



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

LUCAS KRAEMER ROCHA

**PAPEL PROTETOR DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 NA
ASCARIDÍASE LARVAL EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte, MG

2022

LUCAS KRAEMER ROCHA

**PAPEL PROTETOR DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 NA
ASCARIDÍASE LARVAL EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Prof^o. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientador: Prof^o. Remo de Castro Russo

Belo Horizonte, MG

2022

043

Rocha, Lucas Kraemer.

Papel protetor do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na Ascaridíase Larval Experimental [manuscrito] / Lucas Kraemer Rocha. – 2022.

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

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara. Coorientador: Remo Castro Russo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Ascaridíase. 3. Resposte imune. 4. Receptores de Quimiocinas. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Russo, Remo Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"PAPEL PROTETOR DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 NA ASCARIDÍASE LARVAL EXPERIMENTAL"

ALUNO: LUCAS KRAEMER ROCHA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **25 de fevereiro de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Eduardo Torres

UERJ

Fernando Lopes

McGill University

Valdênia Souza

UFPE

Stefan Michael Geiger

UFMG

Ricardo Toshio Fujiwara - Orientador

UFMG

Remo Castro Russo - Coorientador

UFMG

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2022, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo José Lopes Torres, Usuário Externo**, em 04/03/2022, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefan Michael Geiger, Membro**, em 04/03/2022, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Lopes, Usuário Externo**, em 05/03/2022, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valdênia Maria Oliveira de Souza Barbosa, Usuária Externa**, em 22/03/2022, às 12:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1277813** e o código CRC **A6E6A509**.

Dedico este trabalho a todos os brasileiros.
Povo batalhador, sofrido e carente de um
bom governante que dê incentivo à
educação, ciência e tecnologia.

Agradecimentos

Entrei na UFMG em 2010 e aqui se tornou minha segunda casa. Apaixonei-me intensamente pela biologia e pela ciência. Como todo caso de amor, vivi altos e baixos, momentos de muita felicidade, aprendizado, amadurecimento e o principal, conheci pessoas sensacionais que posso chamar de família e vou levar no meu coração para resto da vida. Fazer ciência no Brasil não é fácil, também vivi momentos difíceis, recheados de frustrações e dúvidas sobre minha carreira e meu futuro, especialmente no doutorado, onde vivenciamos uma pandemia de COVID-19 sob a gestão do governo negacionista de Jair Bolsonaro. Fica aqui registrado meu descontentamento e minha tristeza com o descaso deste governo com toda a população. Mas como tudo é cíclico na vida, resta a esperança de uma vida mais digna para os brasileiros tão sofridos e batalhadores, com um governo que invista em educação, ciência e saúde. A carreira científica só é possível quando se tem muito amor, dedicação, resiliência e quando acreditamos que estamos contribuindo para uma vida com mais dignidade.

Agradeço à minha família por todo apoio, amor e compressão. Um agradecimento super especial aos meus pais Márcio e Ângela, que apesar de muitas dificuldades, sempre se sacrificaram para que a educação fosse o pilar mais importante da minha vida e dos meus amados irmãos Bruno e Júlia. Eu precisaria de várias vidas para conseguir agradecer o suficiente o que vocês fizeram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. MUITO OBRIGADO, AMO MUITO VOCÊS!! Um agradecimento mais que especial também à minha filha Lara. Veio ao mundo no meu primeiro ano de graduação e hoje está se tornando uma moça linda, inteligente e de personalidade brilhante. Minha fonte de amor e conforto, que me inspira e me motiva sempre a ser uma pessoa melhor, sem você não sou ninguém! TE AMO MUITO, MINHA LINDA FLOR!!

Aos meus amigos, minha segunda família, que compartilham comigo experiências incríveis, felicidade, amor e também os fardos que carregamos durante nossa jornada. Obrigado por existirem e me fazerem uma pessoa muito mais feliz e realizada.

Ao meu orientador Ricardo Fujiwara, pessoa incrível, que sabe acima de tudo, entender as individualidades de cada aluno e motivar a busca pela excelência com muito respeito, compreensão e dedicação. Defende seus alunos com uma energia

fraternal e sempre lutou para disponibilizar tudo que precisamos para fazer ciência de qualidade. Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar com você! O aprendizado e o amadurecimento pessoal que desenvolvi nesses anos não tem preço.

