eu realmente não conseguiria;

Aos meus amigos do eterno grupo Zeta (Sandra, Fernanda, Raiany, Ivan, Fábio Mambelli, Carol, Rodrigo, Enrico, Nathiery, Daiane, Marcella e Lunna) pelos bons momentos que compartilhamos juntos, conversas, brincadeiras, festas, encontros no Jaeh, barzinhos na Avenida Fleming ou no Chopp da Fábrica e, pelos almoços na mesa do bloco Q (marmiteiros do laboratório);

Aos membros atuais e anteriores do grupo Beta (Fábio Marinho, Júlia, Priscila e Nina) pela amizade, ajuda nos experimentos de citometria, discussões e por contribuírem nas minhas apresentações orais e na escrita do artigo;

Ao Natan por ter sido meu co-orientador até certa parte do meu doutorado. Sem a sua ajuda eu não teria conseguido trabalhar com camundongos. Você sempre foi muito paciente, habilidoso e um bom amigo. Me ensinou a liderar o grupo nos experimentos e me dava toques para estudar mais ou treinar o manuseio com os animais;

Ao Rodrigo (Digãozito) por me ajudar na maioria dos experimentos realizados nesse estudo, principalmente nas longas citometrias. Apesar da cansativa e trabalhosa rotina do nosso grupo de pesquisa, vou sempre lembrar das discussões, brincadeiras, surtos e festas que tivemos. Fizemos graduação, mestrado e doutorado juntos, contudo foi nessa última fase que nos tornamos mais próximos. Foi um prazer passar por isso tudo com você;

Ao Fábio Mambelli (Fabiano ou Mambellito) pela amizade, brincadeiras, bebedeiras, companherismo e ajuda nos dias de infecção. Você foi muito importante nessa jornada, principalmente me encorajando diante de todas as dificuldades, tanto acadêmicas quanto pessoais. Conte sempre comigo;

À Daiane e à Tarcísia Carolina que dividiram apartamento comigo. Vou levar a amizade, o carinho e o cuidado que vocês tiveram comigo para o resto da vida. Também vou guardar na memória todos os momentos de brincadeiras, perrengues, brigas, festas, conversas, viagens e as trágicas mudanças de apartamento que passamos juntas;

Ao Rafael que, apesar de todos os momentos difíceis que passamos, nunca deixou de estar ao meu lado me encorajando diante das dificuldades;

Aos professores Ricardo Toshio Fujiwara, Flávio Almeida Amaral e Luis Henrique Franco que participaram da minha banca de qualificação e contribuíram para a realização de melhorias neste trabalho;

Aos professores que aceitaram participar da banca de defesa;

E à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela estrutura.

Além de agradecer, eu também gostaria de pedir desculpas pelos meus momentos de desespero, nervosismo, aflição e ansiedade. Acho que depois desses quatro anos de doutorado, finalmente, estou aprendendo a lidar com esses sentimentos (rs).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Esquistossomose	16
1.1.1. Patologia da esquistossomose.....	19
1.1.1.1. Esquistossomose aguda	20
1.1.1.2. Esquistossomose crônica.....	21
1.1.2. Resposta imune na esquistossomose.....	22
1.1.2.1. Resposta imune inata contra à esquistossomose.....	22
1.1.2.1.1. Mecanismos de evasão da resposta imune inata	27
1.1.2.1.2. Resposta imune adaptativa contra à esquistossomose.....	27
1.2. Potenciais alvos terapêuticos para a esquistossomose.....	31
1.3. STING e sua regulação	32
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. METODOLOGIA.....	39
4.1. Animais	39
4.2. Parasito (cercárias, esquistossômulos e vermes adultos).....	39
4.3. Análise da carga parasitária	41
4.4. Coleta de sangue	41
4.5. Medida de anticorpos séricos.....	41
4.6. Contagem de ovos no fígado	42
4.7. Análise dos granulomas hepáticos.....	43
4.8. Células do baço – medição de citocinas e análise por citometria de fluxo.....	43
4.9. Dosagem de citocinas/quimiocina	44

4.10.	Lavado bronco-alveolar – medição de citocinas e análise por citometria de fluxo	45
4.11.	Pulmão – medição de citocinas e análise por citometria de fluxo	45
4.12.	Citometria de fluxo.....	46
4.13.	Extração de DNA total de vermes adultos	47
4.14.	Cultura de células.....	49
4.15.	Microscopia confocal	49
4.16.	PCR em tempo real	50
4.17.	Isolamento de neutrófilos	51
4.18.	Sobrevida de neutrófilos.....	52
4.19.	Cultura de neutrófilos com esquistossômulos.....	52
4.20.	Isolamento fecal, sequenciamento de DNA da microbiota intestinal e bioinformática	53
4.21.	Análises estatísticas	54
5.	RESULTADOS	55
5.1.	Detecção do DNA de <i>Schistosoma mansoni</i> via cGAS/STING	55
5.2.	Análise do impacto causado pela infecção com o parasito <i>S. mansoni</i> em camundongos deficientes em STING	57
5.3.	Análise da resposta imune humoral e celular de camundongos <i>Sting</i> ^{-/-} infectados	59
5.4.	Avaliação de celularidade no lavado bronco-alveolar (BAL), pulmão e baço.....	61
5.5.	Avaliação da sobrevivência e função de neutrófilos de camundongos <i>Sting</i> ^{-/-} após estimulação com IFN- γ	65
5.6.	Análise da microbiota intestinal.....	68
6.	DISCUSSÃO	72
7.	CONCLUSÃO.....	79
8.	REFERÊNCIAS.....	80
9.	REFERÊNCIA DO ARTIGO GERADO A PARTIR DA TESE	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global da esquistossomose	17
Figura 2: Ciclo de vida do Schistosoma	20
Figura 3: Mecanismos de ativação do inflamassoma induzido por SEA em células dendríticas	26
Figura 4: Fases da resposta imune adaptativa na esquistossomose	30
Figura 5: Via cGAS-STING de detecção do DNA citosólico	35
Figura 6: Detecção do DNA de Schistosoma mansoni e ativação de STING em fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs)	56
Figura 7: Avaliação da carga parasitária e patologia hepática em camundongos $Sting^{-/-}$ infectados ..	58
Figura 8: Anticorpos e citocinas produzidos por camundongos $Sting^{-/-}$ infectados	60
Figura 9: Análise da porcentagem de neutrófilos e células dendríticas no lavado bronco-alveolar (BAL) e pulmão de camundongos $Sting^{-/-}$	62
Figura 10: Perfil de citocinas no BAL de camundongos $Sting^{-/-}$	63
Figura 11: Perfil de citocinas no pulmão de camundongos $Sting^{-/-}$	64
Figura 12: Análise da porcentagem de neutrófilos no baço de camundongos $Sting^{-/-}$	65
Figura 13: Análise da sobrevivência e função de neutrófilos após estimulação com IFN- γ	67
Figura 14: Análise da microbiota intestinal	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-SMA	Actina de músculo liso alfa
AIM2	Receptor Ausente no melanoma 2 (do inglês <i>Absent In Melanoma 2</i>)
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ASC	Proteína adaptadora (do inglês <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>)
BAL	Lavado bronco-alveolar
BSA	Albumina de soro bovino
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CBD	Região média do STING de ligação ao dinucleotídeo cíclico
Bregs	Células B reguladoras
c-di-AMP	Monofosfato de adenosina dimérica cíclica
c-di-GMP	Monofosfato de guanosina dimérica cíclica
cDNA	DNA complementar
CDNs	Dinucleotídeos cíclicos
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGAMP	GMP-AMP cíclico
cGAS	Enzima GMP-AMP sintase cíclica
ConA	Concanavalina A
CREB	Proteína de ligação responsiva ao cAMP (do inglês <i>cAMP response element-binding</i>)
CTAB	Brometo de cetil trimetilamonio
CTT	Região carboxila terminal do STING (do inglês <i>C-terminal tail</i>)
DAI	Receptor Fator regulador de IFN (do inglês <i>IFN-regulatory factors</i>)
DAMPs	Padrões moleculares associadas ao dano

DDX41	Receptor DEAD-Box Helicase 41
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA fita dupla (do inglês <i>double-stranded DNA</i>)
DSS	Dextran sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Teste imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>)
ENPP1	Enzima (do inglês <i>Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1</i>)
FBS	Soro fetal bovino
Fc	Fragmento cristalizável (Porção constante do anticorpo)
FMO	Controle (do inglês <i>Fluorescence Minus One</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de Macrófagos e Granulócitos
HSCs	Células estreladas hepáticas
IEL	Linfócitos intraepiteliais induzidos
IFI16	Receptor Proteína indutível por IFN 16 (do inglês <i>interferon-γ-inducible protein 16</i>)
IFN	Interferon
IFNGR	Receptor de IFN- γ
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	Células linfoides inatas
IL-Ira	Antagonista do receptor de IL-1
iNOS	Sintetase de óxido nítrico induzível
IRAP	Proteína antagonista do receptor de IL-1 endógena
IRF3	Fator regulador do Interferon 3
ISG	Genes estimulados por IFN
LPS	Lipopolissacarídeo

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MAVS	Proteína de sinalização antiviral mitocondrial
MEFs	Fibroblastos embrionários de camundongo
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
NE	Elastase neutrofílica
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor (do inglês <i>nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing receptor</i>)
NO	Óxido nítrico
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão Salina-fosfato
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
PYD	Domínios de pirina
RLR	Receptor (do inglês <i>RIG-I-like receptor</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rRNA	RNA ribossômico
RTq-PCR	Transcriptase reversa quantitativa-PCR
Schisto-LPC	Lisofosfatidilcolina derivada de vermes adultos do parasito <i>S. mansoni</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SEA	Antígeno de ovo solúvel
shNLRP3	Pequeno RNA de interferência contra NLRP3 (do inglês <i>short hairpin RNA</i>)
Smteg	Tegumento do esquistossômulo
STING	Proteína estimuladora de genes de interferons
SWAP	Antígenos solúveis de vermes adultos (do inglês <i>soluble adult worm antigen</i>)
TBK1	Quinase ligante de TANK 1
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta (do inglês <i>transforming growth factor</i>)
Th1	Células T auxiliares do tipo 1 (do inglês <i>T helper cells type 1</i>)
Th2	Células T auxiliares do tipo 2 (do inglês <i>T helper cells type 2</i>)
TLR	Receptores do tipo Toll (do inglês <i>Toll-like receptors</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>)
Treg	Células T reguladoras
TREX1	DNAse citoplasmática (do inglês <i>three-prime repair exonuclease 1</i>)
TXNIP	Proteína que interage com a tioredoxina
WT	Camundongo selvagem (do inglês <i>Wild-type</i>)
0-3hRP	Produtos excretados/secretados de cercárias do <i>S. mansoni</i> após 3 horas de cultura

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária humana que gera sérias consequências para a saúde pública, além de grandes impactos socioeconômicos nos países em desenvolvimento. A migração de larvas e vermes adultos do *Schistosoma mansoni* nos tecidos do hospedeiro pode ocasionar danos celulares, levando à liberação tanto de DNA endógeno quanto parasitário. A cascata de sinalização celular dependente da molécula adaptadora STING possivelmente é ativada durante esse processo. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar o papel de STING no controle da infecção e na patologia induzida pela esquistossomose. Inicialmente, foi analisado se a via de sinalização cGAS-STING em fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) era capaz de detectar o DNA de *S. mansoni*. Após a transfecção, o DNA do parasito foi reconhecido por cGAS, levando à ativação subsequente de STING. Em seguida, camundongos C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} foram infectados com cercárias de *S. mansoni* para posterior análise da carga parasitária, patologia hepática, parâmetros imunológicos, celularidade e composição da microbiota intestinal. Após a perfusão, foi demonstrado que os camundongos *Sting*^{-/-} apresentaram maior resistência à infecção quando comparados aos camundongos WT. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na contagem de ovos, no número e área dos granulomas hepáticos e nos títulos de anticorpos do isotipo IgG. Quando a resposta imune celular foi avaliada, os camundongos *Sting*^{-/-} mostraram um aumento significativo de IFN- γ produzido pelas células do baço após 40 dias de infecção e, de IL-17, TNF- α e IL-6 no lavado bronco-alveolar (BAL) após 13 dias de infecção, quando comparados aos camundongos WT. Nas análises de celularidade foram mostrados que os camundongos *Sting*^{-/-} apresentaram um aumento da frequência de neutrófilos no pulmão, BAL e baço independentemente da infecção. Além disso, neutrófilos deficientes em STING estimulados com IFN- γ exibiram uma taxa de sobrevivência aumentada, mas capacidade similar de destruir esquistossômulos *in vitro* quando comparados aos neutrófilos WT. Na análise da microbiota intestinal, os camundongos *Sting*^{-/-} infectados apresentaram alterações substanciais na

população bacteriana encontrada, revelando um perfil mais inflamatório quando comparados aos camundongos WT infectados. Em suma, este estudo demonstrou que a via de sinalização cGAS-STING possui a capacidade de reconhecer o DNA de *S. mansoni* e que a ausência dessas moléculas levam a uma maior resistência à infecção.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni* – Sensores de DNA – STING.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a human parasitic disease responsible for serious consequences for public health, as well as severe socioeconomic impacts in developing countries. The migration of *Schistosoma mansoni* larvae and adult worms in the host tissues might induce cellular damage, leading to the release of both endogenous and parasitic DNA. Therefore, we hypothesize that the signaling pathway induced by the adaptor molecule is possibly activated during this process. This study aims to understand the role of STING in the control of infection and pathology induced by schistosomiasis. Initially, it was evaluated whether the cGAS-STING signaling pathway of murine embryonic fibroblasts (MEFs) was able to detect the DNA of *S. mansoni*. After transfection, the parasite's DNA was recognized by cGAS, leading to subsequent STING activation. Then, C57BL/6 (WT) and *Sting*^{-/-} mice were infected with *S. mansoni* cercariae for further analysis of parasite load, liver pathology, immunological parameters, cellularity and intestinal microbiota composition. After perfusion, it was demonstrated that *Sting*^{-/-} mice showed greater resistance to infection when compared to WT mice. However, no significant differences were found in egg count, in the number and area of liver granulomas and in the total IgG antibody titers. When the cellular immune response was assessed, *Sting*^{-/-} mice showed a significant increase in IFN- γ produced by spleen cells after 40 days of infection, and in IL-17, TNF- α and IL-6 in bronchoalveolar lavage (BAL) after 13 days of infection, when compared to WT mice. Regarding cellularity, we showed that *Sting*^{-/-} mice had an increased frequency of neutrophils in the lung, BAL and spleen regardless of infection. In addition, STING-deficient neutrophils stimulated with IFN- γ exhibited an increased survival rate, but similar ability to kill schistosomula *in vitro* when compared to WT cells. In the analysis of the intestinal microbiota, the infected *Sting*^{-/-} mice showed substantial changes in the bacterial population found, revealing a more inflammatory profile when compared to the infected WT mice. In summary, this study demonstrated that the cGAS-STING signaling pathway has the ability to recognize the DNA of *S. mansoni* and that the absence of these molecules leads to greater resistance to infection.

Keywords: *Schistosoma mansoni* – DNA sensors – STING.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquistossomose

A esquistossomose, também conhecida como bilharziose, é uma doença parasitária humana, resultante da infecção causada por parasitos trematódeos do gênero *Schistosoma* (COLLEY et al., 2014; LO et al., 2018). O primeiro relato da doença data de 1851, quando o cirurgião alemão Theodor Bilharz descobriu, durante realização de uma autópsia em um hospital do Cairo, vermes do parasito *Schistosoma hematobium* nas veias pélvicas de um paciente (OTHMAN; SOLIMAN, 2015; PAPAMATHEAKIS et al., 2014; SHAKER; SAMY; ASHOUR, 2014). A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada que gera graves consequências socioeconômicas nos países em desenvolvimento, sendo considerada a segunda doença parasitária mais prevalente no mundo (PAPAMATHEAKIS et al., 2014; SONG et al., 2016; TCHUEM TCHUENTE et al., 2017).

De acordo com a organização mundial da saúde, a esquistossomose afeta aproximadamente 240 milhões de pessoas no mundo e mais 700 milhões vivem em risco de contaminação nas áreas endêmicas. As principais espécies de *Schistosoma* causadoras de doenças em humanos são: *Schistosoma guineensis*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. mekongi* (WHO). Dentre elas, as três espécies envolvidas com a maioria dos casos reportados são: *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mansoni* (GRIMES et al., 2015).

A esquistossomose têm sido relatada, principalmente, em áreas sem saneamento básico adequado localizadas em 78 países da África, Ásia e América do Sul (WHO; XIAO; SUN; CHEN, 2018). Contudo, a espécie de *Schistosoma* responsável por causar a doença pode diferenciar de acordo com a região geográfica. O *S. mansoni* é endêmico em áreas tropicais e subtropicais da África subsaariana, Oriente Médio, América do Sul e Caribe, enquanto que o *S. haematobium* é endêmico no norte da África, na África subsaariana, no Oriente Médio e na Índia. O *S. guineensis* e o *S. intercalatum* estão presentes na África ocidental e central.

Por sua vez, o *S. japonicum* pode ser encontrado na Ásia, principalmente nas Filipinas e na China. O *S. mekongi* está presente apenas na bacia do rio Mekong no Laos e no Camboja. A distribuição das espécies do parasito apresenta certa dinâmica onde o hospedeiro intermediário apropriado esteja presente. A imigração e o turismo de áreas endêmicas possui vital importância nesse processo (Figura 1) (COLLEY et al., 2014; ELBAZ; ESMAT, 2013; HINZ et al., 2017).

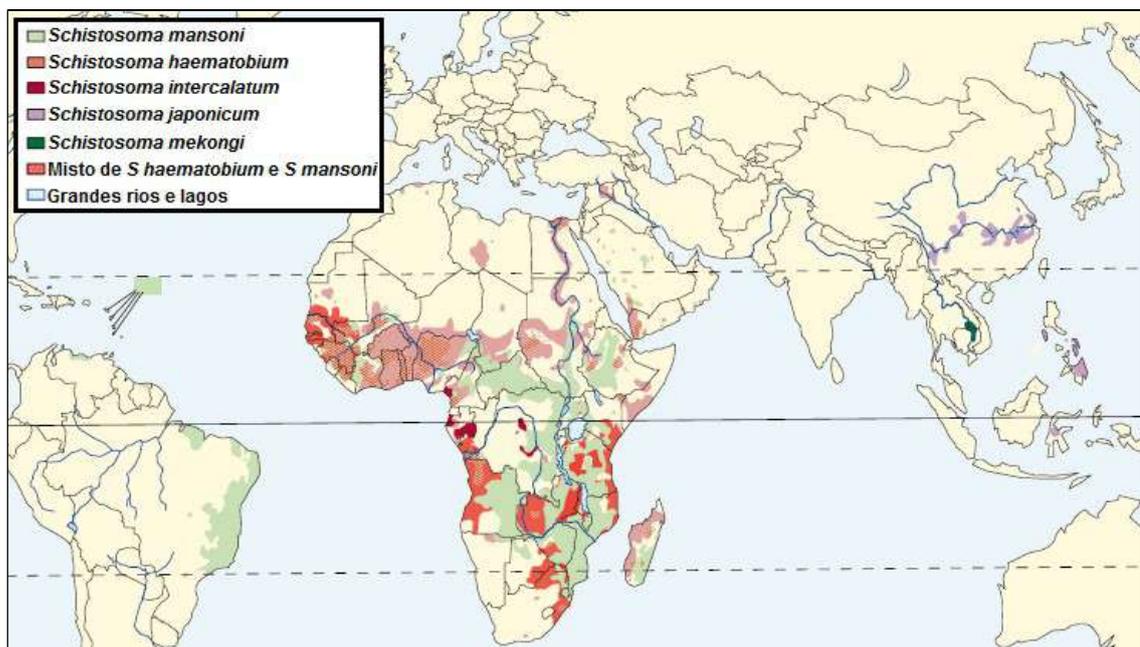


Figura 1: Distribuição global da esquistossomose. Fonte: (COLLEY et al., 2014).

As espécies de *Schistosoma* que comumente afetam os seres humanos apresentam ciclos de vida semelhantes (SHAKER et al., 2014). O ciclo de vida desses parasitos se inicia quando os ovos alcançam a água através da urina ou das fezes de humanos infectados (WENDT; COLLINS, 2016). Após o contato com a água, os ovos liberaram larvas ciliadas de vida livre, denominadas miracídios, que localizam e infectam o hospedeiro intermediário, conhecido como caramujos de água doce (gênero *Biomphalaria* sp. para o *S. mansoni*, *Bulinus* sp. para o *S. haematobium* e, *Oncomelania* sp. para *S. japonicum*) (EVAN SECOR, 2014; WENDT; COLLINS, 2016). Após a infecção, os miracídios se desenvolvem a um

estágio larval conhecido como esporocistos. Os esporocistos, por sua vez, se reproduzem assexuadamente (2 gerações) dando origem a centenas de larvas denominadas cercárias (WENDT; COLLINS, 2016). Ao longo de 4-6 semanas, um miracídio pode se dividir em mais de 20000 cercárias, o que demonstra uma relação não linear entre a contaminação da água e o risco de infecção (GRIMES et al., 2015). As cercárias possuem uma cauda bifurcada (usada para mobilidade na água), uma região de cabeça (usada para fixação na pele do hospedeiro) e glândulas que contêm enzimas proteolíticas que facilitam a penetração na pele (SHAKER et al., 2014). Eventualmente as cercárias deixam o hospedeiro intermediário, geralmente pela manhã, onde permanecem na água até encontrarem um hospedeiro definitivo adequado (GRAHAM; KUMAR, 2014). As cercárias conseguem sobreviver na água por um período de 20 horas até que a infecção do hospedeiro aconteça (WHITFIELD et al., 2003). Evidências apontam que cerca de 200 cercárias são liberadas do hospedeiro intermediário por dia no caso do *S. haematobium*, 250-600 no caso do *S. mansoni* e, geralmente, 15, mas ocasionalmente até cerca de 160, no caso do *S. japonicum* (GRIMES et al., 2015). Após a localização do hospedeiro definitivo, as cercárias penetram na pele, perdem sua calda e se transformam em esquistossômulos (SHAKER et al., 2014). Foi demonstrado em estudos que a grande maioria dos esquistossômulos de *S. mansoni* e *S. haematobium* se encontram na epiderme nas primeiras 24 horas de infecção, migram para a derme após 48 horas de infecção e atingem os vasos dérmicos com 72 horas de infecção (EL RIDI, R. A.; TALLIMA, 2013; HE; SALAFSKY; RAMASWAMY, 2005). Uma vez nos vasos, os esquistossômulos são transportados pelo fluxo sanguíneo a porção direita do coração e, em seguida, aos pulmões (GRAHAM; KUMAR, 2014). Os esquistossômulos permanecem dentro dos finos capilares pulmonares entre 3-15 dias, onde se transformam em organismos mais longos e delgados (EL RIDI, R. A.; TALLIMA, 2013; RHEINBERG et al., 1998). Essa forma lhes permite atravessar a vasculatura pulmonar em direção a porção esquerda do coração e, através da circulação sistêmica, chegam ao fígado (EL RIDI, R. A.; TALLIMA, 2013; GRAHAM; KUMAR, 2014). Os parasitos permanecem alojados no fígado

entre 4-6 semanas após a infecção (GRIMES et al., 2015). No fígado, os mesmos se desenvolvem até atingirem a maturidade sexual, se acasalam e migram para as veias mesentéricas superiores (*S. mansoni*), ou para as veias mesentéricas inferiores e posterior veias hemorroidárias superiores (*S. japonicum*), ou para o plexo perivesical e posterior veias drenantes do ureter (*S. haematobium*) dando início a ovoposição (PAPAMATHEAKIS et al., 2014). As fêmeas desse parasito podem produzir centenas (*S. haematobium* e *S. mansoni*) ou milhares (*S. japonicum*) de ovos por dia. Após a ovoposição, os ovos atravessam a parede dos vasos sanguíneos até o lúmen do intestino ou da bexiga e são liberados do hospedeiro através das fezes ou da urina. Entretanto, mais da metade desses ovos ficam retidos no hospedeiro provocando reações inflamatórias, que são a grande causa da morbidade observada nessa doença (GRIMES et al., 2015). Em contato com a água, os ovos liberam os miracídios e o ciclo de vida do parasito é iniciado novamente (Figura 2) (GRAHAM; KUMAR, 2014).

1.1.1. Patologia da esquistossomose

O perfil clínico da esquistossomose está intimamente relacionado à progressão da resposta imune frente ao processo de maturação do parasito (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013). Sendo assim, os sintomas da doença podem ser determinados pela localização dos parasitos e de seus ovos no hospedeiro e a gravidade da doença pela intensidade e duração da infecção. Entretanto, outros fatores determinantes também podem contribuir para a morbidade, como a constituição genética do hospedeiro, estado nutricional, diferenças de cepa, idade e sexo (GRYSEELS, 2012; OTHMAN; SOLIMAN, 2015; UTZINGER et al., 2015). A patologia gerada pela esquistossomose é comumente dividida em duas condições clínicas: a esquistossomose aguda e a esquistossomose crônica.

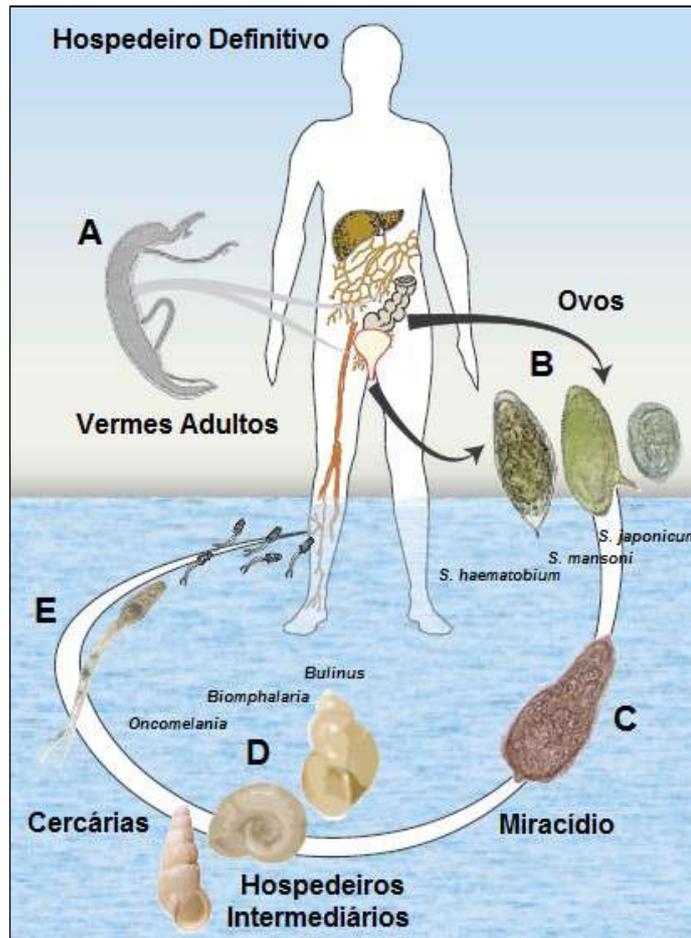


Figura 2: Ciclo de vida do Schistosoma. (A) vermes adultos; (B) ovos; (C) miracídio; (D) hospedeiros intermediários; (E) cercárias. Fonte: (GRYSEELS et al., 2006).

1.1.1.1. Esquistossomose aguda

Nas primeiras 24 horas de infecção, quando as cercárias penetram na pele do hospedeiro e se transformam em esquistossômulos, ocorre a formação de uma erupção eritematosa pontual conhecida como dermatite cercariana que pode durar até 2 dias. Em seguida, os esquistossômulos entram na circulação venosa sistêmica, passam para a circulação pulmonar e, posteriormente, se alojam na vasculatura do pulmão. O quadro clínico gerado pode ser assintomático ou pode ocorrer, em alguns casos, uma reação de hipersensibilidade, denominado de Síndrome de Katayama, que ocasiona febre, calafrios, eosinofilia periférica, dores de cabeça, mialgias ou artralgias, dor abdominal, diarreia sangrenta e mal-estar. Na infecção causada pelo parasito *S. mansoni* também pode

aparecer sintomas respiratórios, como tosse e dispneia ou sibilância. No entanto, complicações da doença aguda, geralmente, se resolvem espontaneamente dentro de algumas semanas (GRAHAM; KUMAR, 2014; PAPAMATHEAKIS et al., 2014). Manifestações clínicas graves e persistentes se desenvolvem durante a fase crônica da doença (BARSOUM et al., 2013).

1.1.1.2. Esquistossomose crônica

O principal objetivo do parasito é destinar seus ovos para o ambiente externo a fim de manter a sobrevivência da espécie. Para isso, os vermes depositam seus ovos o mais próximo possível da bexiga, na infecção pelo *S. haematobium*, ou do cólon distal e reto nas infecções causadas pelas outras espécies de *Schistosoma* (BARSOUM et al., 2013). A patogênese da esquistossomose humana se inicia quando os ovos destinados a sair do corpo, através das fezes ou da urina, penetram nos tecidos ao redor dos órgãos-alvo (MERRIFIELD et al., 2016). Essas áreas são, portanto, os alvos primários da patologia observada. Os outros órgãos atingidos são considerados alvos secundários decorrentes do transporte de ovos pela corrente sanguínea (BARSOUM et al., 2013). Os ovos que ficam retidos nos tecidos induzem inflamação, formação de granulomas e fibrose, podendo levar a uma série de sequelas clínicas (MERRIFIELD et al., 2016).

Na esquistossomose intestinal, os ovos alojados na mucosa ou na submucosa do intestino causam reações granulomatosas e lesões teciduais, que podem então se estender ao lúmen intestinal como pseudopapilomas, polipose, ulceração ou formando abscessos. Os danos gerados se manifestam clinicamente como dor abdominal, diarreia crônica e perda de sangue (SHAKER et al., 2014; WEERAKOON et al., 2015).

Na esquistossomose hepatoesplênica, os ovos que ficam presos no fígado podem provocar respostas granulomatosas, levando à formação de fibrose no tecido periportal. A progressão desse quadro pode causar a obstrução dos vasos portais, danificando assim o parênquima hepático. Como consequência, o hospedeiro pode desenvolver hipertensão

portal, esplenomegalia, ascite e varizes gastroesofágicas. A exsanguinação pelo sangramento varicoso esofágico é a principal causa de morte na infecção pelo *Schistosoma* sp. (SHAKER et al., 2014; SONG et al., 2016).

Na esquistossomose urinária, causada pelo parasito *S. haematobium*, os ovos que ficam retidos na parede da bexiga e dos ureteres podem, inicialmente, desencadear o surgimento da disúria, hematúria, proteinúria e leucocitúria. Os rins, bexiga e genitais podem ser seriamente afetados após a instalação da infecção crônica e, em casos mais graves podem levar a insuficiência renal. Essa fase da doença, geralmente, é manifestada pela cólica renal, hidroureter e hidronefrose (BERGQUIST; UTZINGER; KEISER, 2017; BURKE et al., 2009; OTHMAN; SOLIMAN, 2015). Muitos estudos descrevem que a infecção pelo *S. haematobium* pode estar associada ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas da bexiga (MERRIFIELD et al., 2016) e ao aumento dos riscos de infecções sexualmente transmissíveis (WEERAKOON et al., 2015).

1.1.2. Resposta imune na esquistossomose

Após a infecção do hospedeiro vertebrado, o parasito *Schistosoma* passa por vários estágios de desenvolvimento. Cada estágio pode conter centenas e/ou milhares de porções antigênicas que induzem a ativação tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adaptativa no hospedeiro (COLLEY et al., 2014).

1.1.2.1. Resposta imune inata contra à esquistossomose

A resposta imune inata é conhecida por ser a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos, além de promover e mediar o recrutamento da resposta imune adaptativa. O hospedeiro apresenta uma série de receptores e vias de sinalização celular que são imediatamente ativados após a infecção (BARBER, 2011). Os TLRs (do inglês *Toll-like receptors*) são uma classe importante de receptores da resposta imune inata. Esses receptores são do tipo trans-membranares e podem ser encontrados tanto na membrana

celular (TLR 1, 2, 4, 5, 6 e 10) quanto no compartimento endossomal (TLR 3, 7, 8 e 9) (CHEN, J. Q.; SZODORAY; ZEHER, 2016).

Evidências demonstram que a ativação de alguns TLRs podem apresentar relação direta com a patologia induzida pela esquistossomose. Um estudo anterior correlacionou a ativação da via de TLR4 com a gravidade da fibrose hepática de camundongos BALB/c infectados com o parasito *S. japonicum*. A expressão aumentada de TLR4 e de actina de músculo liso α (α -SMA) foi observada tanto em células estreladas hepáticas (HSCs) de camundongos infectados quanto em HSCs humanas estimuladas *in vitro* com antígeno de ovo solúvel (SEA) (WEN et al., 2017). Outro estudo mostrou que a lisofosfatidilcolina derivada de vermes adultos do parasito *S. mansoni* (Schisto-LPC) possui a capacidade de se ligar ao TLR2 de eosinófilos humanos e induzir a secreção de TGF- β pró-fibrótica (MAGALHAES et al., 2018).

Evidências sugerem que a ativação das células dendríticas via TLRs influencia tanto na magnitude quanto na polarização funcional da resposta imune (VANHOUTTE et al., 2007). Um trabalho demonstrou que o tegumento do esquistossômulo (Smteg) ativa células dendríticas derivadas da medula óssea via TLR4 / MyD88, induzindo tanto a produção das citocinas inflamatórias IL-12p40 e TNF- α quanto o aumento dos níveis de expressão das moléculas coestimulatórias CD40 e CD86 (DURAES et al., 2009). Outro trabalho mostrou que a via de TLR9 de células dendríticas possui um papel importante na resposta granulomatosa pulmonar de camundongos BALB/c desafiados com ovos do parasito *S. mansoni*. Células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos TLR9^{-/-}, previamente estimuladas com SEA, induziram células T CD4⁺ a secretarem baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 após a co-cultura. Na análise histopatológica, camundongos TLR9^{-/-} apresentaram um aumento no tamanho dos granulomas pulmonares e uma maior deposição de colágeno quando comparados ao grupo controle. A transferência adotiva de células dendríticas WT para camundongos TLR9^{-/-} resultou em um fenótipo do granuloma semelhante ao observado em camundongos WT (ITO et al., 2009).

Um estudo demonstrou que o reconhecimento de antígenos de ovos do parasito *S. mansoni* pelos receptores TLR2 e TLR3 de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 induziram a produção das citocinas inflamatórias IL-12p40 and TNF- α . Células dendríticas estimuladas com ovos do parasito induziram linfócitos T CD4+ a secretarem baixos níveis de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) após a co-cultura, de maneira dependente de TLR3. Contudo, camundongos TLR2^{-/-} e TLR3^{-/-} não apresentaram diferenças na carga parasitária, na contagem de ovos hepáticos, no tamanho dos granulomas no fígado e na deposição de colágeno quando comparados aos camundongos WT (VANHOUTTE et al., 2007). Esses dados divergem em relação a outros trabalhos sobre o papel do receptor TLR2 na patologia de camundongos C57BL/6. Um estudo mostrou que camundongos TLR2^{-/-} infectados com o parasito *S. japonicum* apresentaram uma menor carga de ovos hepáticos comparados aos camundongos WT. Além disso, os camundongos TLR2^{-/-} apresentaram uma elevada expressão de genes de ativação de células T e de alguns genes citotóxicos no baço (*cd3g*, *cd96*, *cd7*, *tcra*, *ifit1*, *ifi27*, *lck*, *lat*, *ligp1*, *itk*, *tgtp*, *cd8a*, *gzma*, *gzmb*, *gzmk*, *prf1*, *fasl*, *klra8*, *klrk1* e *crtam*), bem como um aumento da produção sistêmica de citocinas Th1/Th2 (IFN- γ , IL-12p70, IL-2, IL-4, and GM-CSF) e uma diminuição da citocina IL-10 (ZHANG et al., 2011). Corroborando com esse resultado, outro estudo mostrou que camundongos TLR2^{-/-} infectados com o parasito *S. mansoni* apresentaram uma diminuição tanto na carga de ovos hepáticos quanto na população de células T CD4+CD25+ (Treg) no baço. Além disso, esses animais exibiram um aumento no tamanho médio dos granulomas hepáticos. A inativação funcional das células Treg de camundongos WT infectados com anti-CD25 resultou em uma imunopatologia semelhante a observada em camundongos TLR2^{-/-} (LAYLAND et al., 2007).

Outra importante classe de receptores do sistema imune inato são os NLRs (do inglês *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing receptors*), que podem atuar na proteção contra doenças parasitárias. Esses receptores são responsáveis pela ativação do complexo multiproteico conhecido como inflamassoma (DE CARVALHO et al., 2019;

GORFU et al., 2014). Após o reconhecimento do estímulo, ocorre a oligomerização dos receptores e a subsequente associação com a proteína adaptadora ASC (do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). Após a formação do complexo multiproteico, ocorre o recrutamento e a oligomerização da pró-caspase-1 e posterior indução de seu processamento autoproteolítico (RIESTRA et al., 2019; YDENS et al., 2015). Esse processo promove a ativação da caspase-1, a qual está relacionada à lise celular e à liberação do conteúdo intracelular (piroptose) (GORFU et al., 2014). Nesse processo, a caspase-1 também promove a maturação e a secreção das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18, através da clivagem de suas pró-formas (RIESTRA et al., 2019). Dentre os receptores NLRs, as subfamílias mais estudadas são o NLRP e o NLRC (PLATNICH; MURUVE, 2019). A subfamília NLRP, que apresenta domínios de pirina (PYD), é composta por 14 membros distintos (NLRP1-NLRP14) (HUBER; EIBL; FUCHS, 2015; PLATNICH; MURUVE, 2019).

Um dos primeiros estudos *in vivo* associando a via de sinalização do inflamassoma na esquistossomose estabeleceu o papel da proteína antagonista do receptor de IL-1 endógena (IRAP) na resposta granulomatosa mediada por células T aos ovos de *S. mansoni* nos pulmões. A depleção dessa proteína aumentou a área do granuloma, bem como a expressão de várias citocinas na cultura de células linfonodais (CHENSUE et al., 1993). Outro estudo determinou que as citocinas necessárias para a produção máxima do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) por macrófagos inflamatórios na inflamação granulomatosa pulmonar foram o IFN- γ e o TNF- α (RUTH et al., 1996). Esses trabalhos abriram caminho para novas descobertas acerca de como a via de sinalização de IL-1 atua na patologia associada à esquistossomose. Um estudo mostrou que componentes do SEA induziram a produção de IL-1 β em células dendríticas via Dectina-2 / FcR γ / Syk. A via de Syk ativa o inflamassoma NLRP3 de maneira dependente do efluxo de potássio e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 3) . Além disso, camundongos ASC^{-/-} e Nlrp3^{-/-} infectados com o parasito *S. mansoni* exibiram uma diminuição no tamanho

médio dos granulomas hepáticos e baixos níveis de IL-1 β no fígado quando comparados aos camundongos C57BL/6 (RITTER et al., 2010). Outro estudo demonstrou que o inflamassoma NLRP3 foi ativado em HSCs de camundongo BALB/c infectados com o parasito *S. japonicum*. A ativação do inflamassoma NLRP3 induzido por SEA em HSCs ocorreu via Dectina-1 e foi dependente da ativação de JNK e Syk (LU et al., 2017). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a deficiência de NLRP6 em camundongos C57BL/6 infectados com o parasito *S. mansoni* resultou em uma redução significativa na inflamação periovular e na deposição de colágeno de granulomas hepáticos (SANCHES; SOUZA; MARINHO; et al., 2020).

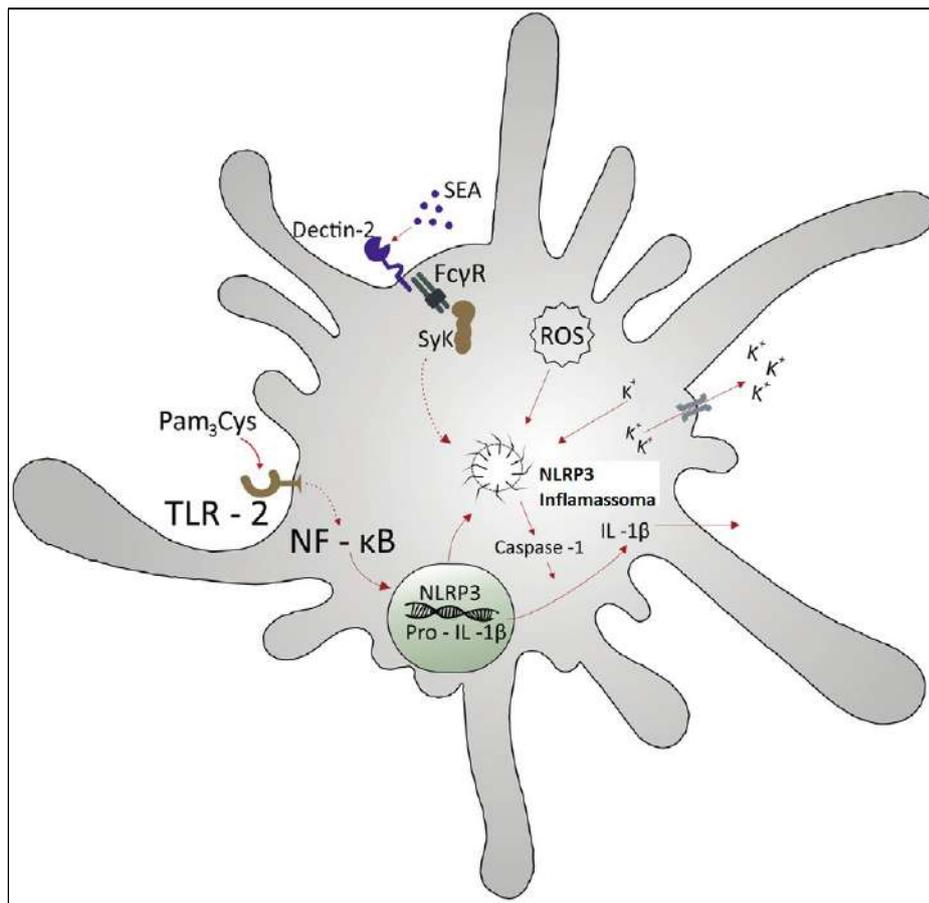


Figura 3: Mecanismos de ativação do inflamassoma induzido por SEA em células dendríticas.

Em células dendríticas derivadas da medula óssea, a montagem do inflamassoma requer o primeiro sinal, via TLR2 (Pam3Cys), seguido pela ativação da via Dectina-2 / FcγR / Syk por componentes do ovo (SEA). Posteriormente, Syk induz a ativação do inflamassoma NLRP3 de maneira dependente do

efluxo de potássio e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Fonte: (SANCHES; SOUZA; OLIVEIRA, 2020).

1.1.2.1.1. Mecanismos de evasão da resposta imune inata

A ativação de TLRs específicos têm sido relatada em trabalhos sobre os possíveis mecanismos de evasão do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 estimulados com produtos excretados/segretados de cercárias do *S. mansoni* após 3 horas de cultura (0-3hRP) exibiram altos níveis IL-10. A produção dessa citocina foi associada ao recrutamento do fator de transcrição CREB para a região promotora de *IL-10*, após ativação de TLR2 e TLR4. A secreção de IL-10 pelos macrófagos, possivelmente, modula a resposta imunológica na pele, limitando a inflamação e possíveis danos ao tecido (SANIN; PRENDERGAST; MOUNTFORD, 2015). Corroborando com esse resultado, outro trabalho do mesmo grupo mostrou que a molécula Sm16, encontrada em abundância no pellet de 0-3hRP pós-centrifugação, induziu tanto a produção de IL-10 quanto o bloqueio da ativação clássica de macrófagos em resposta aos ligantes de TLR3 e TLR4. Além disso, Sm16 provocou o atraso no processamento de antígenos de *Escherichia coli* nos fagossomos de macrófagos (SANIN; MOUNTFORD, 2015). A capacidade do peptídeo imunomodulador SJMHE1 da proteína HSP60 de *S. japonicum* em inibir a produção de citocinas em resposta aos ligantes de TLR4, TLR9 ou TLR7/8 em células do baço de camundongos C57BL/6 e de TLR4 em células mononucleares do sangue periférico de humanos também foi demonstrada. Além disso, o SJMHE1 conseguiu suprimir os sinais clínicos da artrite induzida por colágeno do tipo II bovino em camundongos DBA/1 (WANG et al., 2017).

1.1.2.2. Resposta imune adaptativa contra à esquistossomose

Após a passagem pela pele do hospedeiro, os esquistossômulos atingem os vasos dérmicos e são transportados pelo fluxo sanguíneo até a vasculatura pulmonar. Nessa fase

da doença, a infecção pode progredir para um estágio agudo sintomático conhecido como Síndrome de Katayama (MCMANUS et al., 2018). Essa reação ocorre com pouca frequência em populações endêmicas, mas é comum entre pessoas advindas de áreas não endêmicas após a infecção primária (BURKE et al., 2009; KING et al., 1998). Os sintomas são atribuídos a um quadro de hipersensibilidade sistêmica e a formação de complexos imunes em resposta a antígenos liberados durante a migração dos parasitos no hospedeiro (LAWSON; BICKLE; TAYLOR, 1993; MCMANUS et al., 2018; ROSS et al., 2007; WILSON; COULSON, 2009). Um estudo *in vitro* demonstrou que os anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 causaram a morte de esquistossômulos através da indução de mecanismos citotóxicos mediados por eosinófilos (KHALIFE et al., 1989). Contudo, os esquistossômulos perdem a vulnerabilidade a esse tipo de mecanismo dentro de 24 horas (LAWSON et al., 1993; WILSON; COULSON, 2009). Evidências apontam que a resistência adquirida pelos parasitos não pode ser associada ao mimetismo de antígenos, renovação de membrana, desprendimento de antígenos ou liberação de moléculas e proteases imunomoduladoras. A resistência à anticorpos, sistema do complemento, macrófagos e eosinófilos é atribuída, principalmente, a propriedades bioquímicas e biofísicas na estrutura das membranas de superfície do parasito que atuam como um escudo de proteção (EL RIDI, R.; TALLIMA; MIGLIARDO, 2017; WILSON; COULSON, 2009). Quando os esquistossômulos chegam na vasculatura pulmonar e tentam passar pelos finos capilares pulmonares, ocorre o contato íntimo entre o tegumento dos parasitos e o endotélio capilar. Esse contato pode gerar interações de adesão, bem como a transcitose de antígenos para os espaços intersticiais. O fato dos esquistossômulos estarem em um espaço apertado, provavelmente, limita a difusão das secreções imunoreguladoras e permite que o hospedeiro tenha tempo de montar uma resposta imune mediada por células (WILSON; COULSON, 2009). Essa resposta foi estudada em camundongos vacinados com cercárias atenuadas de *S. mansoni*. Durante a passagem dos esquistossômulos pelo pulmão desses animais ocorreu a formação de uma reação imunológica dependente de células polimorfonucleares e células mononucleares,

incluindo células T CD4+ do tipo I (Th1) que secretam IFN- γ (ANGELES; MERCADO; RIVERA, 2020; COULSON et al., 1998; CRABTREE; WILSON, 1986; MENSON; COULSON; WILSON, 1989).