Ao meu coorientador Remo, professor-chefe do laboratório LIMP, parceiro de longa data, que considero um amigo. Trabalhamos juntos desde 2013 na iniciação científica e foi também meu orientador de mestrado. Aprendi desde cedo a ter um olhar científico crítico e nossa parceria rendeu diversos trabalhos, tenho muito orgulho de tudo que produzimos, tudo que aprendi e o tanto que somou na minha carreira científica. Não tinha melhor pessoa para ser meu coorientador e explorar mais um pedacinho da história do receptor ACKR2, agora em uma infecção por helminto. Muito obrigado por esses anos de aprendizado, trabalho, diversões, muita música e puxões de orelha!

À equipe do meu laboratório LIGP por toda a ajuda e parceria na realização deste projeto. Valorizo ainda mais as grandes amizades construídas que certamente levarei para resto da vida. O maior presente que a jornada acadêmica me proporcionou foi conhecer vocês! Um agradecimento especial à Michele e Vanessa, sem vocês nada disso seria possível. Obrigado pela paciência e compreensão durante todos esses anos, não deve ter sido fácil defender e disponibilizar tudo que fosse necessário para uma pessoa avoada e desorganizada como eu! Agradeço também às professoras Dani e Lilian, por todo o apoio e pelas discussões científicas que sempre foram muito relevantes para o meu aprendizado!

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia e todos os professores que o integram por todo o suporte sempre que precisei. Um agradecimento especial à Sibeles e Sumara por toda a dedicação e empenho na secretaria durante toda minha jornada.

Aos órgãos de fomento pelos recursos fornecidos, em meio tantas dificuldades, que possibilitou toda minha formação com excelência na Universidade Federal de Minas Gerais.

Muito obrigado!

“A sabedoria é a única riqueza que os tiranos não podem expropriar.”

Khalil Gibran

Resumo

A ascaridíase humana é uma geohelmintose distribuída globalmente e que afeta cerca de 500 milhões de pessoas, gerando grande impacto na saúde pública. É uma doença fortemente relacionada a precárias condições socioeconômicas e de saneamento básico. A infecção por *Ascaris* spp. apresenta uma fase aguda, caracterizada pela migração hepatopulmonar das formas larvais do parasito, e uma fase crônica, que ocorre após o estabelecimento do verme adulto no intestino delgado. A migração larval pelos órgãos do hospedeiro inicia uma intensa resposta inflamatória com participação de mediadores inflamatórios importantes como citocinas e quimiocinas. Quimiocinas são moléculas que desempenham um importante papel na biologia dos leucócitos, orquestrando a ativação e o recrutamento celular para os sítios inflamatórios por meio da ligação com seu receptor expresso na célula alvo. O receptor atípico de quimiocinas ACKR2, diferentemente dos receptores convencionais, é capaz de se ligar a quimiocinas pertencentes a família CC, internalizando seus ligantes e regulando negativamente os níveis de quimiocinas do meio extracelular. Porém, pouco se sabe sobre o papel desse receptor na ascaridíase. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o papel do receptor ACKR2 na ascaridíase larval experimental. Para tal, camundongos C57BL/6 WT e camundongos ACKR2^{-/-} foram submetidos a avaliação da carga parasitária, resposta inflamatória e fisiopatologia na primo e reinfecção por *A. suum*. Nossos resultados sugerem que o receptor ACKR2 possui um importante papel protetor na ascaridíase larval experimental, controlando a intensidade da inflamação e dano tecidual que contribuem para o controle do parasita. Animais deficientes para o receptor ACKR2 possuem um aumento do recrutamento leucocitário, aumento do exsudato proteico e hemorragia, piora da função pulmonar e deficiência no desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2/Th17, associada a uma maior lesão tecidual e maior carga parasitária quando comparados com animais selvagens. Portanto, este trabalho demonstra que o receptor ACKR2 é importante na regulação da inflamação e da resposta imune protetora, participando no controle da carga parasitária, na resposta imune inata e nos processos fisiopatológicos após primo e reinfecção por *Ascaris suum*.

Palavras-chave: ascaridíase, resoste imune, quimiocinas, receptor atípico de quimiocinas ACKR2.