Com o início da ovoposição, parte dos ovos produzidos pelos parasitos podem ficar presos em tecidos e órgãos após serem transportados pela corrente sanguínea. A estimulação antigênica contínua gerada pelos ovos retidos induz o recrutamento sequencial de células imunes e a formação de granulomas periovulares (CHUAH et al., 2014). Os granulomas são compostos por agregados bem definido de células inflamatórias, como linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos, envolvidos por uma matriz extracelular colagenizada (OLVEDA et al., 2014; SHAKER et al., 2014; SKELLY, 2013). Essa resposta é dependente da ativação das células T CD4+ do tipo II (Th2) que produzem altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 (CHUAH et al., 2014; FALLON et al., 2000). A IL-13 é a principal citocina responsável por promover a fibrogênese (CHIARAMONTE et al., 1999; YOU; MCMANUS, 2015). Após a secreção dessa citocina, os fibroblastos são estimulados a proliferar, substituindo a maioria dos elementos celulares e mediando a deposição de colágeno (OLVEDA et al., 2014; SHAKER et al., 2014; SKELLY, 2013). Os granulomas começam progressivamente a se tornar mais fibróticos à medida que os ovos são degradados. Entretanto, a fibrose gerada persiste mesmo após a depuração dos ovos (GRAHAM; KUMAR, 2014). A forte resposta Th2 se mantém até 12 semanas do início da infecção, quando a fase aguda é regulada e, então, substituída por uma fase crônica (Figura 4). Durante a fase transitória, os macrófagos mudam seu papel protetor, observado durante a fase aguda, para um padrão de cicatrização mediado por uma reação fibrótica concêntrica, que é uma característica da fase crônica da doença (DE OLIVEIRA et al., 2017; HESSE et al., 2001).

A citocina IL-33 e seu receptor ST2L são expressos constitutivamente no fígado saudável. Contudo, suas expressões podem aumentar após uma lesão hepática. Estudos demonstram que a IL-33 possui um papel fundamental na iniciação, amplificação e

manutenção da resposta Th2 na esquistossomose (PENG et al., 2016). A citocina IL-33 é um importante estimulador das células linfoides inatas do grupo 2 - ILC2 (HAMS et al., 2016). Após a estimulação, as ILC2 produzem IL-13 que inicia a imunidade Th2 (HAMS et al., 2014). Além disso, a IL-33 atua na ativação de macrófagos alternativamente ativados na infecção causada pelo *S. japonicum* (PENG et al., 2016).

Os ovos contêm uma ampla variedade de proteases e porções que são altamente tóxicas e podem induzir à necrose do tecido onde estão alojados. Uma forte resposta imune granulomatosa é então formada com a finalidade de isolar os ovos e os produtos proteolíticos que eles liberam. Entretanto, a inflamação e a fibrose gerada pela estimulação excessiva dessa resposta podem ser potencialmente letais ao hospedeiro. Devido a isso, o desenvolvimento efetivo da imunomodulação impede que os granulomas sobrecarreguem o tecido ou bloqueiem o fluxo sanguíneo a qual eles se encontram (COLLEY et al., 2014; SHAKER et al., 2014).

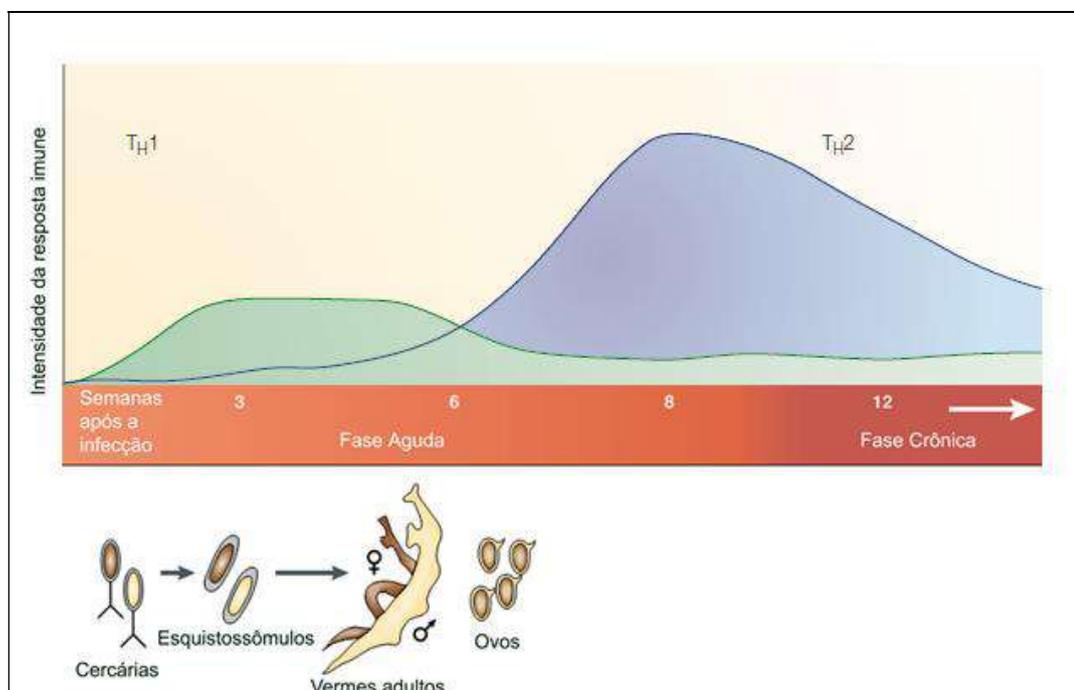


Figura 4: Fases da resposta imune adaptativa na esquistossomose. Fonte: (PEARCE; MACDONALD, 2002).

A manutenção do equilíbrio entre a polarização das respostas Th1 e Th2 é crucial para prolongar a sobrevivência do hospedeiro durante o curso da esquistossomose (NDLOVU; BROMBACHER, 2014). Evidências demonstram que a estimulação excessiva das respostas Th1 ou Th2 pode gerar graves consequências (OLVEDA et al., 2014; SKELLY, 2013). A citocina IL-10 desempenha um papel regulador chave na esquistossomose devido a sua capacidade de impedir respostas imunes polarizadas exacerbadas. Camundongos deficientes em IL-10 / IL-4 exibiram uma robusta polarização da resposta Th1 e morte associada a superexpressão dos mediadores pró-inflamatórios IFN- γ , TNF- α e NO induzível, a formação de granulomas não fibróticos e a altos níveis séricos de aspartato transaminase. Em contrapartida, camundongos deficientes em IL-10 / IL-12 apresentaram uma forte polarização da resposta Th2 e morte relacionada a uma acentuada produção de IL-4 e IL-13, a um aumento da fibrose hepática e a formação de granulomas com elevado número de eosinófilos (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000). Um estudo demonstrou que a IL-10 gerada durante a resposta imune inata e adaptativa regulam o desenvolvimento da resposta Th2, a patologia e a sobrevivência do hospedeiro infectado. Grande parte da IL-10 produzida pelas células T CD4+ foi atribuída ao subconjunto que expressa CD25 (HESSE et al., 2004). Outro estudo mostrou que camundongos infectados tratados com anti-IL-10R mAb e anti-TGF- β mAb no início da produção de ovos apresentaram inflamação hepática grave, granulomas aumentados, elevada expressão de IL-4, IL-6, TNF, IFN- γ e IL-17 e mortalidade superior a 80% (HOFFMANN et al., 2000).

1.2. Potenciais alvos terapêuticos para a esquistossomose

Evidências demonstram que a eliminação da esquistossomose exigirá uma abordagem multifacetada. Dentre elas, o tratamento medicamentoso de pacientes infectados possui forte impacto. Atualmente, o fármaco mais utilizado no combate a esquistossomose é o Praziquantel. Contudo, essa droga apresenta algumas limitações, como a ausência de efeitos contra os vermes imaturos, a incapacidade de impedir a reinfecção, além do

surgimento de resistência dos parasitos a esse medicamento (CROSNIER et al., 2019; MCMANUS et al., 2018). Devido a esses fatores, a melhor compreensão da biologia de infecção da esquistossomose pode auxiliar na identificação de novos alvos terapêuticos e/ou profiláticos para a doença. Uma importante área de estudo que vem ganhando cada vez mais destaque em pesquisas recentes envolve a inibição da ativação de receptores específicos da resposta imune inata.

Atualmente os receptores da subfamília NLRP têm sido considerados interessantes alvos contra as respostas inflamatórias acentuadas. Camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com o parasito *S. japonicum* exibiram um aumento na deposição de colágeno no fígado quando comparados aos camundongos não infectados. A administração de um potente inibidor seletivo de caspase-1 (YVAD) ou do adenovírus AAV8 associado com shNLRP3 gerou uma diminuição da deposição de colágeno quando comparados aos camundongos infectados que não receberam o tratamento (LU et al., 2017; MENG et al., 2016). Outro estudo recente sugeriu o aminoácido taurina como uma possível terapia para aliviar ou prevenir a ocorrência da fibrose associada a esquistossomose. O estresse oxidativo causado por uma doença hepática faz com que a proteína que interage com a tioredoxina (TXNIP) se dissocie, liberando TXNIP que, subsequentemente, ativa o inflamassoma NLRP3. O suplemento com taurina suprimiu a ativação TXNIP/inflamassoma NLRP3 hepático e, conseqüentemente, a ativação de mediadores inflamatórios e a piroptose de camundongos C57BL/6 infectados com o parasito *S.japonicum* (LIU et al., 2019).

1.3. STING e sua regulação

A resposta imune inata é ativada após uma infecção por meio da detecção de um conjunto limitado de moléculas conhecido como Padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs (RONGVAUX, 2017). Os ácidos nucleicos de uma agente infeccioso (DNA, RNA ou nucleotídeos) são considerados uma classe importante de PAMPs. Os Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) presentes no hospedeiro, geralmente,

conseguem distinguir entre o material genético de patógenos e o produzido por suas próprias células através da diferença na composição de bases específicas, modificações químicas, estruturas secundárias ou por sua localização. Após o reconhecimento, as células infectadas induzem respostas imunes efetoras contra os agentes invasores (RONGVAUX, 2017; SHU; LI; LI, 2014). Entretanto, o processo de detecção deve ser rigorosamente regulado pois o reconhecimento inadequado dos ácidos nucleicos derivados do próprio hospedeiro (células danificadas e mitocôndrias) podem causar graves doenças auto-imunes (XIA et al., 2016).

O hospedeiro possui diversos sensores de DNA presentes tanto no citoplasma quanto no compartimento endossomal. Dentre eles, os três mais estudados atualmente são: o TLR9, o ausente no melanoma 2 (AIM2) e a enzima GMP-AMP sintase cíclica (cGAS). O TLR9 reconhece domínios CpG não-metilados presente nos endossomos das células. O reconhecimento de DNA pelo TLR9 induz o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) a ativar tanto o fator nuclear kappa B (NF- κ B) quanto a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), levando a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-12 (GALLUCCI; MAFFEI, 2017; XIA et al., 2016). O AIM2 é conhecido por formar o complexo multiproteico inflamassoma, que ativa caspase-1 e induz a maturação das citocinas inflamatórias pró-IL-1 β , pró-IL-18 e da gasdermina D (molécula efetora da morte celular por piroptose) (GAIDT et al., 2017; PLATNICH; MURUVE, 2019; SHU et al., 2014). O cGAS reconhece DNA e híbridos DNA-RNA presente no citoplasma das células. Após o reconhecimento, cGAS produz um segundo mensageiro que se liga a proteína estimuladora de genes de interferons (STING) e induz a produção de IFN do tipo I (GALLUCCI; MAFFEI, 2017; LAI et al., 2020; LUECKE; PALUDAN, 2017).

O DNA derivado de patógenos é capaz de causar potentes respostas imunológicas e inflamatórias no hospedeiro. A via de sinalização cGAS-STING é o principal mecanismo de detecção de DNA em células de mamíferos. O reconhecimento de DNA pelo cGAS induz uma mudança conformacional que permite que o ATP e o GTP entrem em sua cavidade

catalítica levando à síntese do GMP-AMP cíclico (2'3'-cGAMP). A ciclização dessa molécula é gerada pela formação de duas ligações fosfodiéster, uma entre o 2'-OH de GMP e o 5'-fosfato de AMP e a outra entre o 3'-OH de AMP e o 5'-fosfato de GMP. O 2'3'-cGAMP produzido funciona como um segundo mensageiro que se liga com alta afinidade ao adaptador de membrana do retículo endoplasmático (RE) STING, promovendo a sua oligomerização e ativação. Subsequentemente, STING trafega do RE para o compartimento intermediário que existe entre essa organela e o complexo de Golgi para finalmente chegar ao aparelho de Golgi. Durante este processo, a região carboxila terminal de STING (CTT, do inglês *C-terminal tail*) recruta e ativa a quinase ligante de TANK 1 (TBK1) que, por sua vez, fosforila uma região conservada dentro do CTT de STING. Após a fosforilação de STING, ocorre o recrutamento do fator de transcrição IRF3, que é, posteriormente, fosforilado de maneira dependente de TBK1. A fosforilação do IRF3 promove a sua dimerização e, posterior, translocação para o núcleo. O STING também ativa a quinase IKK que fosforila a família IκB de inibidores do fator de transcrição NF-κB. As proteínas IκB fosforiladas são degradadas via ubiquitina-proteassoma, isso libera o NF-κB, que transloca para o núcleo e em conjunto com IRF3 e outros fatores de transcrição induzem a expressão de IFN do tipo I, genes estimulados por IFN (ISG) e citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias (Figura 5) (CHEN, Q.; SUN; CHEN, 2016; GAIDT et al., 2017; GLUCK; ABLASSER, 2019; MOTWANI; PESIRIDIS; FITZGERALD, 2019; SHU et al., 2014; SWANSON et al., 2017; XIA et al., 2016). A intensificação da resposta imune celular gerada após a ativação dessa via pode ser alcançada através da transferência do 2'3'-cGAMP das células infectadas para as células vizinhas não infectadas pelas junções GAP (CHEN, Q. et al., 2016).

STING é uma proteína transmembranar que contém três porções, uma região N terminal, uma região média de ligação ao dinucleotídeo cíclico (CBD) e uma região carboxila terminal CTT. Nas células não estimuladas, a interação entre o CBD e CTT mantém um status auto-inibido de STING. A ligação com o 2'3'-cGAMP desloca o CTT do CBD, induzindo à oligomerização e ativação de STING (GAO; HU; SHU, 2020). Na literatura têm

sido descrito que STING também responde aos dinucleotídeos cíclicos (CDNs) produzidos por vários tipos de patógenos bacterianos (MARGOLIS; WILSON; VANCE, 2017). Nas bactérias, os CDNs são sintetizados por ciclases de dinucleotídeos específicos e degradados por fosfodiesterases. Essas moléculas cíclicas possuem um papel central na regulação do metabolismo bacteriano. Os CDNs mais bem caracterizados são c-di-GMP, o c-di-AMP e o 3'3'cGAMP, que estão envolvidos na formação de biofilmes, esporulação, homeostase da parede celular e com a virulência (MARINHO et al., 2017).

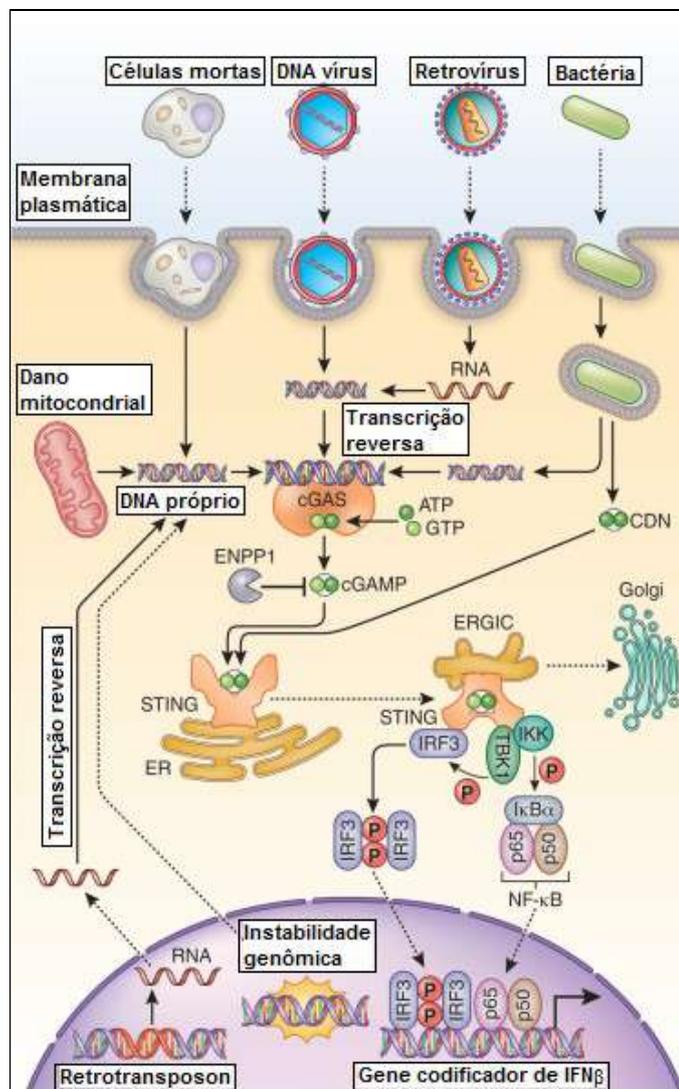


Figura 5: Via cGAS-STING de detecção do DNA citosólico. Fonte: (CHEN, Q. et al., 2016).

cGAS é essencial para o reconhecimento de DNA citoplasmático na forma B, a mais predominante no meio celular. Esse reconhecimento ocorre de maneira independente da sequência, pois essa enzima se liga a estrutura açúcar-fosfato sem detectar as bases individuais (DHANWANI; TAKAHASHI; SHARMA, 2018). A incapacidade que cGAS apresenta de distinguir o DNA derivado de patógenos ou do próprio hospedeiro aumenta o risco do aparecimento de respostas auto-imunes indevidas (MARGOLIS et al., 2017). Além do cGAS, existem outros sensores que também possuem a capacidade de ativar STING, como o DEAD-box helicase 41 (DDX41), a proteína indutível por IFN 16 (IFI16), o fator regulador de IFN (DAI) e os componentes das vias de detecção de RNA, como a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) dependente de RLR (do inglês *RIG-I-like receptor*) (LI, Y.; WILSON; KISS-TOTH, 2017).

A expressão de IFN do tipo I e citocinas pró-inflamatórias pela via cGAS-STING após o reconhecimento do DNA de patógenos é essencial para o combate de vários tipos de infecções. Contudo, a forte resposta inflamatória gerada pela ativação dessa via precisa ser restringida devido aos efeitos prejudiciais que a produção inadequada do IFN do tipo I pode causar (MARGOLIS et al., 2017). Uma das estratégias utilizadas para o controle de ativação da via ocorre através da limitação da quantidade intracelular de: (1) DNA, um mecanismo que pode envolver DNases: extracelulares (DNase I e DNase I tipo 3), no compartimento fagolisossômico (DNase II) ou no citosol [TREX1 (do inglês *three-prime repair exonuclease 1*; também conhecido como DNase III)]; e de (2) 2'3'-cGAMP, através do balanço entre as taxas de síntese e de decaimento. A degradação do 2'3'-cGAMP pode ser realizada pela enzima extracelular ENPP1 com alta especificidade (CHEN, Q. et al., 2016; MOTWANI et al., 2019). Outra forma de controle ocorre através das modificação pós-traducionais ou interações proteína-proteína que podem afetar a estabilidade, atividade e tráfico de cGAS ou de STING (MOTWANI et al., 2019).

2. JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada que afeta aproximadamente 240 milhões de pessoas no mundo. A infecção pode gerar consequências patológicas e imunológicas potencialmente letais ao hospedeiro (COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018; MCMANUS et al., 2018). Devido a essa característica, têm se tornado necessária a realização de mais estudos que visam a melhor compreensão da biologia de infecção da doença. O sistema imune inato é responsável pelo reconhecimento inicial de um agente patogênico e pela ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Recentemente, muitos estudos vem demonstrando que os receptores e vias de sinalização celular da resposta imune inata apresentam um papel relevante durante o curso da esquistossomose. Contudo, essa área ainda é pouco conhecida e precisa de mais investigação.

Os ácidos nucleicos derivados de patógenos podem ser detectados através de sensores específicos, gerando potentes respostas imunológicas e inflamatórias no hospedeiro. O STING é uma importante molécula adaptadora envolvida em várias vias de reconhecimento de DNA. Têm sido amplamente descrito que a via de STING pode atuar em vários tipos de câncer, doenças autoimunes, infecções virais e bacterianas. No entanto, pouco se sabe sobre as implicações que STING e seus sensores associados podem causar na resposta imune contra helmintos (MARINHO et al., 2017). A migração de larvas e vermes adultos do *S. mansoni* nos tecidos do hospedeiro pode ocasionar danos celulares, levando à liberação tanto de DNA endógeno quanto parasitário. Evidências demonstram que existem moléculas de carga que auxiliam o DNA extracelular a ter acesso ao espaço intracelular e desencadear a via de STING (POLI et al., 2017). Devido a isso, este estudo tem como objetivo compreender o papel de STING no controle da infecção e na patologia induzida pela esquistossomose. A compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento e progressão da esquistossomose pode auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e/ou profiláticas para a doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da molécula adaptadora STING no controle da infecção e na patologia induzida pelo parasito *Schistosoma mansoni* em modelo murino.

3.2. Objetivos específicos

- i. Verificar se o DNA do parasito *S. mansoni* é capaz de ativar STING em fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) e se esse reconhecimento é dependente de cGAS;
- ii. Infectar camundongos C57BL/6 deficientes em STING e avaliar a carga parasitária;
- iii. Analisar a patologia hepática de camundongos infectados;
- iv. Medir os níveis de anticorpos séricos presentes no soro de camundongos infectados;
- v. Avaliar o perfil de citocinas produzido pelas células do baço de camundongos infectados restimuladas com antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP);
- vi. Avaliar o perfil de citocinas e a celularidade no lavado bronco-alveolar (BAL) e pulmão de camundongos infectados;
- vii. Medir a porcentagem de neutrófilos no baço de camundongos infectados;
- viii. Analisar a sobrevivência e a função de neutrófilos da medula óssea de camundongos deficientes em STING após estimulação com IFN- γ ;
- ix. Analisar a microbiota intestinal.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos de seis a doze semanas de idade. Os camundongos C57BL/6 (WT) foram adquiridos do biotério pertencente ao Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LIDI), do Centro de Bioterismo (CEBIO) e do Biotério Central, todos situados na Universidade Federal de Minas Gerais. Os camundongos deficientes nos genes *TMEM173* (Sting^{-/-}) e *MB21D1* (cGAS^{-/-}) foram obtidos através do Dr. G. Barber da Universidade de Miami-EUA (ISHIKAWA; BARBER, 2008; LI, X. D. et al., 2013). Durante a realização dos ensaios experimentais, os animais foram mantidos no biotério do LIDI em microisoladores forrados com maravalha. Os camundongos foram alimentados com uma dieta à base de água e ração estéreis e, acomodados em ambiente com condições adequadas de higiene e temperatura. Os experimentos envolvendo animais deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com protocolo de permissão de número 367/2017.