Abstract

Human ascariasis is a globally distributed geohelminthosis that affects about 500 million people, impacting public health in endemic areas. This disease is strongly related to precarious socioeconomic conditions and basic sanitation. *Ascaris* spp. infection presents an acute phase characterized by hepatopulmonary migration of the larvae parasite, and a chronic phase, which occurs after establishment of adult worm in the small intestine. Larval migration through by host's organs initiates an intense inflammatory response with participation of important inflammatory mediators such as cytokines and chemokines. Chemokines are small molecules that play an important role in leukocyte biology by regulating cell activation and recruitment by binding to its receptor on the target cell. The atypical chemokine receptor ACKR2, unlike conventional receptors, is able to bind to chemokines of the CC family, internalizing their ligands and regulating the levels of chemokines in extracellular environment. However, little is known about the role of this receptor in larval ascariasis. Therefore, the objective of this work is to study the role of ACKR2 receptor involved in experimental larval ascariasis. For this purpose, wild C57BL/6 WT and ACKR2 KO mice were subjected to evaluation of parasitic load, inflammatory response and pathophysiology in the primo and reinfection by *A. suum*. Our results suggest that the ACKR2 receptor has an important protective role in experimental larval ascariasis. Deficient mice for ACKR2 receptor have an increased leukocyte recruitment, increased protein exudate and hemorrhage, impaired lung function, and did not develop the typical mixed Th1/Th2/Th17 immune response, which was associated with greater tissue damage and greater parasitic burden when compared to WT animals. Therefore, this work indicates that the ACKR2 receptor is important in regulation of inflammation and protective immune response, participates in control of parasitic burden, innate immune response and pathophysiological processes after primo and reinfection by *A. suum*.

Keywords: Ascariasis, immune response, chemokine, atypical chemokine receptor ACKR2.

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo biológico e formas evolutivas de <i>Ascaris</i> sp.	21
Figura 2: A importância de se estudar os helmintos parasitas e sua coevolução com os hospedeiros mamíferos	24
Figura 3: Ativação das respostas imunes inatas e adaptativas durante infecção por helmintos.....	26
Figura 4: Células T auxiliadoras e regulatórias	28
Figura 5: Receptores atípicos de quimiocinas.....	34
Figura 6: Principais eixos de quimiocinas ativados durante as infecções helmínticas.	39
Figura 7: Delineamento experimental.....	44
Figura 8: Avaliação da carga parasitária, resposta inflamatória nas vias aéreas, mecânica pulmonar e expressão do receptor ACKR2 no pulmão de camundongos C57BL6/J WT primo-infectados (1X), 8 dpi, e reinfectados (3X), com <i>A. suum</i>	56
Figura 9: Avaliação da carga parasitária e resposta inflamatória nas vias aéreas de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} primo-infectados, 8 dpi com <i>A. suum</i>	58
Figura 10: Avaliação da resposta inflamatória no parênquima pulmonar e mecânica pulmonar de camundongos C56BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} primo-infectados, 8 dpi com <i>A. suum</i>	61
Figura 11: Níveis de quimiocinas e citocinas no tecido pulmonar de camundongos C56BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} primo-infectados, 8 dpi com <i>A. suum</i>	62
Figura 12: Avaliação de quimiocinas sistêmicas, leucocitose no sangue periférico e análise histopatológica do fígado de camundongos WT e ACKR2 ^{-/-} primo-infectados, 8 dpi com <i>A. suum</i>	64
Figura 13: Avaliação da carga parasitária e resposta inflamatória nas vias aéreas de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} reinfectados 3X com <i>A. suum</i>	66
Figura 14: Avaliação da resposta inflamatória no parênquima pulmonar de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} reinfectados com <i>A. suum</i>	68
Figura 15: níveis citocinas no tecido pulmonar de camundongos C56BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} reinfectados com <i>A. suum</i> . Níveis pulmonares das citocinas IL-1β, IL-6, IL-12, IL-4 e IL-5 quantificadas pelo ensaio ELISA.....	69
Figura 16: Avaliação da leucocitose no sangue periférico e análise histopatológica do fígado de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} reinfectados com <i>A. suum</i>	71