4.2. Parasito (cercárias, esquistossômulos e vermes adultos).

As cercárias da cepa LE do parasito *S. mansoni* utilizadas neste estudo foram adquiridas da Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ - Belo Horizonte) através da exposição de caracóis *Biomphalaria glabrata* infectados à luz. O número e a viabilidade das cercárias foram verificados com o auxílio de um microscópio com lupa estereoscópica antes da infecção.

Para a obtenção dos esquistossômulos, as cercárias foram inicialmente concentradas em uma membrana de 25µm, desinfectadas com uma solução contendo 10000 unidades de penicilina e 10mg de estreptomicina/mL – solução PenEstrep (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 2% em água estéril e concentradas em tubos falcons em meio RPMI

1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) acrescentado de 2% de solução PenEstrep. Em seguida, os tubos foram vortexadas de quatro a oito vezes durante 3 minutos com o intuito de desprender os corpos das cercárias de suas caudas. Nos intervalos o material foi colocado no gelo por cerca de 3 minutos. As caudas desprendidas foram então separadas em uma solução contendo Percoll a 30% (Pharmacia, Uppsala, Suécia) em água estéril através de uma centrifugação a 500xG por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, os esquistossômulos foram cultivados por 7 dias *in vitro* em meio de cultura DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) acrescentado com 10% de FBS - Soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 5% de solução PenEstrep, 8µg/mL de insulina do pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 1µg/mL de hidrocloreto de serotonina (Sigma-Aldrich) e suplemento de poliamina 1X (Sigma-Aldrich) (DA'DARA; SKELLY, 2015).

Para a obtenção de vermes adultos, os camundongos foram inicialmente anestesiados com uma solução salina (0,9% de NaCl) contendo 25% de Quetamina e 9% de Xilazina. Em seguida, os animais foram infectados através da exposição percutânea da pele abdominal a um anel acrílico contendo aproximadamente 100 cercárias do parasito *S. mansoni* por 1 hora. Após 40 dias de infecção, os camundongos foram sacrificados por meio de uma câmara de CO₂ e, posteriormente, perfundidos. Nesse processo, foi introduzido uma agulha acoplada a uma bomba peristáltica na artéria aorta para a injeção de salina (0,9% de NaCl) acrescentado de Citrato de sódio (15g/L), evitando a coagulação sanguínea. A solução de perfusão eliminada através da veia porta, contendo os vermes adultos, foi coletada em recipientes apropriados. Posteriormente, os tecidos e vênulas dessa região foram atenciosamente examinados a procura de vermes que tenham ficado retidos. Os vermes encontrados foram colocados junto à solução de perfusão. Em seguida, os vermes foram recuperados.

O SWAP (do inglês *soluble adult worm antigen*) foi adquirido através da maceração mecânica de vermes adultos obtidos de camundongos C57BL/6 em PBS 1X (tampão Salina-fosfato, pH 7.2). Os vermes foram macerados 6 vezes por cerca de 30 segundos com o

auxílio de um macerador. Nos intervalos o material foi colocado no gelo por 30 segundos. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação de 7 minutos a 14000xG. O sobrenadante foi coletado e dosado através do kit de ensaio de dosagem de proteínas BCA (Thermo Fisher Scientific). Após dosagem, o sobrenadante foi armazenado a -80°C para posteriores ensaios.

4.3. Análise da carga parasitária

Os níveis de resistência foram calculados através da comparação do número total de vermes recuperados, fêmeas e machos, do grupo teste em relação ao grupo controle, como na seguinte fórmula:

$$\text{Nível de resistência} = \frac{[(\text{Total de vermes WT} - \text{Total de vermes Grupo Teste}) / \text{Total de vermes WT}] \times 100}{}$$

4.4. Coleta de sangue

Após a infecção, foram realizadas coletas de aproximadamente 0,3mL de sangue submandibular dos camundongos nos dias 0, 7, 19 e 35. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram mantidos em geladeira por cerca de 30 minutos e, posteriormente, centrifugados a 4500xG por 15 minutos. Após a centrifugação, os soros foram coletados e armazenados a -20°C até o momento da utilização. Todas as etapas após a coleta de sangue foram realizadas mantendo as amostras a 4°C.

4.5. Medida de anticorpos séricos

A análise da presença de anticorpos IgG total no soro dos animais foi realizada por ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Placas de microensaio de 96 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) foram sensibilizadas com 20µg/mL de SWAP em tampão Carbonato-bicarbonato (pH 9.6) por 16 horas à 4°C. Decorrido esse tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST (tampão Salina-fosfato contendo 0,05% de Tween

20) e, posteriormente, bloqueadas com 300µL/poço de PBS 1X suplementado com 10% de FBS por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e foi adicionado 100µL/poço de cada soro, em duplicata, diluído 1:100 em PBS 1X por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e foi adicionado 100µL/poço de anti-IgG total (Sigma-Aldrich) conjugado a peroxidase diluído 1:2000 em PBS 1X por 1 hora a temperatura ambiente (MORAIS; FIGUEIREDO; ASSIS; HOMAN; et al., 2018). Após esse tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e a reação de cor foi obtida pela adição de 60µL/poço do substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) por 20 minutos. A reação foi parada com 30µL/poço de uma solução contendo 5% de Ácido sulfúrico e as placas foram lidas a 450nm em uma leitora de ELISA Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific).

4.6. Contagem de ovos no fígado

Os lobos laterais direito dos fígados foram coletados, pesados e introduzidos em tubos previamente identificados. Posteriormente, esses órgãos foram digeridos com 5mL de uma solução contendo 5% de KOH por aproximadamente 16 horas a 37°C. Decorrido esse tempo, foi adicionado salina (0,9% de NaCl) em cada tubo até a marca de 20mL. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 270xG por 10 minutos e os sobrenadantes foram descartados. Os pellets foram então lavados com 20mL de salina (0,9% de NaCl) por duas vezes. Em cada etapa de lavagem os tubos foram centrifugados a 270xG por 10 minutos e os sobrenadantes foram descartados. Após o descarte da última centrifugação, foram adicionados 5mL de uma solução contendo 10% de Formaldeído em PBS 1X. A contagem de ovos foi realizada com o auxílio de um microscópio ótico. O valor total foi corrigido considerando a massa do fígado, resultando no número de ovos por grama de tecido hepático. Os níveis de redução foram calculados comparando o número de ovos/g de fígado de camundongos *Sting^{-/-}* em relação ao grupo controle (ASSIS et al., 2018).

4.7. Análise dos granulomas hepáticos

As partes centrais do lobo lateral esquerdo dos fígados foram coletadas e fixadas em solução contendo 10% de Formaldeído em PBS 1X. Em seguida, os órgãos foram incluídos em parafina. Cortes histológicos de 6µm foram obtidos por meio de um micrótomo para a confecção de lâminas. Após a confecção, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (*H&E*) para a determinação do número e área dos granulomas hepáticos.

O número total de granulomas de cada corte histológico foi determinado por contagem com o auxílio de um microscópio óptico (lente objetiva 10x). Para a determinação da área, o corte histológico de cada fígado foi escaneado para o cálculo de sua área total (cm²) através do software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde dos EUA, Maryland, EUA). Cerca de 20 granulomas, contendo um único ovo bem definido, foram selecionados aleatoriamente de cada corte para serem fotografados utilizando uma microcâmera JVC TK-1270/RBG acoplada ao microscópio (lente objetiva 10x). Posteriormente, as áreas dos granulomas foram medidas utilizando o software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) (MORAIS; FIGUEIREDO; ASSIS; HOMAN; et al., 2018). A média das áreas para cada camundongo foi expresso em mm².

4.8. Células do baço – medição de citocinas e análise por citometria de fluxo

Todas as etapas desse experimento foram realizadas em ambiente estéril por meio da utilização de uma capela de fluxo laminar. Após 13 ou 40 dias de infecção, o baço dos camundongos C57BL/6 e *Sting*^{-/-} foram coletados e macerados com o auxílio de redes de metal e placas de Petri, ambas estéreis. As placas foram lavadas com salina estéril (0,9% de NaCl) e as soluções com o macerado celular foram transferidas para tubos estéreis previamente identificados. Os tubos foram centrifugados a 270xG por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, as hemácias foram lisadas com 1,5mL de tampão ACK (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, pH 7.2) por 5 minutos. Decorrido esse tempo, foi adicionado salina estéril (0,9% de NaCl) até a marca de 30mL em cada tubo.

Posteriormente, essas soluções foram filtradas com o auxílio de filtros “cell strainer” de 70µm (BD Bioscience, New Jersey, EUA) e os filtrados foram transferidos para outros tubos estéreis. Os tubos foram então centrifugados a 270xG por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. As células foram ressuspendidas em 2mL de meio RPMI 1640 acrescentado com 10% de FBS e 1,5% de solução PenEstrep (meio RPMI completo). Em seguida, as células do baço foram contadas, com o auxílio de uma câmara de Neubauer e, ajustados para 1×10^6 células/poço em placas de cultura de 96 poços (Nunc - Thermo Fisher Scientific). Para os experimentos de medição de citocinas, nos poços contendo células do baço de camundongos com 40 dias de infecção foram adicionados 600µg/mL de Polimixina B (Sigma-Aldrich), para evitar qualquer estimulação inespecífica proveniente de contaminação com LPS. Posteriormente, as placas foram acondicionadas por no mínimo 30 minutos na estufa. Em todas as etapas deste experimento, as células do baço foram incubadas em estufa a 37°C com ambiente contendo 5% de CO₂. Em seguida, as células foram mantidas em meio de cultura como controle negativo ou estimuladas com 10µg/poço de SWAP ou com 5µg/mL do mitógeno Concanavalina A (ConA) / 1µg/mL de Lipopolissacarídeo (LPS) como controles positivo. Após 24, 48 ou 72 horas, foram coletados os sobrenadantes das culturas para a análise de IL-4 e IL-5, TNF-α e, IFN-γ, IL-17 e IL-10, respectivamente (MORAIS; FIGUEIREDO; ASSIS; HOMAN; et al., 2018). Nas coletas de 24 e 48 horas foram adicionados mais 600µg/mL de Polimixina B nas placas restantes, exceto nas células que foram estimuladas com LPS e, incubadas em estufa até o momento da coleta. As células do baço de camundongos com 13 ou 40 dias de infecção também foram ajustadas para 1×10^6 células/poço em placas de cultura de 96 poços (Nunc) para análise por citometria de fluxo.

4.9. Dosagem de citocinas/quimiocina

As análises das citocinas/quimiocina IL-4, IL-10, IL-5, IL-17, TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6 e CXCL10/IP-10 foram realizadas utilizando kits de ELISA Duoset (R&D Diagnostic,

Minnesota, EUA). Para essa finalidade, foram seguidas as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.10. Lavado bronco-alveolar – medição de citocinas e análise por citometria de fluxo

Após o sacrifício com dose letal de anestésicos Quetamina e Xilazina, foi inserido uma cânula na traquéia dos animais por meio de uma traqueostomia. Através dessa cânula foram realizadas cerca de três lavagens de 0,5mL de salina (0,9% de NaCl) para a coleta do lavado bronco-alveolar, sendo a primeira lavagem utilizada para a dosagem de citocinas e as duas lavagens restantes utilizadas para a coleta de células. Após a realização das coletas, as amostras da primeira lavagem foram centrifugadas a 270xG por 10 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C até o momento da dosagem de citocinas/quimiocina. Os pellets obtidos após a centrifugação foram introduzidos nos respectivos tubos contendo as amostras das duas lavagens restantes. Posteriormente, os tubos contendo as células foram centrifugados a 270xG por 10 minutos e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, os pellets contendo as células do lavado bronco-alveolar foram ressuspensos em 200µL de meio RPMI completo. Essas amostras foram utilizadas para análises por citometria de fluxo.

4.11. Pulmão – medição de citocinas e análise por citometria de fluxo

Após a coleta do lavado bronco-alveolar (BAL), o pulmão esquerdo e o lobo superior do pulmão direito foram coletados e introduzidos em tubos devidamente identificados contendo 4mL de PBS 1X complementados com 3% de FBS. Em seguida, os pulmões foram colocados em placas de Petri onde foram excessivamente cortados com o auxílio de bisturis para a obtenção de uma massa homogênea. Essas massas foram então introduzidas em tubos de 2mLs. Posteriormente, as placas de Petri foram lavadas com cerca de 1mL de solução de digestão composta por meio RPMI 1640 acrescentado de 20U/mL de DNase I

(GE Healthcare, Illinois, EUA) e de 0,13mg/mL de Liberase TL Research Grade (Roche – Sigma-Aldrich) (HAN; ZIEGLER, 2013). Em seguida, as soluções de lavagem foram coletadas das placas de Petri e introduzidas nos respectivos tubos contendo os pulmões macerados. Posteriormente, os tubos foram incubados em um em um termomixer a 1000rpm por 45 minutos a 37°C. Após esse tempo, foram adicionados cerca de 1mL de meio RPMI completo em cada tubo com o objetivo de parar a digestão. Em seguida, as soluções foram passadas em filtros “cell strainer” de 70µm e as soluções de digestão colocadas em tubos de 50mL. Os tubos foram centrifugados a 270xG por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes descartados. As células foram ressuspensas em 0,5mL de meio RPMI completo, contadas e ajustadas para 1×10^6 células/poço com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As amostras contendo as células foram utilizadas para análise por citometria de fluxo.

Os dois lobos inferiores do pulmão direito (após a extração do BAL – 13 dias de infecção) foram coletados e introduzidos em tubos de 2mL devidamente identificados. Em seguida, foram acrescentados cerca de 1mL de solução de extração de citocinas (0,4M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA, 0,1mM de Fluoreto de fenilmetilsulfonil – PMSF, 0,1mM de Cloreto de benzetônio, 10mM de Ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA, e 20KI de Aprotinina) para cada 100mg de tecido. Posteriormente, foi utilizado um macerador (Ultra-Turrax) para homogeneizar as soluções contendo os órgãos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000xG por 10 minutos a 4°C. Decorrido esse tempo, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para a dosagem de citocinas/quimiocina.

4.12. Citometria de fluxo

Nas análises por citometria de fluxo foram utilizados marcadores de superfície. Todas as análises apresentaram dois controles FMO (do inglês *Fluorescence Minus One*) e células não marcadas como controle negativo. As placas contendo as células foram inicialmente centrifugadas a 204xG por 7 minutos a 4°C, flicadas e vortexadas. Em seguida, as placas

foram lavadas com 200µL de PBS 1X (wash A) e foram novamente centrifugadas a 204xG por 7 minutos a 4°C, flicadas e vortexadas. Primeiramente, as células foram incubadas por 20 minutos com 30µL de anti- CD16/32 para o bloqueio dos receptores Fc (eBioscience, Califórnia, EUA) diluídos em PBS 1X contendo 0,25% de BSA (ADS). Decorrido esse tempo, foram adicionados 170µL de PBS 1X contendo 0,5% de BSA (wash B) por poço. Posteriormente, as placas foram centrifugadas por a 204xG por 7 minutos a 4°C, flicadas e vortexadas. As células foram então incubadas por 20 minutos a 4°C no escuro com 30µL de anti-CD11c conjugado a FITC (clone HL3, eBioscience), anti-Ly6G conjugado a PE (clone 1A8, eBioscience) e anti-CD11b conjugado a APC-Cy7 (clone M1/70, BD-Bioscience) diluídos em ADS. Nas análises envolvendo o anticorpo Zombie NIR (BioLegend, Califórnia, EUA) não foi utilizado nenhum reagente apresentando BSA anterior a marcação. Nos controles FMO foram incubados os mesmos anticorpos diluídos em ADS, entretando, em um desses controles não apresentava o anticorpo anti-CD11c conjugado a FITC e no outro controle não apresentava o anticorpo anti-Ly6G conjugado a PE. Nas células não marcadas foram adicionados 30µL de ADS. Decorrido esse tempo, foram adicionados 170µL de wash B por poço. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 204xG por 7 minutos a 4°C, flicadas e vortexadas. As células foram lavadas com 170µL de wash B e então centrifugadas a 204xG por 7 minutos a 4°C, flicadas e vortexadas novamente. Em seguida, foram adicionados 200µL de wash A para ressuspender as células (MARINHO et al., 2016). A análise de quantificação das células foi realizada no Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Os dados gerados pelo citômetro foram analisados utilizando o programa Flowjo 10 (Tree Star, Inc., Oregon, EUA).

4.13. Extração de DNA total de vermes adultos

Vermes adultos do parasito *S. mansoni* obtidos de camundongos C57BL/6 foram inicialmente macerados em 100µL de TE (10mM de TRIS e 1mM de EDTA, pH 8.0). A solução contendo os vermes foi homogeneizada cerca de 6 vezes por 30 segundos com o

auxílio de um macerador e nos intervalos o material foi colocado no gelo por cerca de 30 segundos. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 7000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspenso em 3mL de TE. A solução foi então dividida em 6 tubos com 0,5mL cada. Em cada tubo foi adicionado 30µL de uma solução contendo 10% de Dodecil sulfato de sódio (SDS) e, em seguida, foi adicionado 10µL de Proteinase K (20mg/mL). Posteriormente as adições, os tubos foram colocados por 1 hora a 37°C. Decorrido esse tempo, foi adicionado 100µL de uma solução contendo 5M de NaCl. Após homogeneizar, foi adicionado mais 80µL de uma solução contendo 10% de Brometo de cetil trimetilamonio (CTAB) e 0,7M de NaCl. Posteriormente as adições, os tubos foram colocados por 10 minutos a 65°C. Decorrido esse tempo, os tubos foram colocados no gelo e foi adicionado 500µL de uma solução contendo Fenol/Clorofórmio/Ácool isoamílico (Invitrogen, Califórnia, EUA). Os tubos foram então homogeneizados no gelo por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 10000rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foram coletadas apenas as fases aquosas que foram introduzidas em novos tubos. Em seguida, foi adicionado 500µL de Clorofórmio e os tubos foram centrifugados a 10000rpm por 10 minutos a 4°C. Decorrido esse tempo, foram coletados novamente as fases orgânicas que foram introduzidas em outros tubos. Posteriormente, foi adicionado 500µL de Isopropanol e os tubos foram colocados por 1 hora a -20°C. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 13000rpm por 25 minutos a 4°C. Após centrifugar, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados aos pellets uma solução contendo Álcool 70%. Os tubos foram novamente centrifugados a 13000rpm por 10 minutos a 4°C. Decorrido esse tempo, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram deixados abertos secando. Após a secagem, os pellets foram resuspenso em água e as soluções de todos os tubos foram unidas em um único tubo (100µL - volume final). Em seguida, foi adicionado 50µg/mL de RNase A no tubo e esse foi colocado por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, o DNA foi dosado em nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo

Fisher Scientific) e a sua integridade foi avaliada por uma eletroforese em gel contendo 0,8% de agarose.

4.14. Cultura de células

Para a realização dessa análise, foram descongelados do nitrogênio líquido criotubos contendo fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) *Sting^{-/-}* e C57BL/6 (obtidos através do Dr. G. Barber da Universidade de Miami-EUA) em uma solução de 10% de FBS em Dimetilsulfóxido (DMSO). Inicialmente, as células foram centrifugadas a 400xG por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado para a completa retirada do DMSO. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de solução PenEstrep (meio DMEM completo). As células foram então introduzidas em uma garrafa de cultura contendo meio DMEM completo, respeitando o tamanho da garrafa utilizada e, posteriormente, foram incubadas em estufa a 37°C com ambiente contendo 5% de CO₂. O crescimento celular foi checado diariamente através de um microscópio invertido e o meio de cultura trocado parcialmente/completamente a cada um ou dois dias. As células foram tripsinizadas quando uma subconfluência de 80-90% foi atingida e recultivadas em garrafas de cultura maiores. Para isso, o meio de cultura contido nas garrafas foi inicialmente descartado e, em seguida, a garrafa foi lavada com PBS 1X. Após o descarte do lavado, foi adicionado Tripsina (TrypLE™ Express, Thermo Fisher Scientific) em cada garrafa, respeitando o tamanho da garrafa utilizada, e as mesmas foram incubadas por 5 minutos na estufa para o desprendimento das células. Decorrido esse tempo, foram adicionados meio DMEM completo em cada garrafa para a inibição da enzima. Esse processo de crescimento celular foi realizado até a obtenção de uma quantidade suficiente para posteriores ensaios.

4.15. Microscopia confocal

A ativação de STING em MEFs foi analisada por imunofluorescência. MEFs C57BL/6 foram contadas, com o auxílio de uma câmara de Neubauer e, ajustadas para $2,5 \times 10^4$ células/poço em placas de cultura de 24 poços (Nunc - Thermo Fisher Scientific) contendo lamínulas de vidro. Após 24 horas, as células foram transfectadas com DNA de *S. mansoni* ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$) ou dsDNA90 ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 6 horas utilizando o reagente de transfecção Fugene (Promega, Wisconsin, EUA). Resumidamente, no dia da transfecção, o DNA foi diluído em meio DMEM (sem adição de FBS) contendo 0,25% do reagente de transfecção Fugene e incubado por 15 minutos. Após esse período, $100 \mu\text{L}$ da mistura Fugene/DNA foram adicionados em cada poço da placa de cultura que já continha $200 \mu\text{L}$ de meio DMEM completo. Após 6 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram permeabilizadas em PBS 1X contendo 0,2% Triton X-100 por 10 minutos e bloqueadas por 1 hora em PBS 1X contendo 10% de BSA à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as células foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho (inglês *rabbit*) contra STING (adquirido do Dr. Glen Barber, Universidade de Miami, EUA) diluído 1:50 em PBS 1X contendo 4% de BSA overnight. Em seguida, as células foram incubadas com anti-*rabbit* conjugado com Alexa Fluor 546 (Cell Signaling, MA, EUA) diluído 1:500 em PBS 1X contendo 4% de BSA para detecção do anticorpo primário. As lamínulas foram dispostas em lâminas utilizando o ProLong Gold com DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) (Invitrogen) como meio de montagem. Todas as lâminas receberam a mesma quantidade de ProLong Gold com DAPI, de forma a cobrir-las completamente. A análise de microscopia confocal foi realizada em um sistema confocal Nikon A1. Três lamínulas foram analisadas por amostra e as fotografias foram tiradas com uma objetiva de 60X.