Figura 17: Avaliação da carga parasitária no fígado e pulmão, leucocitose no sangue periférico nas vias aéreas de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} após quatro dias de infecção por <i>A. suum</i> ..	74
Figura 18: Avaliação da resposta inflamatória e análise histopatológica hepática de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} após quatro dias de infecção por <i>A. suum</i> ..	75
Figura 19: Avaliação da resposta inflamatória e mecânica pulmonar de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2 ^{-/-} após quatro dias de infecção por <i>A. suum</i>	77
Figura 20: Papel protetor do receptor atípico de quimiocinas na ascaridíase larval experimental.....	90

Lista de tabelas

Tabela 1: O sistema de quimiocinas.....	33
Tabela 2: Doze fatores que influenciam a tradução dos dados do sistema de modelo de laboratório de roedor-helminthos para a aplicação clínica	36
Tabela 3: Principais achados sobre o sistema de quimiocinas em infecções helmínticas.	38

Lista de abreviaturas

ACKR	Receptor atípico de quimiocinas
BSA	Albumina de soro bovino
CCR	Receptor de quimiocinas da família C
Cdyn	Complacência dinâmica
DALY	Anos de vida perdidos por incapacidade
EPO	Peroxidase eosinofílica
FRC	Capacidade residual funcional
GPCRs	Receptores transmembranas acoplados a proteína G
IC	Capacidade inspiratória
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IL-	Interleucina
ILC2	Células linfoides inatas do tipo 2
iNKT	Células T <i>natural killer</i> invariantes
MPO	Mieloperoxidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão salina-fosfato
RI	Resistência pulmonar
rpm	Rotações por minuto
RV	Volume residual
TGF-β	Fator de transformação do crescimento do tipo beta
Th1	Linfócitos auxiliares do tipo 1
Th17	Linfócitos auxiliares do tipo 17

Th2	Linfócitos auxiliares do tipo 2
TLC	Capacidade pulmonar total
TNF-α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
TSLP	Linfopietina estromal tímica
VC	Capacidade vital

Sumário

1 Introdução	18
1.1 Contextualização e epidemiologia.....	18
1.2 Taxonomia.....	19
1.3 Biologia.....	20
1.5 Resposta imune nas helmintíases.....	24
1.6 Resposta imune na ascaridíase	29
1.7 Quimiocinas e o receptor atípico de quimiocinas ACKR2	31
2 Justificativa	41
3 Objetivos	42
3.1 Objetivos Gerais	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 Materiais e métodos	43
4.1 Animais.....	43
4.2 Delineamento experimental.....	43
4.3 Obtenção e cultura de ovos de <i>Ascaris suum</i>	44
4.3 Infecção experimental	45
4.4 Procedimento de eutanásia.....	45
4.5 Avaliação da função pulmonar por espirometria	45
4.6 Recuperação do lavado bronco alveolar	46
4.7 Determinação da carga parasitária	47
4.8 Análise hematológica	47
4.9 Coleta e processamento do pulmão e fígado	48
4.10 Quantificação da atividade das enzimas MPO e EPO	48
4.11 Quantificação das enzimas TGO e TGP	49
4.12 Dosagem de proteínas totais e hemoglobina no BAL	49
4.13 Dosagem de citocinas, quimiocinas e IgA	50

4.14 Expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no tecido pulmonar por qRT-PCR.....	51
4.15 Análise histopatológica do pulmão e fígado	51
4.16 Análise estatística	53
5 Resultados	54
5.1 Caracterização da carga parasitária e da resposta inflamatória pulmonar em camundongos C57BL/6 após primo e reinfecção com <i>Ascaris suum</i> : participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2	54
5.2 Papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na primo-infecção por <i>Ascaris suum</i> no pico de migração larval no pulmão	57
5.2.1 O receptor ACKR2 está envolvido no controle da carga parasitária e na resposta inflamatória nas vias aéreas após primo-infecção por <i>A. suum</i>	57
5.3 Papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na reinfecção por <i>Ascaris suum</i>	65
5.3.1 O receptor ACKR2 está envolvido no controle da carga parasitária e na resposta inflamatória nas vias aéreas após reinfecção por <i>A. suum</i>	65
5.3.2 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na regulação dos processos inflamatórios e fisiopatológicos no parênquima pulmonar após reinfecção por <i>A. suum</i>	67
5.3.4 Exacerbação dos processos inflamatórios sistêmicos e hepáticos após reinfecção por <i>A. suum</i>	70
5.4 Papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na primo-infecção por <i>Ascaris suum</i> no pico de migração larval do fígado	72
5.4.1 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 está envolvido no controle da carga parasitária e na regulação da leucocitose sanguínea e das vias aéreas após quatro dias de infecção por <i>A. suum</i>	72
5.4.2 O receptor ACKR2 participa da regulação dos processos inflamatórios hepáticos após quatro dias de infecção por <i>A. suum</i>	74

5.4.3 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na regulação dos processos inflamatórios no parênquima pulmonar após quatro dias de infecção por <i>A. suum</i>	76
5.5 Sumário dos resultados.....	78
6 Discussão	79
7 Conclusão	90
8 Referências	91
9 Anexos	113
9.1 Anexo 1: Protocolo CEUA	113
9.2 Anexo 2: Chemokines and chemokine receptors: insights from human disease and experimental models of helminthiasis	114

1 Introdução

1.1 Contextualização e epidemiologia

Helminthos são organismos multicelulares que compreendem três diferentes grupos taxonômicos: Nematoda, Cestoda e Trematoda. Helminthiasas estão entre as infecções parasitárias mais comuns e persistentes no mundo. Recentes estudos sugerem que aproximadamente 1,5 bilhões de pessoas estão infectadas com helmintos parasitos, cerca de 20% da população humana (James et al., 2018). Dentro as helmintiasas, destacam-se as Geohelmintoses, que são parasitoses intestinais transmitidas por helmintos do filo Nematoda, que desenvolvem parte do seu ciclo biológico no solo, afetando diversas espécies de hospedeiros, inclusive o homem (Else et al., 2020; Lustigman et al., 2012).

Infecções por geohelmintos representam um importante problema de saúde pública e possuem grande impacto socioeconômico. Em 2010, a população mundial perdeu, aproximadamente, 5 milhões de anos de vida saudável devido infecções por geohelmintos, sendo que somente a ascaridíase contribuiu para a perda de 1,32 milhões de anos de acordo com o índice DALY (disability-life year), índice da Organização Mundial de Saúde que leva em consideração a soma dos anos de vida perdidos por morte prematura e o número de anos vividos com alguma deficiência (Jourdan et al., 2017; Pullan et al., 2014; World Health Organization, 2013). Entre as geohelmintoses mais relevantes se encontram ascaridíase, tricuriíase e ancilostomíase, sendo a ascaridíase a mais prevalente entre elas. (Hotez et al., 2014; Pullan et al., 2014).

A ascaridíase humana é considerada a doença tropical negligenciada mais prevalente no mundo, com ampla distribuição global, devido à associação entre altas taxas de prevalência e intensidade de infecção, com situações de pobreza e condições sanitárias precárias em países subdesenvolvidos de regiões tropicais (Hotez, 2008). Portanto, é uma doença que representa importante problema de saúde pública mundial, com grande impacto socioeconômico. Apresenta estimativa de aproximadamente 500 milhões de pessoas infectadas associado a um alto risco de desenvolverem alguma morbidade, sendo que ocorrem de 10-60 mil óbitos anualmente devido a morbidades graves (GBD, 2019; Hotez et al., 2014)

Diversos fatores de risco são relacionados com a alta transmissão da ascaridíase, como clima, condições do solo, pobreza, falta de saneamento básico e educação em saúde (Barreto et al., 2010; Brooker et al., 2006; Hotez et al., 2014). Portanto, as áreas rurais e de baixo desenvolvimento econômico, localizadas em países tropicais e subtropicais, destacam-se entre as regiões mais afetadas. Aproximadamente 173 milhões de pessoas estão infectadas na África subsaariana (25% da população) e, no sudeste asiático, a estimativa em algumas regiões é que o número de pessoas infectadas ultrapasse 60%. Na América Latina e Caribe, aproximadamente 86 milhões de pessoas estão infectadas (Pullan et al., 2014), sendo que, aproximadamente, 50% dessa incidência ocorre no Brasil, contabilizando 40 milhões de pessoas infectadas no ano de 2008 (Hotez, 2008; Hotez et al., 2014; Hotez & Kamath, 2009). De acordo com um estudo de revisão da Organização Pan-Americana de Saúde (Saboyá et al., 2011), entre 1995 a 2009 foram reportadas taxas de prevalência para *A. lumbricoides* acima de 50% em vários municípios do Brasil localizados nos estados de Alagoas (57,0%), Amazonas (51,2%), Maranhão (61,5 a 64,7%), Minas Gerais (57,8 a 65,5%), Paraná (73,0 a 88,0%), Pernambuco (79,3 a 80,3%) e Rio Grande do Sul (51,0%). Com relação ao hospedeiro, a idade também é um fator de risco, devido a intensidade parasitária e prevalência da doença em crianças na faixa etária entre 6 e 10 anos de idade (Martin et al., 1983).