4.16. PCR em tempo real

MEFs C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} não transfectados ou transfectados com DNA de *S. mansoni* ou dsDNA90 foram homogeneizados em TRIzol (Invitrogen) e o RNA total foi

isolado de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa do RNA total foi realizada e a RT-PCR quantitativa foi conduzida em um volume final de 10µL contendo SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), cDNA oligo-dT (modelo de PCR) e primers. A reação de PCR foi realizada com o instrumento de PCR em tempo real QuantStudio3 (Applied Biosystems) (CAMPOS et al., 2017; CERQUEIRA et al., 2018). Os primers foram utilizados para amplificar um fragmento específico correspondente a alvos genéticos específicos, como a seguir:

β-actin

forward 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3' e

reverse 5'- CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3';

IFN-β

forward 5'-GCCTTTGCCATCCAAGAGATGC-3' e

reverse 5'-ACACTGTCTGCTGGTGGAGTTC-3'.

Todos os dados são apresentados como unidades de expressão relativa após normalização para β-actina.

4.17. Isolamento de neutrófilos

Camundongos C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} foram sacrificados através de uma câmara de CO₂ e, em seguida, os fêmures e tíbias foram removidos e limpos com gaze e álcool. As cabeças dos ossos foram retiradas com o auxílio de tesouras e as células da medula óssea foram coletadas após passagem forçada de PBS 1X no canal medular utilizando seringas descartáveis. As células foram então centrifugadas a 270xG por 10 minutos a 4°C. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (sem fenol red, Gibco, Thermo Fisher Scientific) (MORAIS; FIGUEIREDO; ASSIS; ALVARENGA; et al., 2018). As células foram então filtradas com o auxílio de filtros "cell strainer" de 70µm. Posteriormente, as células mononucleares foram separadas das células polimorfonucleares e eritrócitos por meio de um gradiente de Ficoll-Paque (KUHNS

et al., 2015). Resumidamente, em um tubo contendo 3mL de Ficoll foram adicionados cuidadosamente 2,5 mL de células em meio de cultura. O tubo foi centrifugado a 423xG por 30 minutos a 4°C. Após centrifugação, a fração, contendo leucócitos polimorfonucleares e eritrócitos, foi coletada e os eritrócitos foram lisados com 1mL de tampão ACK (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, pH 7.2) por 5 minutos (CHOKESUWATTANASKUL et al., 2018). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em meio RPMI 1640. Em cada etapa de lavagem os tubos foram centrifugados a 270xG por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. As células foram ressuspensas em meio RPMI completo e ajustadas para 5x10⁵ células (teste de sobrevivência) ou 1x10⁶ células (cultura com esquistossomos) por poço em placas de 96 ou 24 poços (Nunc), respectivamente.

4.18. Sobrevida de neutrófilos

Os neutrófilos (5x10⁵) presentes nas placas de 96 poços foram mantidos em cultura apenas com meio RPMI completo (controle negativo) ou estimulados com SWAP (200µg/mL), IFN-γ (200ng/µL) ou LPS (1µg/mL) durante 2 horas em estufa a 37°C com ambiente contendo 5% de CO₂. Decorrido esse tempo, as placas foram centrifugadas a 270xG por 10 minutos a 4°C e as células foram ressuspensas em PBS 1X para análise por citometria de fluxo.

4.19. Cultura de neutrófilos com esquistossomos

Os neutrófilos (1x10⁶) presentes nas placas de 24 poços foram inicialmente estimulados com IFN-γ (200ng/µL) por 2 horas. Após esse período, os esquistossomos recém-preparados de 7 dias foram lavados e ressuspensos em meio RPMI completo. Alíquotas contendo aproximadamente 100 esquistossomos foram adicionadas à cultura de neutrófilos por 3 horas em estufa a 37°C com ambiente contendo 5% de CO₂. Em seguida, as placas foram inspecionadas sob um microscópio invertido (Olympus Co., Hamburgo, Alemanha). Em cada poço, a porcentagem de esquistossomos mortos foi pontuada. Os

esquistossômulos mortos apresentavam uma aparência opaca e granular, além de não possuir atividade celular (MORAIS; FIGUEIREDO; ASSIS; ALVARENGA; et al., 2018).

4.20. Isolamento fecal, sequenciamento de DNA da microbiota intestinal e bioinformática

Para a realização dessa análise foram utilizados 7 camundongos *Sting*^{-/-} e 7 camundongos C57BL/6, sendo 4 animais infectados e 3 animais não infectados por linhagem. Os animais foram sacrificados após 40 dias de infecção em uma câmara de CO₂. Após o sacrifício, os intestinos e, posteriormente, as fezes dos animais foram coletados em ambiente estéril por meio da utilização de uma capela de fluxo laminar. Em seguida, as fezes de todas as porções foram homogeneizadas com o auxílio de pinças e amostras destas misturas foram introduzidas em tubos de 2mL estéreis, não ultrapassando a marca de 0,5mL. Em seguida, as amostras foram congeladas e mantidas em gelo seco durante o transporte até o laboratório NEOPROSPECTA - Microbiome technologies (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil), onde foi realizado o sequenciamento de DNA de nova geração com uma cobertura de 10000 reads. Essa análise foi baseada na comparação de ampliações padrão da região V4 do rRNA 16S com a região V3-V4 otimizada. A biblioteca de sequenciamentos foi feita utilizando um protocolo de PCR de dois passos, para maior eficiência e otimização da amplificação dos primers. Na primeira reação de PCR, foram utilizados os primers V3-V4 314F-806R, por apresentarem uma grande cobertura taxonômica em bactérias e archaeas. O par de primers 515F-806R, com menor sensibilidade para discriminar espécies mais próximas, foi adicionalmente amplificado. As reações de PCR foram sempre realizadas em triplicatas utilizando a Taq Platinum (Invitrogen). Na PCR 1 as condições foram: 95°C por 5 min, 25 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e extensão final de 72°C por 2 minutos. Para a PCR 2 as condições foram: 95°C por 5 minutos, 10 ciclos de 95°C por 45 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C

durante 2 minutos. A reação de PCR final foi limpa utilizando esferas AMPureXP (Beckman Coulter, Califórnia, EUA) e as amostras foram reunidas em bibliotecas de sequenciamento para quantificação. O sequenciamento foi realizado por meio de um sistema Illumina-MiSeq (Illumina, Califórnia, EUA) que normalmente fornece leituras de extremidade única com 300nt de comprimento. Em seguida, os arquivos fastq de extremidade única brutos, obtidos a partir do sequenciamento, foram verificados quanto a qualidade usando o fastqc. Todas as sequências com mais de 1 erro esperado por leitura foram filtradas. As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram geradas por agrupamento de sequências com uma correspondência de 99% e as sequências quiméricas foram removidas usando Usearch (EDGAR, 2010) (v11). As leituras foram mapeadas contra a OTU de referência para gerar uma matriz de contagem. Posteriormente, a taxonomia e classificação das OTUs foram realizadas com o Mothur (SCHLOSS et al., 2009) (v1.40.5), utilizando o banco de dados Greengenes. As análises estatísticas foram implementadas utilizando o Phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013) package for R.

4.21. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (Califórnia, EUA). Os grupos de animais foram comparados utilizando o teste t Student não pareado e one-way ANOVA ou two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni quando aplicáveis. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Detecção do DNA de *Schistosoma mansoni* via cGAS/STING

O reconhecimento do DNA pelo sistema imunológico é uma importante estratégia pela qual o hospedeiro detecta a infecção e inicia respostas protetoras contra patógenos (CHEN, Q. et al., 2016; SHU et al., 2014). Para avaliar se a via de STING possui a capacidade de reconhecer o DNA de *S. mansoni*, fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) C57BL/6 (WT) foram transfectados com o DNA do parasito ou dsDNA90 (controle positivo) por 6 horas. Decorrido esse tempo, STING e o DNA foram marcados para análise por microscopia confocal. A Figura 6A mostra que STING se manteve disperso no citoplasma das células tratadas apenas com o reagente de transfecção Fugene. No entanto, quando as MEFs foram transfectadas com DNA de *S. mansoni* ou dsDNA90, STING migrou do citoplasma para a região perinuclear dessas células, formando agregados pontuais (puncta). Isso mostra que o DNA do parasito foi reconhecido, levando à ativação subsequente de STING. Para confirmar essa ativação, foi analisada por RT-PCR a expressão de IFN- β em MEFs WT e *Sting*^{-/-} transfectadas com o DNA de *S. mansoni*. Além disso, nesse experimento também foram incluídas MEFs *cGAS*^{-/-} para verificar se o sensor cGAS poderia estar envolvido na detecção do dsDNA. Após a realização desse experimento foi possível observar que as células tratadas apenas com o reagente de transfecção Fugene não expressaram níveis detectáveis de IFN- β . Confirmando os achados do experimento anterior, MEFs WT transfectadas com o DNA de *S. mansoni* produziram altos níveis de mRNA de IFN- β , indicando que o DNA do parasito foi realmente capaz de ativar STING. Adicionalmente, MEFs *Sting*^{-/-} e *cGAS*^{-/-} apresentaram drástica redução na expressão de IFN- β (Figura 6B). Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que o DNA de *S. mansoni* pode ser reconhecido pela via cGAS-STING, induzindo a expressão de elevados níveis do transcrito de IFN- β .

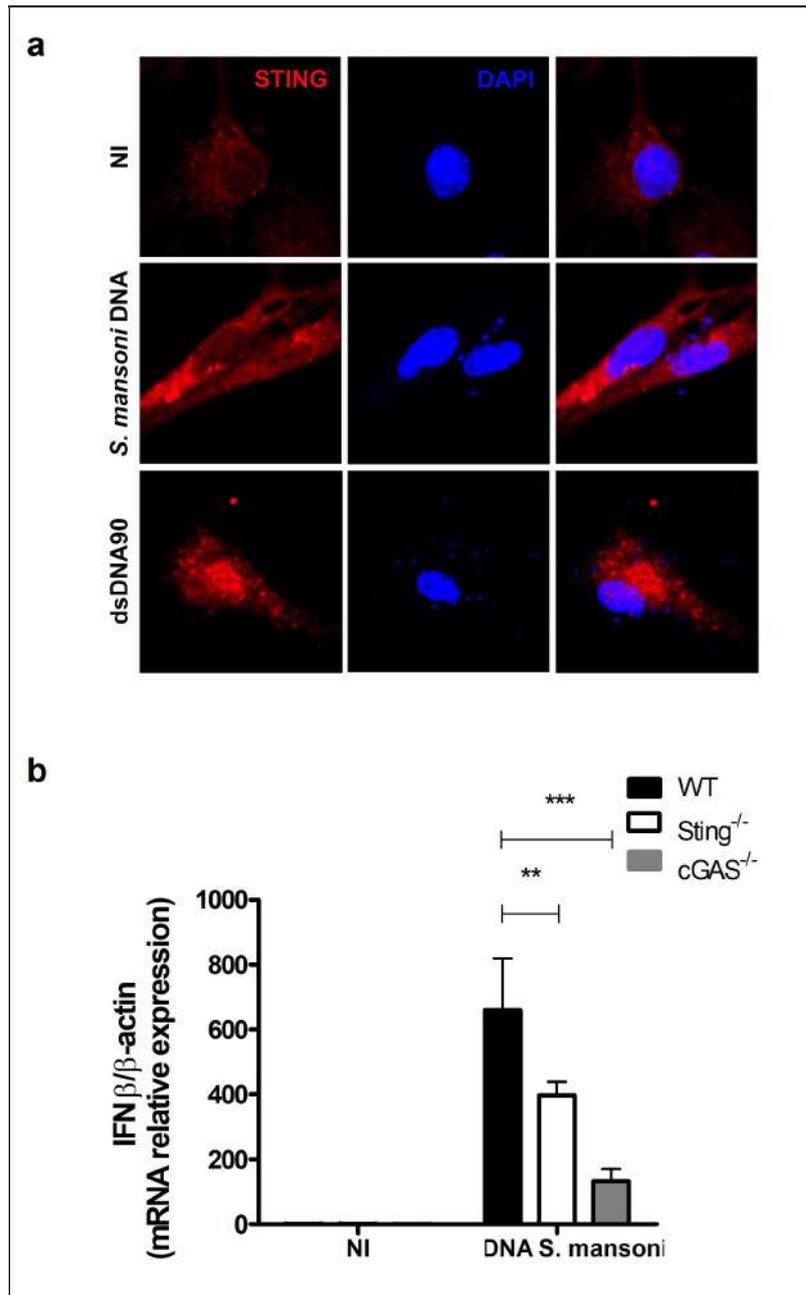


Figura 6: Detecção do DNA de *Schistosoma mansoni* e ativação de STING em fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs). (A) Microscopia confocal de MEFs C57BL/6 (WT) tratadas apenas com o reagente de transfecção Fugene (NI) ou transfectadas com 3 µg/mL de DNA do parasito *S. mansoni* ou 3 µg/mL de dsDNA ativador de STING (dsDNA com 90bp – controle positivo) por 6 horas. As células foram posteriormente marcadas com anticorpos contra STING (vermelho) e com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (azul). (B) Análise do mRNA de interferon-β (IFN-β) por transcriptase reversa quantitativa - PCR (qRT-PCR) em MEFs WT, *cGAS*^{-/-} e *Sting*^{-/-} tratadas apenas com Fugene (NI, n=3) ou transfectadas com 3µg/mL do DNA de *S. mansoni* (n=3) por 6 horas. (***) e (**) foram utilizados para demonstrar diferenças estatísticas com p<0,001 e p<0,01 em comparação

com as MEFs WT, respectivamente. Two-Way ANOVA com pós-teste Bonferroni foi utilizado para comparações múltiplas.

5.2. Análise do impacto causado pela infecção com o parasito *S. mansoni* em camundongos deficientes em STING

Uma vez que o DNA de *S. mansoni* apresenta a capacidade de ativar STING, foi avaliado o papel dessa molécula durante o curso da esquistossomose. Para esse propósito, camundongos *Sting*^{-/-} e C57BL/6 (WT) foram inicialmente infectados com aproximadamente 100 cercárias de *S. mansoni*. Decorridos 40 dias de infecção, os animais foram perfundidos para análise da carga parasitária. Após a realização desse experimento foi possível observar que os camundongos *Sting*^{-/-} apresentaram uma redução de 34% e 32% no número de vermes adultos recuperados em comparação aos animais do grupo controle (WT). Um perfil de resistência semelhante também foi observado em camundongos *cGAS*^{-/-} (Figura 7A). Após a perfusão, os fígados dos camundongos *Sting*^{-/-} e WT foram coletados para contagem de ovos e para avaliação do número e área dos granulomas hepáticos. Apesar do número reduzido de vermes adultos recuperados nos camundongos *Sting*^{-/-}, não foram observadas diferenças significativas na contagem de ovos e de granulomas no fígado desses animais em comparação aos camundongos WT (Figuras 7B e 7C). Além disso, a deficiência em STING não afetou a maturação dos granulomas hepáticos, representada pela medida das áreas (Figura 7D). É possível que um número menor de ovos possa ter ficado retido em outros órgãos, como pulmão e parede intestinal, não avaliados neste estudo. Isso pode explicar por que os fígados de camundongos *Sting*^{-/-} não apresentaram diferenças na contagem de ovos e de granulomas.

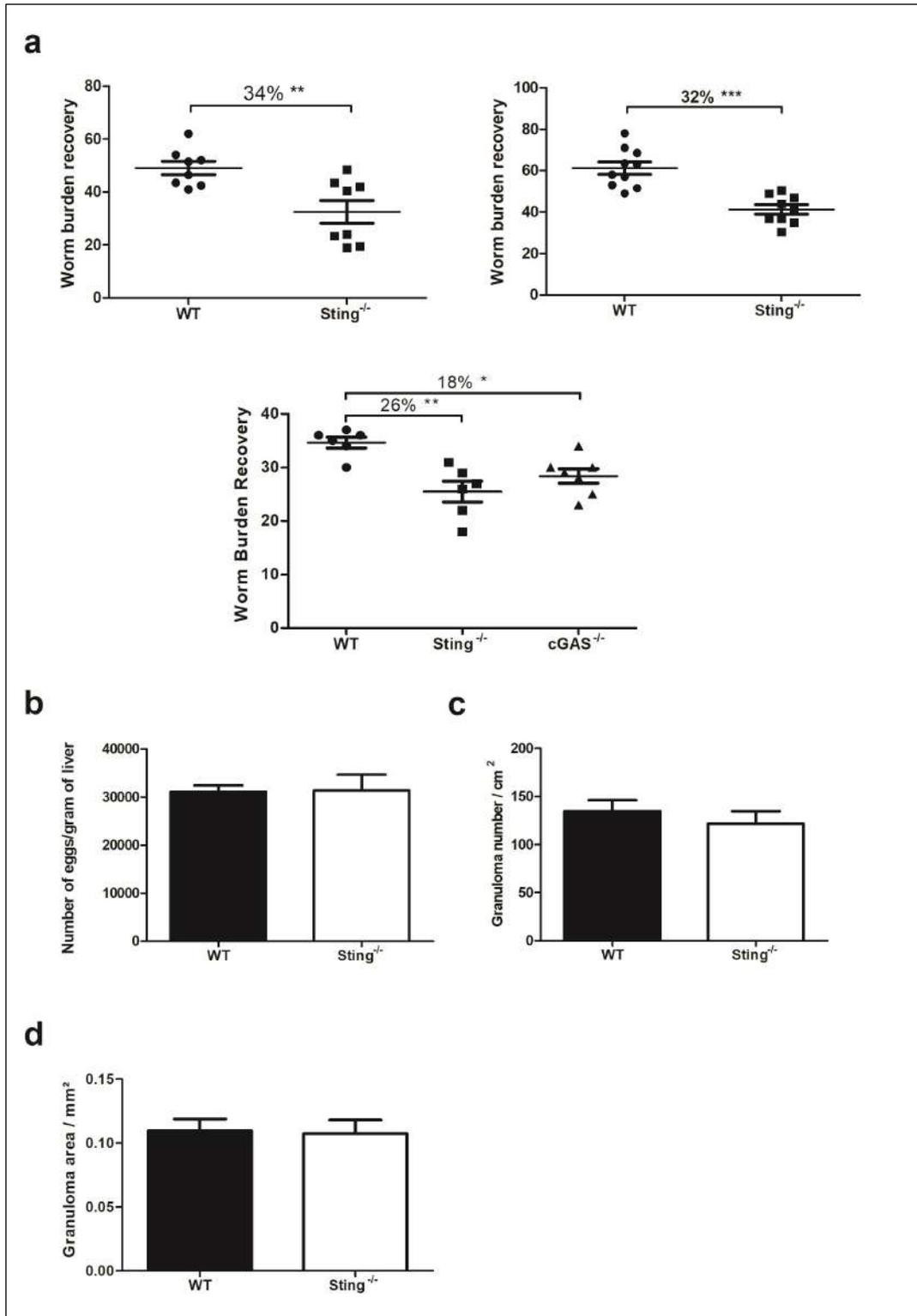


Figura 7: Avaliação da carga parasitária e patologia hepática em camundongos $Sting^{-/-}$ infectados. Camundongos C57BL/6 (WT) e $Sting^{-/-}$ (n=10) foram infectados com 100 cercárias de *S. mansoni* e, após 40 dias de infecção foram avaliados a carga parasitária (A), o número de ovos por grama de fígado (B), o número de granulomas por cm^2 (C) e a área dos granulomas em mm^2 (D). (**)

e (***) foram utilizados para demonstrar diferenças estatísticas com $p < 0,01$ ou $p < 0,001$ em comparação aos camundongos WT, respectivamente. Para comparações entre os grupos foi utilizado o teste t Student não pareado.

5.3. Análise da resposta imune humoral e celular de camundongos *Sting*^{-/-} infectados

Após a infecção de camundongos *Sting*^{-/-} e WT com cercárias de *S. mansoni*, foram coletadas amostras de sangue nos dias 0, 7, 19 e 35 para a avaliação dos títulos de IgG total anti-SWAP presentes no soro desses animais. Como mostrado na Figura 8A, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de anticorpos produzidos pelos camundongos *Sting*^{-/-} e WT em todos os dias avaliados.

Para determinar se a ausência de STING afeta a resposta imune celular contra o parasito *S. mansoni*, células do baço de camundongos *Sting*^{-/-} e WT com 40 dias de infecção foram isoladas e restimuladas *in vitro* com SWAP, meio de cultura (controle negativo) e ConA ou LPS (controles positivos). Após a realização desse experimento foi possível verificar que as células do baço de camundongos *Sting*^{-/-} restimulados com SWAP mostraram um aumento significativo na produção de IFN- γ em comparação com as células WT (Figura 8B). No entanto, não foram observadas diferenças nos níveis das citocinas IL-4, IL-10, IL-5, IL-17 e TNF- α (Figuras 8C-8G) quando comparamos as células de ambos os grupos. Esses resultados sugerem que os camundongos *Sting*^{-/-} infectados com o *S. mansoni* induziram uma forte resposta imune celular mediada por IFN- γ em comparação aos camundongos WT.

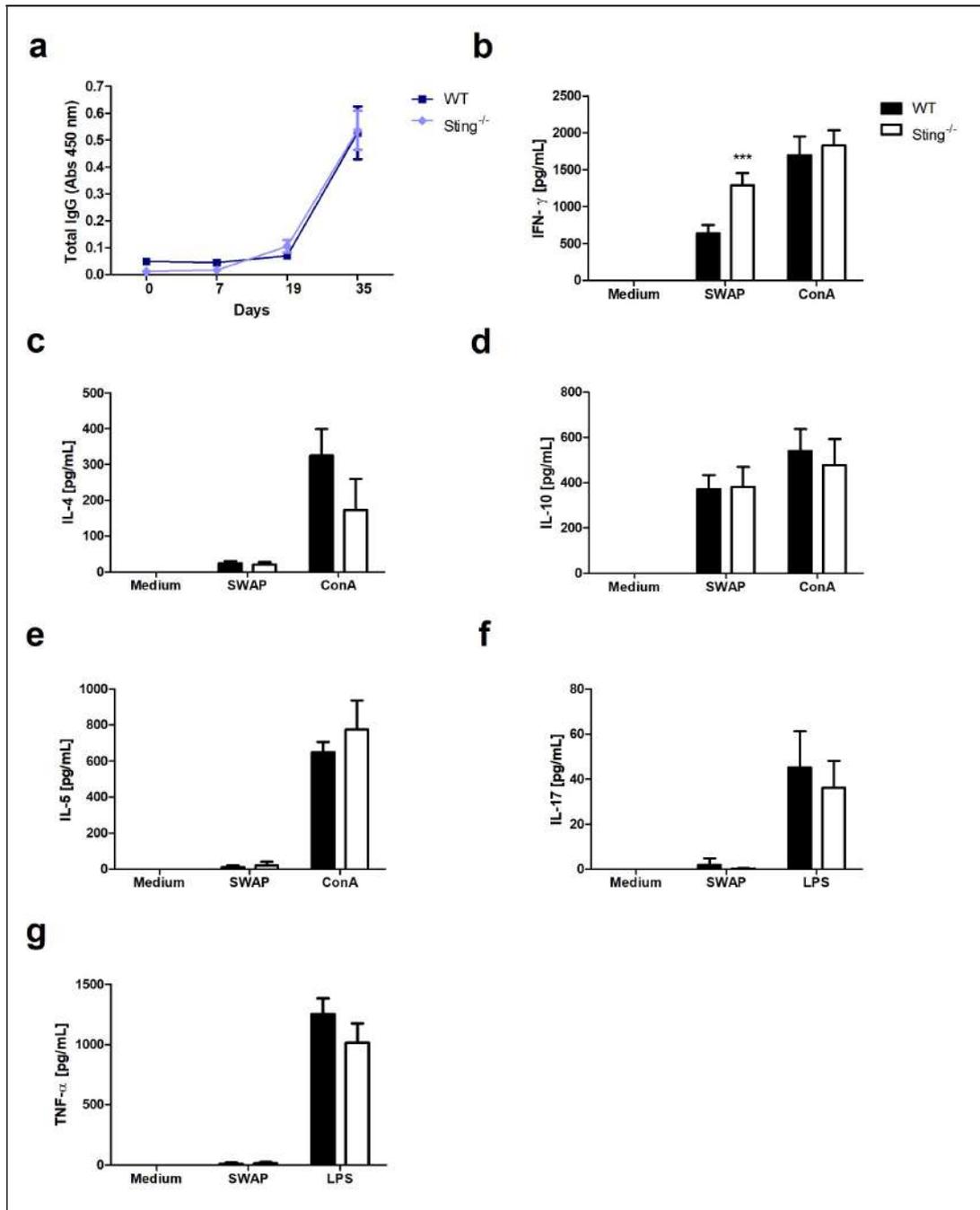


Figura 8: Anticorpos e citocinas produzidos por camundongos *Sting*^{-/-} infectados.