1.2 Taxonomia

A ascaridíase é causada por helmintos nematódeos pertencentes ao filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, família Ascarididae e gênero *Ascaris*. O gênero *Ascaris* possui duas espécies descritas: *A. lumbricoides* (LINNAEUS, 1758), associada à infecção em humanos e *A. suum*, associado à infecção em suínos (GOEZE, 1782). Essa associação entre parasito e hospedeiro é baseada em observações epidemiológicas (Anderson et al., 1993) e experimentais (TAKATA, 1951). Entretanto, as duas espécies são consideradas morfologicamente e “biologicamente” indistinguíveis, exceto por uma diferença pequena nos dentículos dos vermes adultos (Barbosa, 2015; Sprent, 1952). Portanto, alguns trabalhos têm contestado essa classificação taxonômica, demonstrando elevada identidade genética entre as espécies (Leles et al., 2012; G. Liu et al., 2012), caráter zoonótico

de *A. suum* (Anderson & Jaenike, 1997; P. et al., 2005; TAKATA, 1951) e o potencial antroponozoonótico de *A. lumbricoides* (Galvin, 1968). Evidências também sugerem que as duas espécies podem ser patogênicas para ambos hospedeiros, sendo demonstrada a transmissão cruzada experimental (Barbosa, 2015; Takata, 1951), além de estudos epidemiológicos terem sugerido a ocorrência de transmissão cruzada natural (Barbosa, 2015; Betson et al., 2014; Nejsun et al., 2012). Estudos recentes realizaram análises filogenômicas comparativas, demonstrando que o cruzamento entre as duas espécies que *A. lumbricoides* e *A. suum* é responsável pela formação de um complexo genético que resulta em uma população híbrida de *Ascaris* (Easton et al., 2020; Zhou, Chen, et al., 2020; Zhou, Guo, et al., 2020).

1.3 Biologia

Os helmintos do gênero *Ascaris* apresentam um ciclo de vida monoxênico que envolve três estágios biológicos: ovos, larvas e vermes adultos. Os ovos férteis apresentam forma oval, com um tamanho aproximado de 30 a 40 µm de largura e 50 a 60 µm de comprimento, cor castanha devido aos pigmentos biliares contido nas fezes e um envoltório formado por três camadas: camada mamilonada localizada na porção mais externa do ovo, composta por mucopolissacarídeos, espessa e de superfície irregular; camada intermediária quitinosa e transparente; camada interna delgada composta por lipídeos (Khuroo, 1996).

Os vermes adultos são longos e cilíndricos, apresentam uma camada externa de quitina com cutícula anucleada secretada pelo epitélio adjacente. A boca abre-se na extremidade anterior e possui dentículos envoltos por três lábios. Apresentam um dimorfismo sexual bem característico: as fêmeas apresentam de 20 a 49 cm de comprimento e de 3 a 6 mm de diâmetro, com extremidade posterior retilínea; os machos apresentam de 15 a 30 cm de comprimento e de 2 a 4 mm de diâmetro (Khuroo, 1996).

A transmissão ocorre via oro-fecal, iniciando após a ingestão de ovos embrionados pelos hospedeiros susceptíveis. No intestino delgado, larvas infectantes L3 eclodem, migram para o ceco, penetram na mucosa do intestino grosso e são transportadas para o fígado via sistema vascular portal. As larvas iniciam uma

migração hepatopulmonar, atingindo o pico de migração hepática do terceiro ao quinto dia pós infecção. Posteriormente, as larvas alcançam novamente a circulação e migram pelo parênquima pulmonar, chegando aos alvéolos onde se desenvolvem até o estágio larval L4, denominado ciclo de Loss. O pico de migração larval no pulmão ocorre do sexto ao oitavo dia pós infecção. Após romperem os alvéolos, ascendem a árvore brônquica chegando à faringe, onde podem ser eliminadas pelas vias aéreas superiores ou deglutidas, retornando ao trato gastrointestinal. As larvas L4 chegando ao intestino delgado, atingem a maturidade sexual, tornam-se vermes adultos e iniciam o processo de reprodução. Após o acasalamento, as fêmeas liberam em média 240.000 ovos por dia, que são eliminados nas fezes do hospedeiro. Após um período de incubação dos ovos no solo, a larva sofre duas mudas até atingirem o estágio infectante L3 e, novamente, infectar um hospedeiro (Else et al., 2020; P. H. Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Khuroo, 1996) (Figura 1).