Camundongos C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} foram inicialmente infectados com cercárias de *S. mansoni*. Nos dias 0, 7, 19 e 35 pós-infecção foram dosados os níveis de IgG total contra antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) no soro desses animais (n=5) (A). Após 40 dias de infecção, as células do baço foram isoladas e restimuladas com 200 μ g/mL de SWAP, meio de cultura (controle negativo) e Concanavalina A (ConA) ou Lipopolissacarídeo (LPS) (controles positivos). Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para a dosagem das citocinas IFN- γ (n=5) (B), IL-4 (n=5) (C), IL-10 (n=5) (D), IL-5 (n=5) (E), IL-17 (n=5) (F) e TNF- α (n=5) (G). (***) foi utilizado para demonstrar diferença

estatística com $p < 0,001$ em comparação aos camundongos WT. Two-Way ANOVA com pós-teste Bonferroni foi utilizado para comparações múltiplas.

5.4. Avaliação de celularidade no lavado bronco-alveolar (BAL), pulmão e baço

Evidências demonstram que os esquistossômulos se tornam alvos estacionários/lentos ao ataque imune quando tentam migrar através dos capilares pulmonares (WILSON; COULSON, 2009). A celularidade do BAL e do pulmão de camundongos *Sting*^{-/-} foi avaliada, após 13 dias de infecção, a fim de determinar se a resistência à infecção observada nesses animais também poderia estar relacionada com o ataque imunológico ao parasito durante essa fase da doença. Como mostrado na Figura 9A e 9C, os camundongos *Sting*^{-/-} não infectados apresentaram uma elevada porcentagem de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺) tanto no BAL quanto no pulmão em comparação aos camundongos WT. Surpreendentemente, esse aumento permaneceu mesmo após a infecção com cercárias de *S. mansoni*. Em contrapartida, não foram observadas diferenças na porcentagem de células dendríticas (CD11b⁺ CD11c⁺) quando comparamos ambos os grupos de camundongos infectados ou não (Figura 9B e 9D).

O BAL e o pulmão de camundongos WT e *Sting*^{-/-} também foram coletados, após 13 dias de infecção, para a dosagem de citocinas. Após a análise do BAL, não foram observadas diferenças nos níveis das citocinas IL-17, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e CXCL10/IP-10 entre os camundongos não infectados (Figura 10). No entanto, após a infecção, os camundongos *Sting*^{-/-} apresentaram um aumento na produção das citocinas inflamatórias IL-17, TNF- α e IL-6 (Figura 6A, 6C e 6D) em comparação aos camundongos WT. Quando os pulmões foram avaliados, não foram observadas diferenças nos níveis das citocinas IL-17, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e CXCL10/IP-10 quando comparamos ambos os grupos de camundongos infectados ou não (Figura 11). Além disso, não foram detectados níveis mensuráveis de IFN- γ no BAL e no pulmão desses animais (dados não mostrados).

Para determinar se o aumento da população de neutrófilos também poderia se estender a outros órgãos de camundongos *Sting*^{-/-}, os baços desses animais foram coletados e avaliados após 13 ou 40 dias de infecção. Como mostrado nas Figuras 12A e 12B, os baços dos camundongos *Sting*^{-/-} não infectados também apresentaram uma elevada porcentagem de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺) nos dias de infecção avaliados em comparação aos camundongos do grupo controle. Confirmando os resultados anteriores, o aumento dessa população celular permaneceu mesmo após a infecção com cercárias de *S. mansoni*. Tomados em conjunto, esses achados sugerem que a maior frequência de neutrófilos no BAL, pulmão e baço foi intrínseco de camundongos *Sting*^{-/-}. Além disso, o BAL dos camundongos *Sting*^{-/-} infectados mostrou um aumento na produção de citocinas inflamatórias em comparação aos camundongos WT infectados.

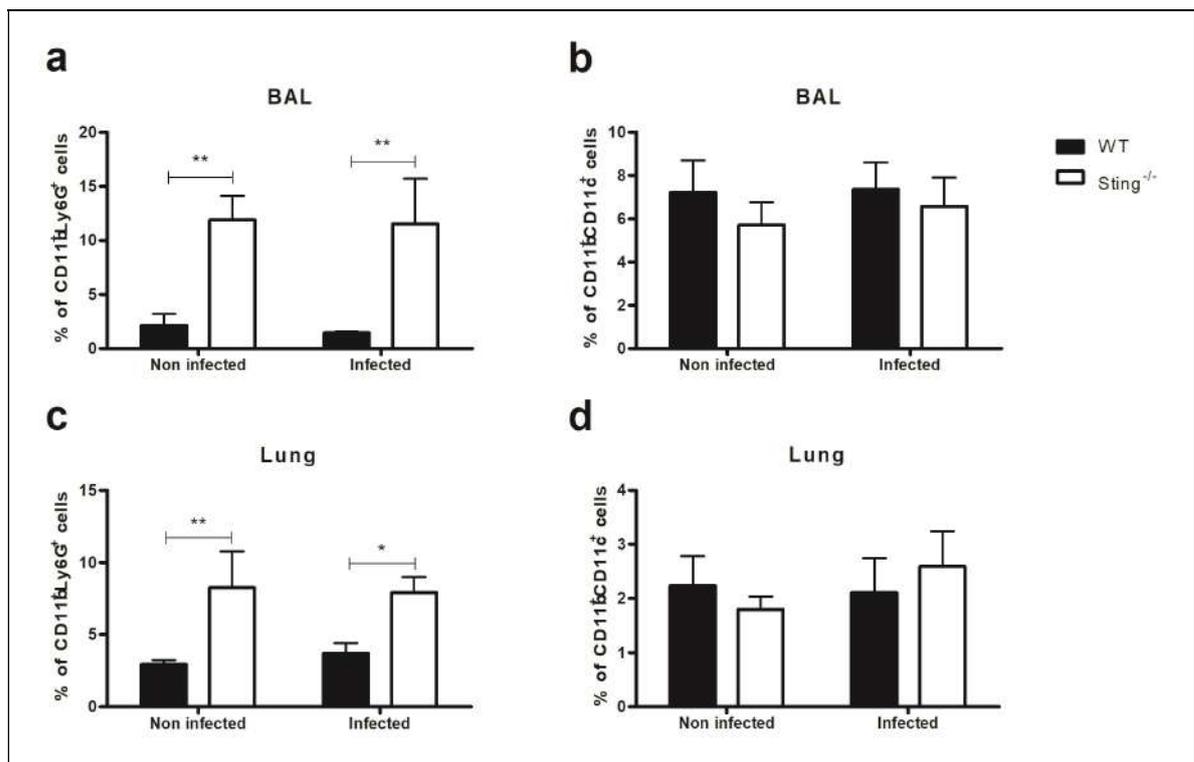


Figura 9: Análise da porcentagem de neutrófilos e células dendríticas no lavado bronco-alveolar (BAL) e pulmão de camundongos *Sting*^{-/-}. Camundongos C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} foram infectados com cercárias de *S. mansoni* e, após 13 dias de infecção foram avaliados o percentual de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺) e células dendríticas (CD11b⁺ CD11c⁺) no lavado bronco-alveolar (BAL)

(n=5) (A e B) e no pulmão (n=5) (C e D) desses animais. (*) ou (**) foram utilizados para demonstrar diferenças estatísticas com $p < 0,05$ ou $p < 0,01$ em comparação aos camundongos WT, respectivamente. Two-Way ANOVA com pós-teste Bonferroni foi utilizado para comparações múltiplas.

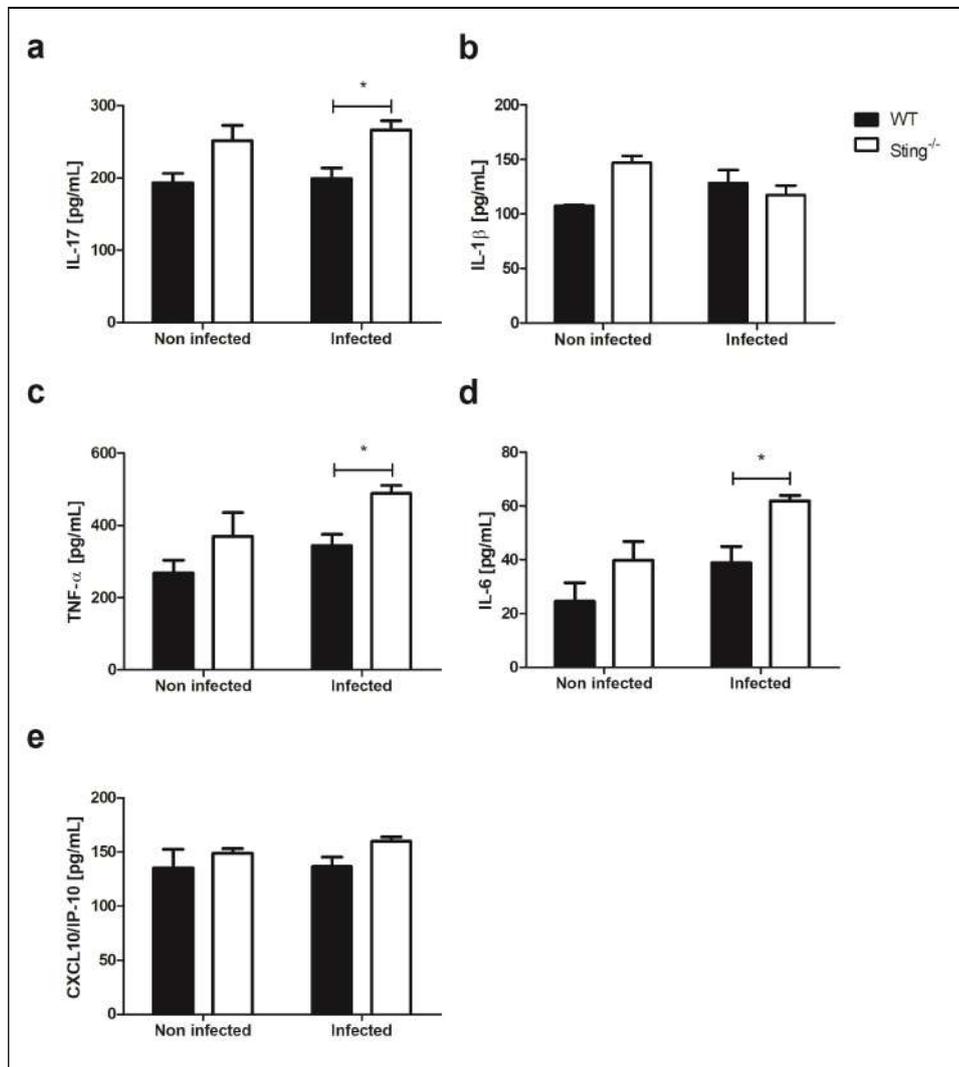


Figura 10: Perfil de citocinas no BAL de camundongos *Sting*^{-/-}. Camundongos C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} foram infectados com cercárias de *S. mansoni* e, após 13 dias de infecção o BAL desses animais foi coletado para a dosagem das citocinas IL-17 (n=5) (A), IL-1 β (n=5) (B), TNF- α (n=5) (C), IL-6 (n=5) (D) e CXCL10/IP-10 (n=5) (E). (*) foi utilizado para demonstrar diferença estatística com $p < 0,05$ em comparação aos camundongos WT. Two-Way ANOVA com pós-teste Bonferroni foi utilizado para comparações múltiplas.

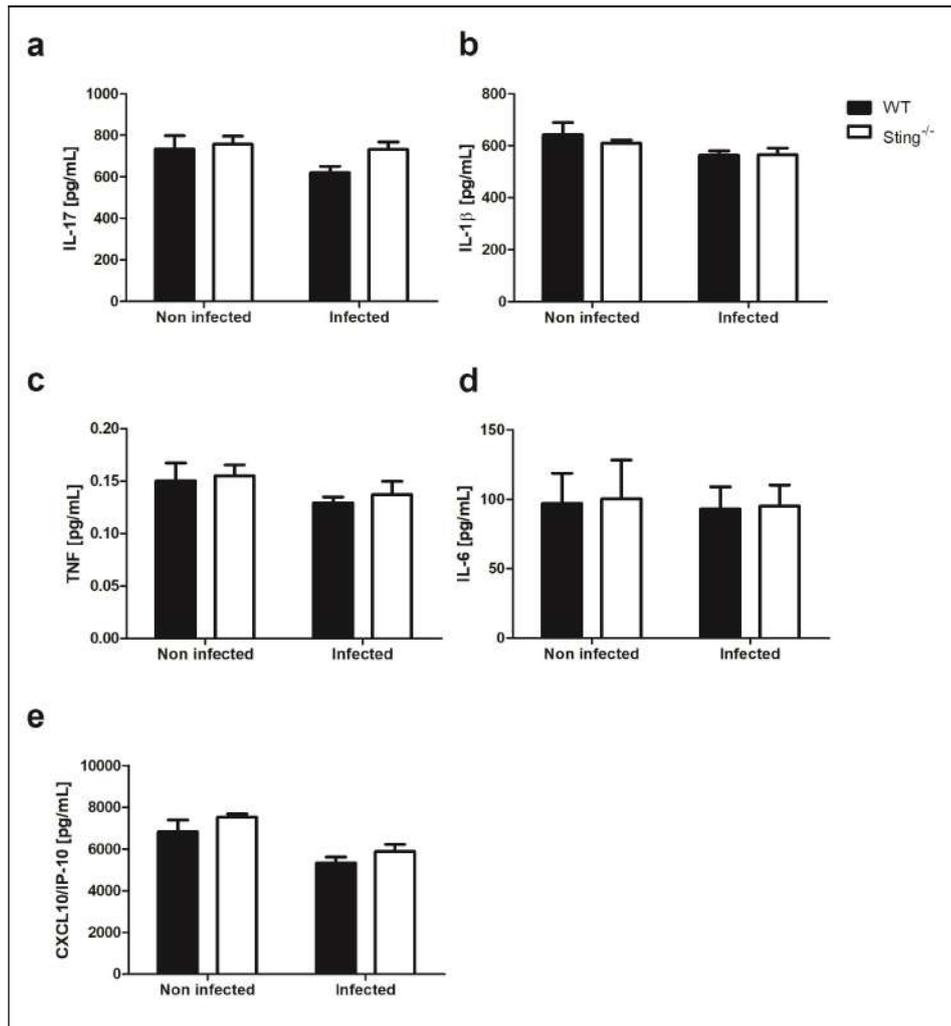


Figura 11: Perfil de citocinas no pulmão de camundongos *Sting*^{-/-}. Camundongos C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} foram infectados com cercárias de *S. mansoni* e, após 13 dias de infecção o pulmão desses animais foi coletado para a dosagem das citocinas IL-17 (n=5) (A), IL-1β (n=5) (B), TNF-α (n=5) (C), IL-6 (n=5) (D) e CXCL10/IP-10 (n=5) (E).

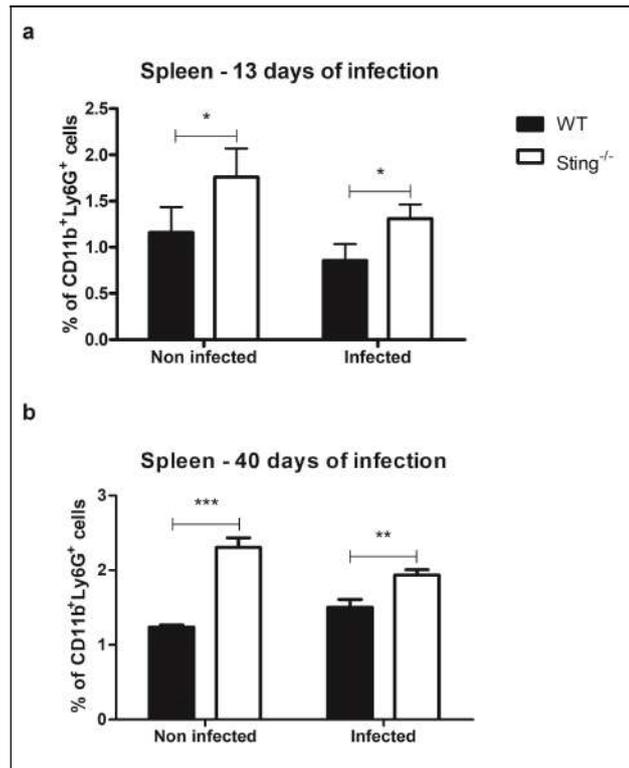


Figura 12: Análise da porcentagem de neutrófilos no baço de camundongos *Sting*^{-/-}. Camundongos C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} foram infectados com cercárias de *S. mansoni* para avaliação do percentual de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺) no baço após 13 dias (n=5) (**A**) ou 40 dias (n=5) (**B**) de infecção. (*) ou (**) ou (***) foram utilizados para demonstrar diferenças estatísticas com p<0,05 ou p<0,01 ou p<0,001 em comparação aos camundongos WT, respectivamente. Two-Way ANOVA com pós-teste Bonferroni foi utilizado para comparações múltiplas.

5.5. Avaliação da sobrevivência e função de neutrófilos de camundongos *Sting*^{-/-} após estimulação com IFN- γ

Os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (ROS), grânulos com enzimas lisossomais e citocinas pró-inflamatórias quando estimulados com IFN- γ (MARCHI et al., 2014). Para avaliar o efeito do IFN- γ na função dessas células, os neutrófilos da medula óssea de camundongos WT e *Sting*^{-/-} foram estimulados (200ng/mL) e, posteriormente, mantidos em cultura com cerca de 100 esquistosômulos. Após a realização desse experimento foi possível observar que os neutrófilos de ambos os camundongos apresentaram capacidade similar de destruir os parasitos quando estimulados com IFN- γ .

Em contrapartida, na ausência de estimulação prévia a capacidade dos neutrófilos de camundongos WT e *Sting*^{-/-} de destruir os esquistossômulos *in vitro* foi igualmente reduzida (Figura 13B).

Evidências demonstram que os neutrófilos desempenham um papel importante no controle da esquistossomose (FREUDENSTEIN-DAN; GOLD; FISHELSON, 2003). Têm sido relatado que o IFN- γ promove o aumento da taxa de sobrevivência dos neutrófilos através da ativação de seus mecanismos anti-apoptóticos (COSTANTINI et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2005). Com o intuito de avaliar o efeito do IFN- γ na sobrevivência dessas células, os neutrófilos da medula óssea de camundongos WT e *Sting*^{-/-} foram estimulados e, posteriormente, analisados por citometria de fluxo. Como mostrado na Figura 13A, não foram observadas diferenças significativas na taxa de sobrevivência quando comparamos os neutrófilos de ambos os grupos de camundongos não estimulados ou estimulados com SWAP ou LPS. Surpreendentemente, os neutrófilos de camundongos *Sting*^{-/-} apresentaram uma taxa de sobrevivência aumentada quando estimulados com IFN- γ em comparação aos neutrófilos de camundongos WT (Figura 13A).

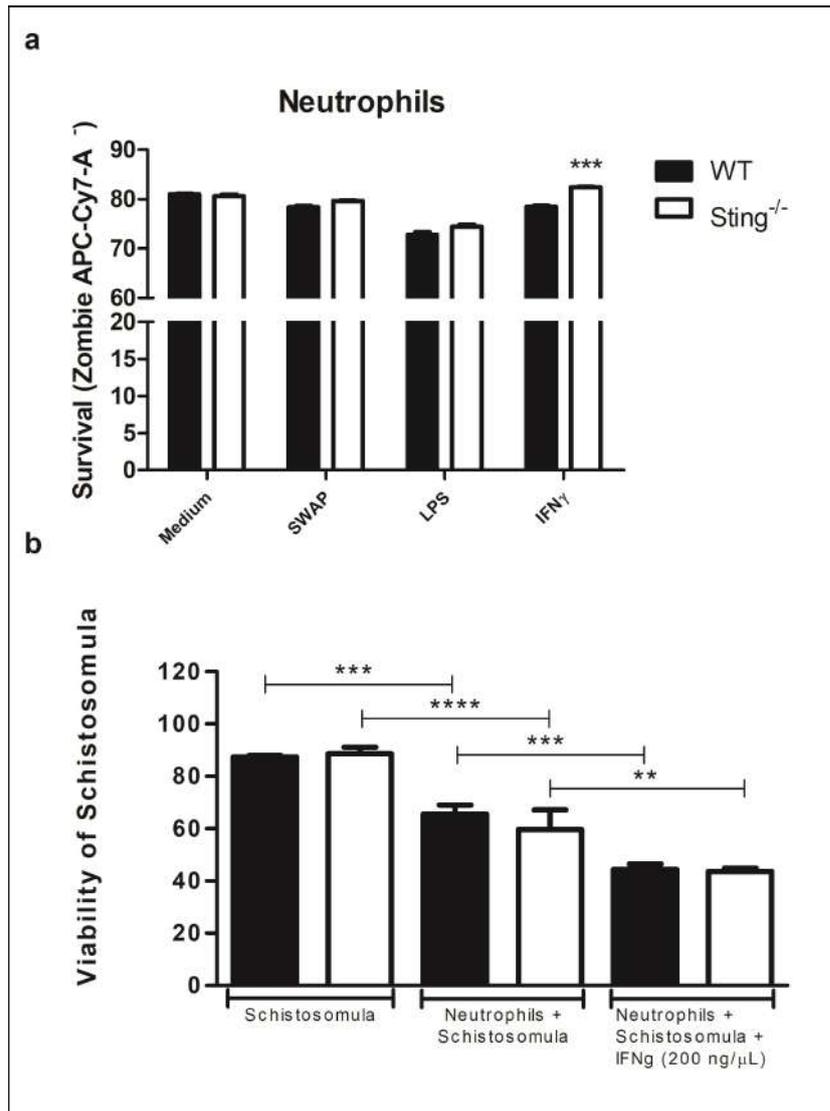


Figura 13: Análise da sobrevivência e função de neutrófilos após estimulação com IFN- γ . Neutrófilos da medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) e Sting^{-/-} foram estimulados com 200ng/mL de IFN- γ e, posteriormente, avaliados quanto a sobrevivência por citometria de fluxo (n=5) (A) e capacidade de destruir 100 esquistossômulos *in vitro* (n=5) (B). Em (A) antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP), meio de cultura e Lipopolissacarídeo (LPS) foram usados como controles experimentais. (*) ou (**) ou (***) ou (****) foram utilizados para demonstrar diferenças estatísticas com p<0,05 ou p<0,01 ou p<0,001 ou p<0,0001 em comparação aos neutrófilos WT, respectivamente. One-Way (B) ou Two-Way (A) ANOVA com pós-teste Bonferroni foram utilizados para comparações múltiplas.

5.6. Análise da microbiota intestinal

A microbiota intestinal influencia muitos aspectos da fisiologia do hospedeiro, incluindo a resistência a infecções e o desenvolvimento do sistema imunológico (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017). A fim de verificar se a ausência de STING pode interferir na composição da microbiota intestinal e, conseqüentemente, na infecção causada pelo *S. mansoni*, foram realizadas coletas de fezes de todas as porções do intestino de camundongos WT e Sting^{-/-} infectados ou não para o sequenciamento do RNA 16s. A diversidade beta foi verificada através da Análise de coordenadas principais (PCoA) com base nas distâncias UniFrac não-ponderadas. Como mostrado na Figura 14B, camundongos Sting^{-/-} não infectados e WT infectados foram agrupados separadamente, indicando diferenças significativas na composição da microbiota. Surpreendentemente, camundongos Sting^{-/-} infectados e WT não infectados apresentaram similaridades na população bacteriana intestinal, demonstrada pela proximidade entre os grupos. A análise da diversidade das comunidades microbianas mostrou a presença de bactérias pertencentes aos filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria nas fezes de todos os grupos de animais (Figura 14A). No entanto, diferenças significativas na microbiota intestinal entre os camundongos Sting^{-/-} e WT infectados ou não foram observadas em espécies específicas dentro desses filos. Camundongos Sting^{-/-} infectados apresentaram uma maior quantidade de *Desulfovibrio simplex* e *Parabacteroides distasonis* (ambas Gram-negativas) em comparação aos camundongos WT infectados. Membros do gênero *Desulfovibrio* sp. têm sido relacionados a danos na barreira intestinal e ao desenvolvimento de inflamação (ZHU et al., 2019). *P. distasonis* foi associada à inflamação intestinal por ser encontrada em quantidade considerável na doença de Crohn (LOPETUSO et al., 2018) e na colite induzida por Dextran sulfato de sódio (DSS) (DZIARSKI et al., 2016). Em contrapartida, camundongos Sting^{-/-} não infectados exibiram um grande crescimento de *Lactobacillus animalis* e *Allobaculum stercoricanis*, relacionadas a efeitos imunorreguladores benéficos ao intestino, enquanto que

camundongos WT não infectados exibiram uma maior quantidade de *D. simplex* e *P. Distasoni* (RODES et al., 2013; SCOTT et al., 2018). Tomados em conjuntos, os resultados sugerem que a infecção pelo *S. mansoni* induziu alterações na composição da microbiota intestinal de camundongos *Sting*^{-/-} para um perfil mais inflamatório.

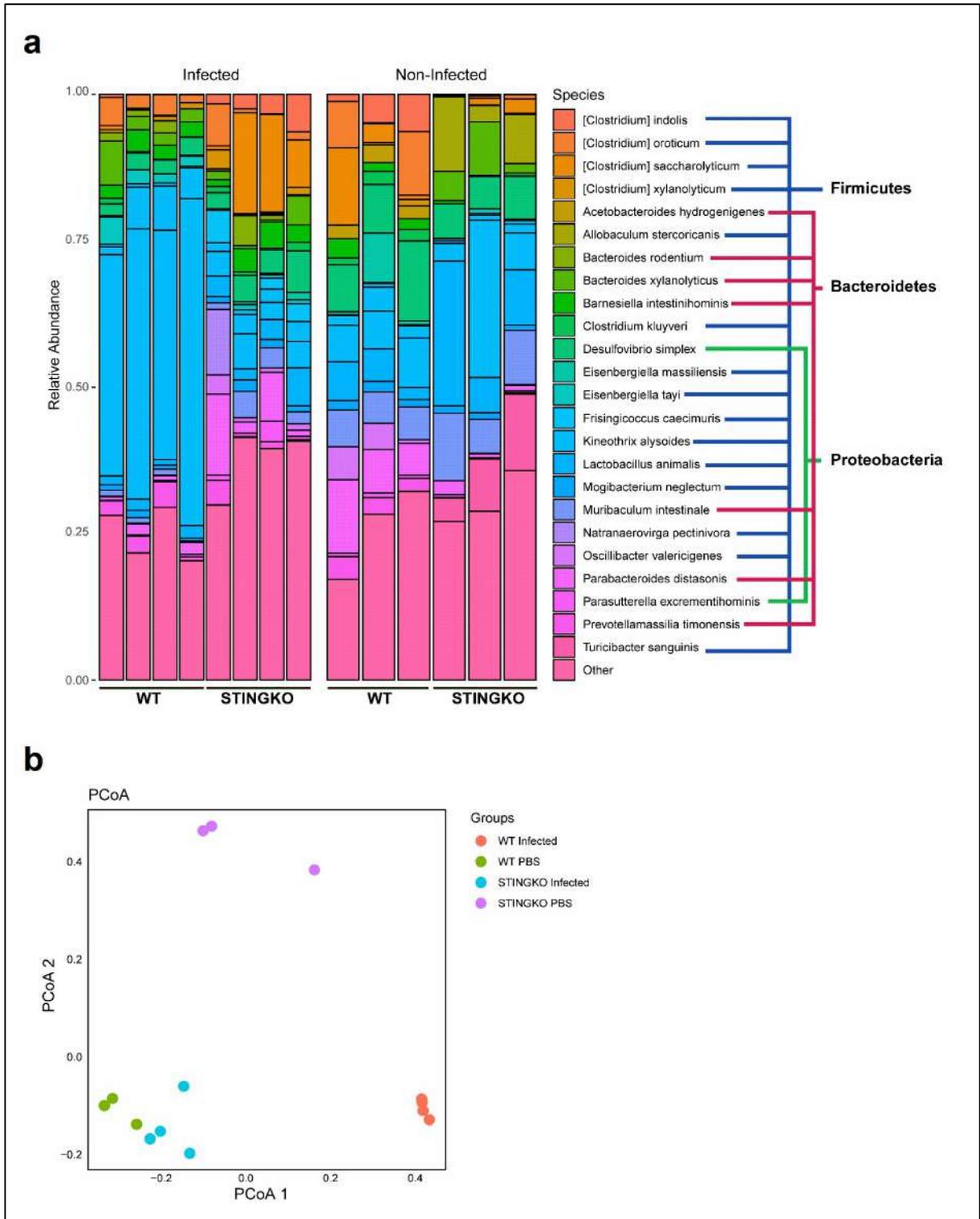


Figura 14: Análise da microbiota intestinal. O microbioma presente nas fezes de camundongos C57BL/6 (WT) e *Sting*^{-/-} não infectados (n=3) ou infectados com cercárias de *S. mansoni* por 40 dias (n=4) foram avaliados quanto a distribuição das Unidades taxonômicas operacionais (A) e, a estrutura das comunidades microbianas pela Análise de coordenadas principais (PCoA) com base nas

distâncias UniFrac não-ponderadas (**B**) após o sequenciamento de DNA. A análise estatística foi realizada utilizando o phyloseq package for R.

6. DISCUSSÃO

A esquistossomose é considerada a mais importante infecção helmíntica humana em termos de morbidade e mortalidade em todo o mundo (OLIVEIRA et al., 2016). Por ser uma doença de grande relevância, a melhor compreensão dos mecanismos pelos quais o sistema imunológico combate o parasito invasor e como o mesmo evita as respostas de defesa do hospedeiro se faz necessária. Dados recentes demonstraram que a infecção causada por helmintos do gênero *Schistosoma* afeta a expressão de vários receptores de ácidos nucleicos como AIM2, TLR3 e TLR7 (CHEN, D. et al., 2019; CHEN, T. T. W. et al., 2019; QU et al., 2018). A via de sinalização do TLR9 também foi associada à regulação da resposta granulomatosa dirigida por citocinas Th2 (ITO et al., 2009). Contudo, o envolvimento dos sensores de ácidos nucleicos na esquistossomose ainda é pouco conhecido e precisa de mais investigação.

Para a ativação dos sensores de DNA intracelulares é necessário que o DNA extracelular de parasitos ou de células danificadas seja transportado para dentro das células. Na literatura têm sido descritas diferentes moléculas de carga que auxiliam esse transporte, como a IL-26 e o peptídeo antimicrobiano endógeno LL37. Estudos mostram que essas moléculas se ligam ao DNA extracelular (genômico, mitocondrial ou NETs) e facilitam sua passagem para o citosol ou para os endossomos das células. Como consequência, o DNA extracelular induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias de maneira dependente de STING, AIM2 ou TLR9 (CHAMILOS et al., 2012; POLI et al., 2017). Complexos de autoanticorpos contendo DNA endógeno também foram descritos como estimuladores das células dendríticas plasmocitóides (pDCs) via interação entre FcγRIIa (CD32) e TLR9 (MEANS et al., 2005).

STING desempenha um papel essencial nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos virais e bacterianos (MARINHO et al., 2017). Entretanto, essa molécula adaptadora também pode contribuir para o estabelecimento e/ou gravidade de algumas

infecções por protozoários. Em um estudo anterior de infecção por *Plasmodium yoelii*, modelo de malária letal em camundongos, foi demonstrado que o reconhecimento do parasito por macrófagos (CD169+) foi mediado por STING e induziu a secreção de baixos níveis de IFN tipo I. A secreção de citocinas estimulou as pDCs a produzir grandes quantidades de IFN tipo I, causando uma resposta inflamatória potente com consequente diminuição da taxa de sobrevivência de camundongos infectados (SPAULDING et al., 2016). De forma similar, outro estudo mostrou que a ativação da sinalização do IFN tipo I dependente de cGAS-STING-IRF3 levou a um fenótipo letal de infecção por *P. yoelii* (YU et al., 2016). Além disso, um estudo realizado com o *Toxoplasma gondii* verificou que a co-expressão de cGAS e STING promoveu o reconhecimento do DNA do parasito, bem como a fosforilação de TBK1 e IRF3 e, a subsequente indução de genes estimulados por IFN (ISGs). Os ISGs efetores foram descritos por auxiliar a replicação eficiente do *T. gondii* em culturas de células e em camundongos (MAJUMDAR et al., 2015). Neste presente trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que STING pode ser ativado após o reconhecimento do DNA de *S. mansoni* via cGAS, levando ao aumento dos níveis de mRNA de IFN- β . Surpreendentemente, camundongos deficientes em STING apresentaram maior resistência a infecção e um aumento significativo nos níveis de IFN- γ produzido pelas células do baço restimuladas com SWAP quando comparados aos camundongos C57BL/6 (WT). Altos níveis de IFN- γ têm sido associados ao desenvolvimento de resistência adquirida contra a esquistossomose murina (YOU; MCMANUS, 2015). Existem evidências demonstrando que as vias de sinalização de IFN- β e IFN- γ se cruzam. A produção de IFN- β em resposta a uma infecção bacteriana ou a outros estímulos regula negativamente a expressão do receptor de IFN- γ (IFNGR) 1 em células mielóides. A expressão diminuída desse receptor reduz a estimulação das células T e, consequentemente, a produção de IFN- γ (RAYAMAJHI et al., 2010; SPAULDING et al., 2016). Além disso, camundongos C57BL/6 tendem a apresentar uma resposta Th1 (ALVES et al., 2016). Existem relatos conflitantes na literatura sobre a relevância da sinalização por IFN- γ durante o curso da esquistossomose. Apesar do IFN- γ

ser um fator importante para a indução da imunidade protetora, um estudo anterior mostrou que camundongos deficientes no receptor de IFN- γ não apresentaram diferenças na carga parasitária em comparação aos camundongos WT. Contudo, uma redução significativa no número de células secretoras de IgG2a no baço também foi observada nesses camundongos (AKHIANI et al., 1996). Têm sido demonstrado que a proteção ideal contra à infecção causada pelo parasito *S. mansoni* está relacionada com a indução de mecanismos imunes efetores dependentes tanto de IFN- γ quanto de linfócitos B (JANKOVIC et al., 1999). Portanto, é possível que os altos níveis de IFN- γ produzido pelas células do baço de camundongos Sting^{-/-} possam ter contribuído para o fenótipo de resistência observado neste trabalho.

Durante a progressão da esquistossomose, os esquistossômulos chegam na vasculatura pulmonar pelo fluxo sanguíneo venoso entre os dias 2 a 7 pós-infecção. No entanto, os esquistossômulos precisam se tornar mais finos e alongados para facilitar a passagem entre os estreitos capilares pulmonares e o sistema porta hepático do hospedeiro. Nesta fase da doença, o ataque imunológico contra os parasitos se torna mais eficaz (WILSON; COULSON, 2009). Dentre as células imunes, os neutrófilos são o primeiro tipo celular a chegar no sítio inflamatório, sendo essenciais para o desenvolvimento da resposta imune (MORAIS; FIGUEIREDO; ASSIS; ALVARENGA; et al., 2018). Nas infecções helmínticas, os neutrófilos causam danos ao parasito através do contato direto e/ou medeiam o recrutamento de outras populações de células imunes efetoras (CHEN, F. et al., 2014). Durante a fase pulmonar da esquistossomose, as lesões causadas na superfície dos esquistossômulos pelos neutrófilos liberam fragmentos de tegumento que podem ativar outras células imunes adjacentes (MASTIN; BICKLE; WILSON, 1985). Quando os neutrófilos são ativados, ocorre a produção de uma serina protease altamente tóxica conhecida como elastase neutrofilica (NE). Em um estudo anterior, foi demonstrado que larvas e vermes adultos do parasito *S. mansoni* foram sensíveis ao tratamento com NE *in vitro* (FREUDENSTEIN-DAN et al., 2003). Contudo, recentemente demonstramos que esse

parasito tem desenvolvido mecanismos de proteção que evitam a ativação do sistema imune do hospedeiro, como a expressão de um inibidor de protease do tipo Kunitz (SmKI-1) que atua bloqueando a NE (MORAIS; FIGUEIREDO; ASSIS; ALVARENGA; et al., 2018). Neste trabalho foi avaliado a porcentagem de neutrófilos presente no BAL, pulmão e baço de camundongos *Sting*^{-/-}. Inesperadamente, foi observado que camundongos *Sting*^{-/-} apresentam uma frequência mais elevada de neutrófilos no BAL, no pulmão e no baço em comparação aos camundongos WT, independentemente da infecção. Além disso, em camundongos *Sting*^{-/-} infectados com o *S. mansoni* foi detectado um aumento na produção de IL-17, IL-6 e TNF- α no BAL em comparação aos camundongos WT. Evidências demonstram que a secreção de IL-6 promove a polarização da resposta para um perfil Th17 (BETTELLI et al., 2006). A estimulação excessiva da resposta Th17 têm sido associada a resistência a esquistossomose. O mecanismo de proteção envolvido pode estar relacionado à imunidade gerada por anticorpos e ao recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o pulmão (TALLIMA et al., 2009). O citocina TNF- α também regula a infiltração de células imunes ao pulmão e induz a expressão de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 nas células endoteliais (TROTTEIN et al., 1999). Os neutrófilos da medula óssea de camundongos WT e *Sting*^{-/-} também foram avaliados quanto a sua habilidade para destruir esquistossômulos *in vitro* após estimulação prévia com IFN- γ . Foi demonstrado que os neutrófilos de ambos os camundongos apresentaram capacidade similar para destruir os parasitos com ou sem estímulo. Contudo, os neutrófilos da medula óssea de camundongos *Sting*^{-/-} apresentaram uma taxa de sobrevivência aumentada quando estimulados com IFN- γ em comparação aos neutrófilos de camundongos WT. A associação entre neutrófilos e STING também foi relatada anteriormente. Um estudo anterior investigou se a sinalização por STING poderia estar envolvida no desenvolvimento de pancreatite aguda. Camundongos *Tmem173*^{gt} apresentaram redução na gravidade da doença com uma diminuição no número total de leucócitos (CD45+) e de neutrófilos (Ly6G+) (ZHAO et al., 2018). Outro estudo demonstrou que as vias de sinalização por TLR9 e STING desempenharam papéis opostos na

inflamação pulmonar induzida por sílica. Enquanto camundongos *Sting*^{-/-} e *cGAS*^{-/-} exibiram uma redução de neutrófilos e macrófagos nas vias aéreas, camundongos *TLR9*^{-/-} e WT responderam aumentando o recrutamento dessas células (BENMERZOUG et al., 2018). O papel oposto dessas vias também foi observado durante a resposta imune do hospedeiro contra o *Staphylococcus aureus* em um modelo de infecção cutânea. Contudo, enquanto camundongos *Myd88*^{-/-} diminuíram o recrutamento de neutrófilos, camundongos *Sting*^{GT/GT} apresentaram o efeito oposto, restringindo o crescimento bacteriano (SCUMPIA et al., 2017). Corroborando com esse último estudo, o elevado número de neutrófilos observado em camundongos *Sting*^{-/-} nesse presente trabalho pode ter contribuído para a redução da carga parasitária. No entanto, mais experimentos serão necessários para testar esta hipótese.

Outro aspecto que também pode estar interferindo na infecção causada pelo parasito *S. mansoni* é a interação entre o sistema imunológico e a microbiota. Evidências demonstram que os dinucleotídeos cíclicos produzidos por bactérias da microbiota intestinal podem ativar a via de STING (CANESSO et al., 2018). Além dos dinucleotídeos cíclicos, o LPS derivado da parede celular de bactérias intestinais Gram-negativas pode ser crítico para o desenvolvimento e/ou progressão de uma variedade de doenças. O reconhecimento do LPS é mediado pelo receptor TLR4 das células epiteliais e também das células imunes quando translocado para a circulação sanguínea (RODES et al., 2013). Após o reconhecimento, esse receptor desencadeia a ativação do NF-κB e a produção de citocinas inflamatórias (WU et al., 2019). O equilíbrio entre os efeitos inflamatórios e anti-inflamatórios da microbiota intestinal tem um papel importante no estabelecimento e/ou gravidade da esquistossomose no hospedeiro (JENKINS et al., 2018). A relevância clínica da composição da microbiota foi demonstrada em um estudo anterior, onde a mudança para o filo Proteobacteria (relacionado ao desenvolvimento de inflamação intestinal) foi relatada em todos os casos de crianças com esquistossomose que apresentaram vômito, sangue nas fezes e esplenomegalia (SCHNEEBERGER et al., 2018). Diferenças na composição da

microbiota têm sido relacionadas com a formação dos granulomas e a migração de ovos através da parede intestinal. Camundongos infectados apenas com vermes machos do parasito *S. mansoni* mostraram um microbioma semelhante ao de camundongos não infectados (FLOUDAS et al., 2019; JENKINS et al., 2018). Com o intuito de avaliar se a composição da microbiota intestinal também poderia estar envolvida com o fenótipo de resistência dos camundongos *Sting*^{-/-} à infecção pelo *S. mansoni*, o microbioma presente nas fezes desses animais foi analisado e identificado. As bactérias encontradas nas fezes dos camundongos WT e *Sting*^{-/-} infectados ou não pertenciam aos filos Firmicutes (maioria Gram-positiva), Bacteroidetes (Gram-negativa) e Proteobacteria (Gram-negativa). A análise da diversidade beta mostrou que camundongos *Sting*^{-/-} não infectados e WT infectados apresentaram diferenças significativas na composição da população bacteriana encontrada. Observamos semelhanças na microbiota intestinal de camundongos *Sting*^{-/-} infectados e WT não infectados, que foram evidenciadas pela proximidade entre os grupos. Quando as espécies específicas foram avaliadas, camundongos *Sting*^{-/-} não infectados apresentam uma menor quantidade de *Desulfovibrio simplex* (filo Proteobacteria - relacionada ao desenvolvimento de inflamação do intestino) e uma maior quantidade de *Lactobacillus animalis* e *Allobaculum stercoricanis* (ambos pertencentes ao filo Firmicutes - relacionados à efeitos anti-inflamatórios) em comparação aos camundongos WT não infectado. Entretanto, após a infecção com cercárias do parasito *S. mansoni*, camundongos *Sting*^{-/-} apresentaram uma maior quantidade de *Desulfovibrio simplex*, uma menor quantidade de *Lactobacillus animalis* e nenhum *Allobaculum stercoricanis* em comparação aos camundongos WT. O efeito pró-inflamatório da microbiota intestinal observado em camundongos *Sting*^{-/-} infectados pode ter interferido no estabelecimento da esquistossomose em níveis similares ao WT, contribuindo então para o fenótipo de resistência observado nesses animais. Em um estudo anterior, foi avaliado se a ausência da via de STING poderia interferir na composição da microbiota do cólon. Embora a diversidade beta também tenha mostrado que os camundongos *Sting*^{-/-} e WT não infectados foram agrupados separadamente, efeitos

imunológicos opostos foram observados quando comparamos com os resultados obtidos neste presente trabalho. Camundongos *Sting*^{-/-} não infectados mostraram um aumento de bactérias do gênero *Desulfovibrio* e uma diminuição de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Allobaculum* (Actinobacteria e Firmicutes, respectivamente - relacionados à efeitos anti-inflamatórios) no cólon em comparação aos camundongos WT não infectados (CANESSO et al., 2018). Contudo, vários fatores podem interferir na composição da microbiota intestinal. Amostras de fezes obtidas de diferentes porções do intestino e fatores ambientais com frequência costumam causar grandes alterações na abundância e nos tipos de bactérias encontradas (DZIARSKI et al., 2016; SCHNEEBERGER et al., 2018). Além da microbiota, no referido estudo também foi demonstrado que camundongos *Sting*^{-/-} apresentaram uma menor quantidade de células caliciformes, células linfoides inatas do grupo II (ILC2) e linfócitos intraepiteliais induzidos (IEL), e uma maior frequência de ILC1 e ILC3 no cólon quando comparados aos camundongos WT. O desenvolvimento e a função das células T regulatórias *Foxp3*⁺ e *LAP*⁺ também foram comprometidos na ausência de STING (CANESSO et al., 2018).

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou pela primeira vez que o DNA de *Schistosoma mansoni* pode ser reconhecido por cGAS, levando à ativação subsequente da molécula adaptadora STING. Além disso, camundongos deficientes em STING foram mais resistentes a infecção causada pelo parasito *S. mansoni* quando comparados aos camundongos do grupo controle. Alguns dos fatores que podem ter sido responsáveis por esse fenótipo são: (1) produção aumentada de IFN- γ pelas células do baço estimuladas com antígenos do parasito; (2) maior frequência de neutrófilos em diferentes órgãos e; (3) um perfil mais inflamatório da microbiota intestinal. A descoberta do possível envolvimento da via cGAS-STING no estabelecimento da infecção pode auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esquistossomose.

8. REFERÊNCIAS

AKHIANI, A. A. et al. Lack of interferon-gamma receptor does not influence the outcome of infection in murine schistosomiasis mansoni. **Scand J Immunol**, v. 43, n. 3, p. 257-62, Mar 1996.

ALVES, C. C. et al. Parasitological, Pathological, and Immunological Parameters Associated with Schistosoma mansoni Infection and Reinfection in BALB/c AND C57BL/6 Mice. **J Parasitol**, v. 102, n. 3, p. 336-41, Jun 2016.

ANGELES, J. M. M.; MERCADO, V. J. P.; RIVERA, P. T. Behind Enemy Lines: Immunomodulatory Armamentarium of the Schistosome Parasite. **Front Immunol**, v. 11, p. 1018, 2020.