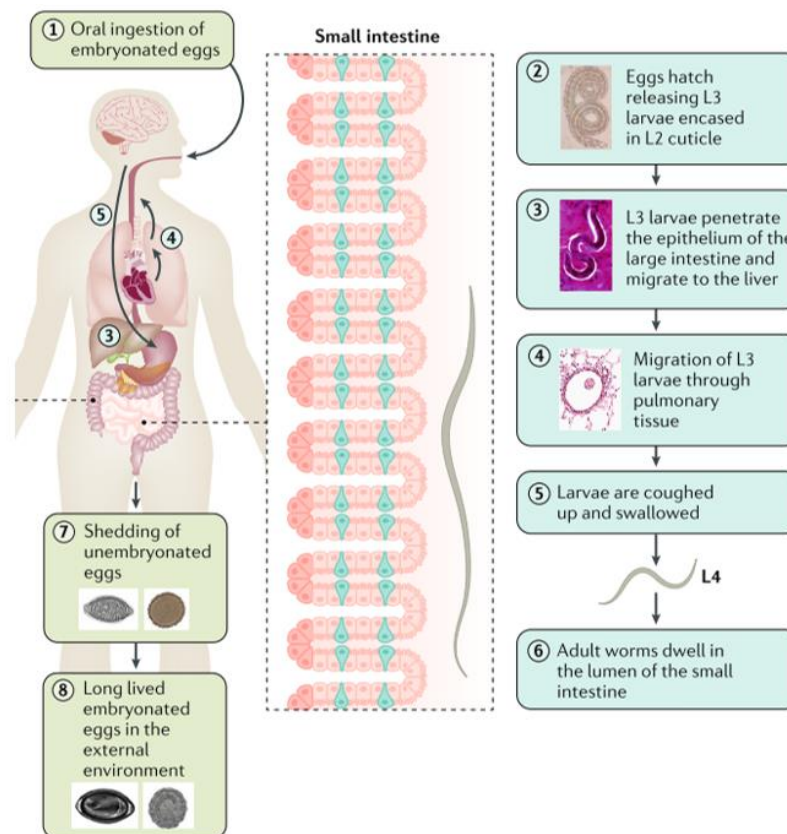


Figura 1: Ciclo biológico e formas evolutivas de *Ascaris* sp. Fonte: modificada de Else et al., 2020.

A ascaridíase humana pode ser dividida em duas fases distintas baseado em aspectos biológicos do parasito. A fase inicial é denominada ascaridíase aguda ou

larval e ocorre durante a fase de migração hepatopulmonar das formas larvais do agente etiológico da doença. A migração larval de *Ascaris* sp. pelo pulmão induz uma inflamação caracterizada por pneumonite eosinofílica (Akuthota et al., 2008), base para o diagnóstico da síndrome de Löffler (Löffler, 1956). Os sintomas respiratórios da doença incluem chiado, dispneia, tosse seca, escarro com presença de muco e dor torácica subesternal (Craig & Scott, 2014). Radiografias de tórax demonstram opacidades unilaterais ou bilaterais, transitórias, migratórias e não segmentares, de vários tamanhos (Gelpi & Mustafa, 1967, 1968; Phills et al., 1972). As complicações da fase aguda da doença geralmente estão associadas a infecções com alta carga parasitária e a migração larval atípica pode causar complicações em órgãos que não estão relacionados ao padrão migratório usual da larva, como a ascaridíase escrotal (Dey et al., 2012).