ASSIS, N. R. G. et al. The use of gold nanorods as a new vaccine platform against schistosomiasis. **J Control Release**, v. 275, p. 40-52, Apr 10 2018.

BARBER, G. N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 1, p. 10-20, Feb 2011.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **J Adv Res**, v. 4, n. 5, p. 433-44, Sep 2013.

BENMERZOUG, S. et al. STING-dependent sensing of self-DNA drives silica-induced lung inflammation. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 5226, Dec 6 2018.

BERGQUIST, R.; UTZINGER, J.; KEISER, J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative? **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 1, p. 74, Mar 28 2017.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 11 2006.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 4, p. 163-76, Apr 2009.

CAMPOS, P. C. et al. TLR7 and TLR3 Sense Brucella abortus RNA to Induce Proinflammatory Cytokine Production but They Are Dispensable for Host Control of Infection. **Front Immunol**, v. 8, p. 28, 2017.

CANESSO, M. C. C. et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. **Mucosal Immunol**, v. 11, n. 3, p. 820-834, May 2018.

- CERQUEIRA, D. M. et al. Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to *Brucella abortus* infection. **PLoS Pathog**, v. 14, n. 12, p. e1007519, Dec 2018.
- CHAMILOS, G. et al. Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. **Blood**, v. 120, n. 18, p. 3699-707, Nov 1 2012.
- CHEN, D. et al. Expression of TLR2, TLR3, TLR4, and TLR7 on pulmonary lymphocytes of *Schistosoma japonicum*-infected C57BL/6 mice. **Innate Immun**, v. 25, n. 4, p. 224-234, May 2019.
- CHEN, F. et al. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. **Nat Immunol**, v. 15, n. 10, p. 938-46, Oct 2014.
- CHEN, J. Q.; SZODORAY, P.; ZEHER, M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 50, n. 1, p. 1-17, Feb 2016.
- CHEN, Q.; SUN, L.; CHEN, Z. J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. **Nat Immunol**, v. 17, n. 10, p. 1142-9, Sep 20 2016.
- CHEN, T. T. W. et al. Activation of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes in a mouse model of *Schistosoma mansoni* infection. **J Helminthol**, v. 94, p. e72, Aug 15 2019.
- CHENSUE, S. W. et al. Endogenous IL-1 receptor antagonist protein (IRAP) regulates schistosome egg granuloma formation and the regional lymphoid response. **J Immunol**, v. 151, n. 7, p. 3654-62, Oct 1 1993.
- CHIARAMONTE, M. G. et al. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **J Clin Invest**, v. 104, n. 6, p. 777-85, Sep 1999.
- CHOKESUWATTANASKUL, S. et al. A robust intracellular metabolite extraction protocol for human neutrophil metabolic profiling. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0209270, 2018.
- CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends Parasitol**, v. 30, n. 3, p. 141-50, Mar 2014.
- COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-64, Jun 28 2014.

COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. **Front Immunol**, v. 9, p. 3042, 2018.

COSTANTINI, C. et al. Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells. **Int Immunol**, v. 22, n. 10, p. 827-38, Oct 2010.

COULSON, P. S. et al. Nitric oxide produced in the lungs of mice immunized with the radiation-attenuated schistosome vaccine is not the major agent causing challenge parasite elimination. **Immunology**, v. 93, n. 1, p. 55-63, Jan 1998.

CRABTREE, J. E.; WILSON, R. A. The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol**, v. 8, n. 3, p. 265-85, May 1986.

CROSNIER, C. et al. Systematic screening of 96 *Schistosoma mansoni* cell-surface and secreted antigens does not identify any strongly protective vaccine candidates in a mouse model of infection. **Wellcome Open Res**, v. 4, p. 159, 2019.

DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J. Gene suppression in schistosomes using RNAi. **Methods Mol Biol**, v. 1201, p. 143-64, 2015.

DE CARVALHO, R. V. H. et al. Leishmania RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 5273, Nov 21 2019.

DE OLIVEIRA, F. L. et al. Galectin-3, histone deacetylases, and Hedgehog signaling: Possible convergent targets in schistosomiasis-induced liver fibrosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 2, p. e0005137, Feb 2017.

DHANWANI, R.; TAKAHASHI, M.; SHARMA, S. Cytosolic sensing of immuno-stimulatory DNA, the enemy within. **Curr Opin Immunol**, v. 50, p. 82-87, Feb 2018.

DURAES, F. V. et al. IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. **Immunol Lett**, v. 125, n. 1, p. 72-7, Jun 30 2009.

DZIARSKI, R. et al. Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* Enhance and *Alistipes finegoldii* Attenuates Colitis in Mice. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146162, 2016.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-1, Oct 1 2010.

EL RIDI, R.; TALLIMA, H.; MIGLIARDO, F. Biochemical and biophysical methodologies open the road for effective schistosomiasis therapy and vaccination. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 1 Pt B, p. 3613-3620, Jan 2017.

EL RIDI, R. A.; TALLIMA, H. A. Novel therapeutic and prevention approaches for schistosomiasis: review. **J Adv Res**, v. 4, n. 5, p. 467-78, Sep 2013.

ELBAZ, T.; ESMAT, G. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. **J Adv Res**, v. 4, n. 5, p. 445-52, Sep 2013.

EVAN SECOR, W. Water-based interventions for schistosomiasis control. **Pathog Glob Health**, v. 108, n. 5, p. 246-54, Jul 2014.

FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2585-91, Mar 1 2000.

FLOUDAS, A. et al. Schistosoma mansoni Worm Infection Regulates the Intestinal Microbiota and Susceptibility to Colitis. **Infect Immun**, v. 87, n. 8, Aug 2019.

FREUDENSTEIN-DAN, A.; GOLD, D.; FISHELSON, Z. Killing of schistosomes by elastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated schistosome killing. **J Parasitol**, v. 89, n. 6, p. 1129-35, Dec 2003.

FUNG, T. C.; OLSON, C. A.; HSIAO, E. Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nat Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 145-155, Feb 2017.

GAIDT, M. M. et al. The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. **Cell**, v. 171, n. 5, p. 1110-1124 e18, Nov 16 2017.

GALLUCCI, S.; MAFFEI, M. E. DNA Sensing across the Tree of Life. **Trends Immunol**, v. 38, n. 10, p. 719-732, Oct 2017.

GAO, P.; HU, M. M.; SHU, H. B. CSK promotes innate immune response to DNA virus by phosphorylating MITA. **Biochem Biophys Res Commun**, Mar 19 2020.

GLUCK, S.; ABLASSER, A. Innate immunosensing of DNA in cellular senescence. **Curr Opin Immunol**, v. 56, p. 31-36, Feb 2019.

GORFU, G. et al. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. **MBio**, v. 5, n. 1, Feb 18 2014.

GRAHAM, B. B.; KUMAR, R. Schistosomiasis and the pulmonary vasculature (2013 Grover Conference series). **Pulm Circ**, v. 4, n. 3, p. 353-62, Sep 2014.

GRIMES, J. E. et al. The roles of water, sanitation and hygiene in reducing schistosomiasis: a review. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 156, Mar 13 2015.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 383-97, Jun 2012.

HAMS, E. et al. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 1, p. 367-72, Jan 7 2014.

HAMS, E. et al. The helminth T2 RNase omega1 promotes metabolic homeostasis in an IL-33- and group 2 innate lymphoid cell-dependent mechanism. **FASEB J**, v. 30, n. 2, p. 824-35, Feb 2016.

HAN, H.; ZIEGLER, S. F. Bronchoalveolar Lavage and Lung Tissue Digestion. **Bio Protoc**, v. 3, n. 16, 2013.

HE, Y. X.; SALAFSKY, B.; RAMASWAMY, K. Comparison of skin invasion among three major species of *Schistosoma*. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 5, p. 201-3, May 2005.

HESSE, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J Immunol**, v. 167, n. 11, p. 6533-44, Dec 1 2001.

HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 3157-66, Mar 1 2004.

HINZ, R. et al. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review. **Mol Cell Probes**, v. 31, p. 2-21, Feb 2017.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6406-16, Jun 15 2000.

HUBER, R. G.; EIBL, C.; FUCHS, J. E. Intrinsic flexibility of NLRP pyrin domains is a key factor in their conformational dynamics, fold stability, and dimerization. **Protein Sci**, v. 24, n. 2, p. 174-81, Feb 2015.

ISHIKAWA, H.; BARBER, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 674-8, Oct 2 2008.

ITO, T. et al. Toll-like receptor 9 activation is a key mechanism for the maintenance of chronic lung inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 180, n. 12, p. 1227-38, Dec 15 2009.

JANKOVIC, D. et al. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. **J Immunol**, v. 162, n. 1, p. 345-51, Jan 1 1999.

JENKINS, T. P. et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 12072, Aug 13 2018.

KHALIFE, J. et al. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 142, n. 12, p. 4422-7, Jun 15 1989.

KING, C. L. et al. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. **J Immunol**, v. 160, n. 7, p. 3578-84, Apr 1 1998.

KUHNS, D. B. et al. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. **Curr Protoc Immunol**, v. 111, p. 7 23 1-7 23 16, Nov 2 2015.

LAI, J. et al. Compound C Reducing Interferon Expression by Inhibiting cGAMP Accumulation. **Front Pharmacol**, v. 11, p. 88, 2020.

LAWSON, B. W.; BICKLE, Q. D.; TAYLOR, M. G. Mechanisms involved in the loss of antibody-mediated adherence of macrophages to lung-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro. **Parasitology**, v. 106 (Pt 5), p. 463-9, Jun 1993.

LAYLAND, L. E. et al. Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 8, p. 2174-84, Aug 2007.

LI, X. D. et al. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. **Science**, v. 341, n. 6152, p. 1390-4, Sep 20 2013.

- LI, Y.; WILSON, H. L.; KISS-TOTH, E. Regulating STING in health and disease. **J Inflamm (Lond)**, v. 14, p. 11, 2017.
- LIU, X. et al. Taurine Alleviates Schistosoma-Induced Liver Injury by Inhibiting the TXNIP/NLRP3 Inflammasome Signal Pathway and Pyroptosis. **Infect Immun**, v. 87, n. 12, Dec 2019.
- LO, N. C. et al. Impact and cost-effectiveness of snail control to achieve disease control targets for schistosomiasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 4, p. E584-E591, Jan 23 2018.
- LOPETUSO, L. R. et al. Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. **Dig Dis**, v. 36, n. 1, p. 56-65, 2018.
- LU, Y. Q. et al. NLRP3 inflammasome activation results in liver inflammation and fibrosis in mice infected with *Schistosoma japonicum* in a Syk-dependent manner. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 8120, Aug 14 2017.
- LUECKE, S.; PALUDAN, S. R. Molecular requirements for sensing of intracellular microbial nucleic acids by the innate immune system. **Cytokine**, v. 98, p. 4-14, Oct 2017.
- MAGALHAES, K. G. et al. Schistosomal Lipids Activate Human Eosinophils via Toll-Like Receptor 2 and PGD2 Receptors: 15-LO Role in Cytokine Secretion. **Front Immunol**, v. 9, p. 3161, 2018.
- MAJUMDAR, T. et al. Induction of interferon-stimulated genes by IRF3 promotes replication of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 3, p. e1004779, Mar 2015.
- MARCHI, L. F. et al. In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. **Int Immunopharmacol**, v. 18, n. 2, p. 228-35, Feb 2014.
- MARGOLIS, S. R.; WILSON, S. C.; VANCE, R. E. Evolutionary Origins of cGAS-STING Signaling. **Trends Immunol**, v. 38, n. 10, p. 733-743, Oct 2017.
- MARINHO, F. V. et al. *Schistosoma mansoni* Tegument (Smteg) Induces IL-10 and Modulates Experimental Airway Inflammation. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0160118, 2016.
- MARINHO, F. V. et al. The Emerging Roles of STING in Bacterial Infections. **Trends Microbiol**, v. 25, n. 11, p. 906-918, Nov 2017.

MASTIN, A.; BICKLE, Q. D.; WILSON, R. A. An ultrastructural examination of irradiated, immunizing schistosomula of *Schistosoma mansoni* during their extended stay in the lungs. **Parasitology**, v. 91 (Pt 1), p. 101-10, Aug 1985.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, n. 1, p. 13, Aug 9 2018.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MEANS, T. K. et al. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 407-17, Feb 2005.

MENG, N. et al. Activation of NLRP3 inflammasomes in mouse hepatic stellate cells during *Schistosoma J.* infection. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 39316-39331, Jun 28 2016.

MENSON, E. N.; COULSON, P. S.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: circulating and pulmonary leucocyte responses related to the induction of protective immunity in mice by irradiated parasites. **Parasitology**, v. 98 (Pt 1), p. 43-55, Feb 1989.

MERRIFIELD, M. et al. Advancing a vaccine to prevent human schistosomiasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2988-2991, Jun 3 2016.

MORAIS, S. B. et al. *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation. **PLoS Pathog**, v. 14, n. 2, p. e1006870, Feb 2018.

MORAIS, S. B. et al. *Schistosoma mansoni* SmKI-1 or Its C-Terminal Fragment Induces Partial Protection Against *S. mansoni* Infection in Mice. **Front Immunol**, v. 9, p. 1762, 2018.

MOTWANI, M.; PESIRIDIS, S.; FITZGERALD, K. A. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. **Nat Rev Genet**, v. 20, n. 11, p. 657-674, Nov 2019.

NDLOVU, H.; BROMBACHER, F. Role of IL-4Ralpha during acute schistosomiasis in mice. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 9, p. 421-7, Sep 2014.

OLIVEIRA, S. C. et al. A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 6, p. 1366-1371, Nov 2016.

OLVEDA, D. U. et al. The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. **Int J Infect Dis**, v. 28, p. 193-203, Nov 2014.

OTHMAN, A. A.; SOLIMAN, R. H. Schistosomiasis in Egypt: A never-ending story? **Acta Trop**, v. 148, p. 179-90, Aug 2015.

PAPAMATHEAKIS, D. G. et al. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. **Pulm Circ**, v. 4, n. 4, p. 596-611, Dec 2014.

PENG, H. et al. IL-33 Contributes to Schistosoma japonicum-induced Hepatic Pathology through Induction of M2 Macrophages. **Sci Rep**, v. 6, p. 29844, Jul 21 2016.

PLATNICH, J. M.; MURUVE, D. A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. **Arch Biochem Biophys**, v. 670, p. 4-14, Jul 30 2019.

POLI, C. et al. IL-26 Confers Proinflammatory Properties to Extracellular DNA. **J Immunol**, v. 198, n. 9, p. 3650-3661, May 1 2017.

QU, J. et al. TLR3 Modulates the Response of NK Cells against Schistosoma japonicum. **J Immunol Res**, v. 2018, p. 7519856, 2018.

RAYAMAJHI, M. et al. Induction of IFN- α enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ . **J Exp Med**, v. 207, n. 2, p. 327-37, Feb 15 2010.

RHEINBERG, C. E. et al. *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, and *S. rodhaini* in mice: relationship between patterns of lung migration by schistosomula and perfusion recovery of adult worms. **Parasitol Res**, v. 84, n. 4, p. 338-42, 1998.

RIESTRA, A. M. et al. *Trichomonas vaginalis* Induces NLRP3 Inflammasome Activation and Pyroptotic Cell Death in Human Macrophages. **J Innate Immun**, v. 11, n. 1, p. 86-98, 2019.

RITTER, M. et al. *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 47, p. 20459-64, Nov 23 2010.

RODES, L. et al. Effect of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: an in vitro study using a human colonic microbiota model. **J Microbiol Biotechnol**, v. 23, n. 4, p. 518-26, Apr 2013.

RONGVAUX, A. Innate immunity and tolerance toward mitochondria. **Mitochondrion**, Oct 17 2017.

ROSS, A. G. et al. Katayama syndrome. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 218-24, Mar 2007.

RUTH, J. H. et al. IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) expression, function, and cytokine-mediated regulation during mycobacterial and schistosomal antigen-elicited granuloma formation. **J Immunol**, v. 156, n. 7, p. 2503-9, Apr 1 1996.

SAKAMOTO, E. et al. Type I and type II interferons delay human neutrophil apoptosis via activation of STAT3 and up-regulation of cellular inhibitor of apoptosis 2. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 1, p. 301-9, Jul 2005.

SANCHES, R. C. O. et al. NLRP6 Plays an Important Role in Early Hepatic Immunopathology Caused by *Schistosoma mansoni* Infection. **Front Immunol**, v. 11, p. 795, 2020.

SANCHES, R. C. O.; SOUZA, C.; OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma* antigens as activators of inflammasome pathway: from an unexpected stimulus to an intriguing role. **Microbes Infect**, Aug 22 2020.

SANIN, D. E.; MOUNTFORD, A. P. Sm16, a major component of *Schistosoma mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical activation and delays antigen processing. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 1, Jan 6 2015.

SANIN, D. E.; PRENDERGAST, C. T.; MOUNTFORD, A. P. IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. **J Immunol**, v. 195, n. 3, p. 1218-32, Aug 1 2015.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 23, p. 7537-41, Dec 2009.

SCHNEEBERGER, P. H. H. et al. Investigations on the interplays between *Schistosoma mansoni*, praziquantel and the gut microbiome. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 1, p. 168, Mar 12 2018.

SCOTT, N. A. et al. Antibiotics induce sustained dysregulation of intestinal T cell immunity by perturbing macrophage homeostasis. **Sci Transl Med**, v. 10, n. 464, Oct 24 2018.

SCUMPIA, P. O. et al. Opposing roles of Toll-like receptor and cytosolic DNA-STING signaling pathways for *Staphylococcus aureus* cutaneous host defense. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 7, p. e1006496, Jul 2017.

SHAKER, Y.; SAMY, N.; ASHOUR, E. Hepatobiliary Schistosomiasis. **J Clin Transl Hepatol**, v. 2, n. 3, p. 212-6, Sep 2014.

SHU, C.; LI, X.; LI, P. The mechanism of double-stranded DNA sensing through the cGAS-STING pathway. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 25, n. 6, p. 641-8, Dec 2014.

SKELLY, P. J. The use of imaging to detect schistosomes and diagnose schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 35, n. 9-10, p. 295-301, Sep-Oct 2013.

SONG, L. G. et al. History of schistosomiasis epidemiology, current status, and challenges in China: on the road to schistosomiasis elimination. **Parasitol Res**, v. 115, n. 11, p. 4071-4081, Nov 2016.

SPAULDING, E. et al. STING-Licensed Macrophages Prime Type I IFN Production by Plasmacytoid Dendritic Cells in the Bone Marrow during Severe *Plasmodium yoelii* Malaria. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 10, p. e1005975, Oct 2016.

SWANSON, K. V. et al. A noncanonical function of cGAMP in inflammasome priming and activation. **J Exp Med**, v. 214, n. 12, p. 3611-3626, Dec 4 2017.

TALLIMA, H. et al. Transforming growth factor-beta and Th17 responses in resistance to primary murine schistosomiasis mansoni. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p. 239-45, Dec 2009.

TCHUEM TCHUENTE, L. A. et al. Moving from control to elimination of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: time to change and adapt strategies. **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 1, p. 42, Feb 20 2017.

TROTTEIN, F. et al. *Schistosoma mansoni* schistosomula reduce E-selectin and VCAM-1 expression in TNF-alpha-stimulated lung microvascular endothelial cells by interfering with the NF-kappaB pathway. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 11, p. 3691-701, Nov 1999.

UTZINGER, J. et al. New diagnostic tools in schistosomiasis. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 6, p. 529-42, Jun 2015.

VANHOUTTE, F. et al. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR3 sensing is required for dendritic cell activation, but dispensable to control *Schistosoma mansoni* infection and pathology. **Microbes Infect**, v. 9, n. 14-15, p. 1606-13, Nov-Dec 2007.

WANG, X. et al. Inhibition of cytokine response to TLR stimulation and alleviation of collagen-induced arthritis in mice by *Schistosoma japonicum* peptide SJMHE1. **J Cell Mol Med**, v. 21, n. 3, p. 475-486, Mar 2017.

WEERAKOON, K. G. et al. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 4, p. 939-67, Oct 2015.

WEN, Z. et al. Positive Feedback Regulation between Transglutaminase 2 and Toll-Like Receptor 4 Signaling in Hepatic Stellate Cells Correlates with Liver Fibrosis Post *Schistosoma japonicum* Infection. **Front Immunol**, v. 8, p. 1808, 2017.

WENDT, G. R.; COLLINS, J. J., 3RD. Schistosomiasis as a disease of stem cells. **Curr Opin Genet Dev**, v. 40, p. 95-102, Oct 2016.

WHITFIELD, P. J. et al. Age-dependent survival and infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Parasitology**, v. 127, n. Pt 1, p. 29-35, Jul 2003.

WHO. Schistosomiasis. Disponível em: < <http://www.who.int/schistosomiasis/en/> >. Acesso em: 17 de março de 2018.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends Parasitol**, v. 25, n. 9, p. 423-31, Sep 2009.

WU, C. H. et al. D-methionine alleviates cisplatin-induced mucositis by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal inflammation. **Ther Adv Med Oncol**, v. 11, p. 1758835918821021, 2019.

XIA, P. et al. DNA sensor cGAS-mediated immune recognition. **Protein Cell**, v. 7, n. 11, p. 777-791, Nov 2016.

XIAO, S. H.; SUN, J.; CHEN, M. G. Pharmacological and immunological effects of praziquantel against *Schistosoma japonicum*: a scoping review of experimental studies. **Infect Dis Poverty**, v. 7, n. 1, p. 9, Feb 7 2018.

YDENS, E. et al. Nlrp6 promotes recovery after peripheral nerve injury independently of inflammasomes. **J Neuroinflammation**, v. 12, p. 143, Aug 8 2015.

YOU, H.; MCMANUS, D. P. Vaccines and diagnostics for zoonotic schistosomiasis japonica. **Parasitology**, v. 142, n. 2, p. 271-89, Feb 2015.

YU, X. et al. Cross-Regulation of Two Type I Interferon Signaling Pathways in Plasmacytoid Dendritic Cells Controls Anti-malaria Immunity and Host Mortality. **Immunity**, v. 45, n. 5, p. 1093-1107, Nov 15 2016.

ZHANG, M. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 deficiencies exert differential in vivo effects against *Schistosoma japonicum*. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 4, p. 199-209, Apr 2011.

ZHAO, Q. et al. STING Signaling Promotes Inflammation in Experimental Acute Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 154, n. 6, p. 1822-1835 e2, May 2018.

ZHU, H. Z. et al. Xiaoyaosan improves depressive-like behavior in rats with chronic immobilization stress through modulation of the gut microbiota. **Biomed Pharmacother**, v. 112, p. 108621, Apr 2019.

9. REFERÊNCIA DO ARTIGO GERADO A PARTIR DA TESE

- SOUZA, CLÁUDIA; SANCHES, RODRIGO C. O.; ASSIS, NATAN R. G.; MARINHO, FÁBIO V.; MAMBELLI, FÁBIO S.; MORAIS, SUELLEN B.; GIMENEZ, ENRICO G. T.; GUIMARÃES, ERIKA S.; CASTRO, TIAGO B. R.; OLIVEIRA, SERGIO C. **The role of the adaptor molecule STING during *Schistosoma mansoni* infection.** Scientific Reports, v.10, p.7901 - , 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-64788-6.