A fase crônica ocorre após o estabelecimento dos parasitos no intestino e a gravidade da doença está relacionada à intensidade da infecção, embora de forma não linear, tornando-se mais grave à medida que há um aumento da carga parasitária no hospedeiro (WHO, 1987; Soderberg et al., 2003). A patologia da ascaridíase humana na fase crônica se relaciona principalmente com anemia e desnutrição. Em crianças, a infecção leve a moderada está associada a um retardo no crescimento linear e desenvolvimento cognitivo (Chan, 1997; Crompton, 2001). Um estudo longitudinal avaliando os impactos dos geohelmintos demonstrou que infecções com carga moderada a alta de *Ascaris* sp. são um dos principais aspectos preditores de anemia e raquitismo na população de estudo (Ahmed et al., 2012). As complicações clínicas observadas nos indivíduos com alta carga parasitária (cerca de 8-15% dos infectados) são: distensão abdominal, náuseas, diarreias e, em casos mais graves, obstrução intestinal pelos vermes adultos, que pode ser fatal (Turner et al., 2018). Nos casos mais graves da doença, pode ocorrer casos de hematêmese (Ahmad et al., 2015), obstrução intestinal aguda ou subaguda (Azhar et al., 2015; Galzerano et al., 2010; Louw, 1966; Mwenda & Ilkul, 2013), apendicite (Louw, 1966), abscesso hepático (Chauhan et al., 2015), ascaridíase pancreática (Azhar et al., 2015; Galzerano et al., 2010; Louw, 1966) e biliar (Morano e Morano, 1988; Azhar et al., 2015; Galzerano; Sabatini; Duri, 2010). Concomitante com a infecção helmínticas em humanos é a redução da produtividade do trabalho em áreas globais que muitas vezes são atingidas pela pobreza, agravando assim o impacto na saúde pública da região e na

economia global (Else et al., 2020; Hotez et al., 2008). Por fim, estima-se que a doença é responsável pela morte de 20.000 pessoas anualmente (Khuroo, 1996) .

Atualmente, a ascaridíase humana é diagnosticada pela presença de ovos nas fezes do hospedeiro (Galvin, 1968). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a realização do teste de Kato-Katz para o diagnóstico doença, método que permite a quantificação de ovos de geohelmintos por grama de fezes humanas, determinando a intensidade da infecção, com simplicidade e baixo custo (WHO, 2002). Contudo, este teste possui algumas desvantagens como redução da eficácia nos casos de baixa intensidade de infecção (Knopp et al., 2008) e total ineficácia nos casos em que não há produção de ovos pelo parasito, durante o período pré-patente da infecção ou em infecções onde todos os parasitos pertencem ao mesmo sexo (Barbosa, 2015).

O tratamento químico para a ascaridíase possui elevado grau de eficácia para 5 drogas recomendadas pela OMS: Albendazol (dose única de 500mg), Ivermectina (dose de 50-200 µg/kg), Levamisole (2,5 mg/kg), Mebendazole (dose única de 500 mg) e Pirantel (dose de 10 mg/kg) (Ramsan et al., 1999; Tarafder et al., 2010; WHO, 1998). No entanto, apesar da eficácia das terapias anti-helmínticas, observa-se altas taxas de reinfecção e o aumento da resistência à essas drogas na população das áreas endêmicas (Anthony et al., 2007; McSorley & Maizels, 2012).

1.5 Resposta imune nas helmintíases

O sistema imunológico humano evoluiu ao longo dos anos e possui um papel importante de defesa contra um grande espectro de patógenos, incluindo microrganismos como vírus, bactérias, fungos, protozoários e outros patógenos, como ectoparasitos e helmintos. Cada um desses patógenos expõe nosso sistema imune a um estímulo diferente e, evolutivamente, nosso organismo desenvolveu diferentes mecanismos imunes de defesa especializados. Os helmintos parasitas coevoluíram com os hospedeiros mamíferos como endoparasitas com diferentes formas de transmissão e ciclos biológicos. Após a entrada no hospedeiro, os parasitas exibem órgão tropismo e podem migrar através de tecidos específicos, ativando o sistema imune do hospedeiro. Portanto, um mecanismo de defesa equilibrado entre suscetibilidade, resistência e patogênese, muitas vezes controla a infecção em curso ao invés de eliminar totalmente o parasita, limitando seus efeitos patológicos. Por outro lado, infecções helmínticas intensas podem levar a uma desregulação da resposta imune e, conseqüentemente, processos patológicos no hospedeiro (Allen & Maizels, 2011; Gazzinelli-Guimaraes et al., 2019; Hotez et al., 2008) (Figura 2).

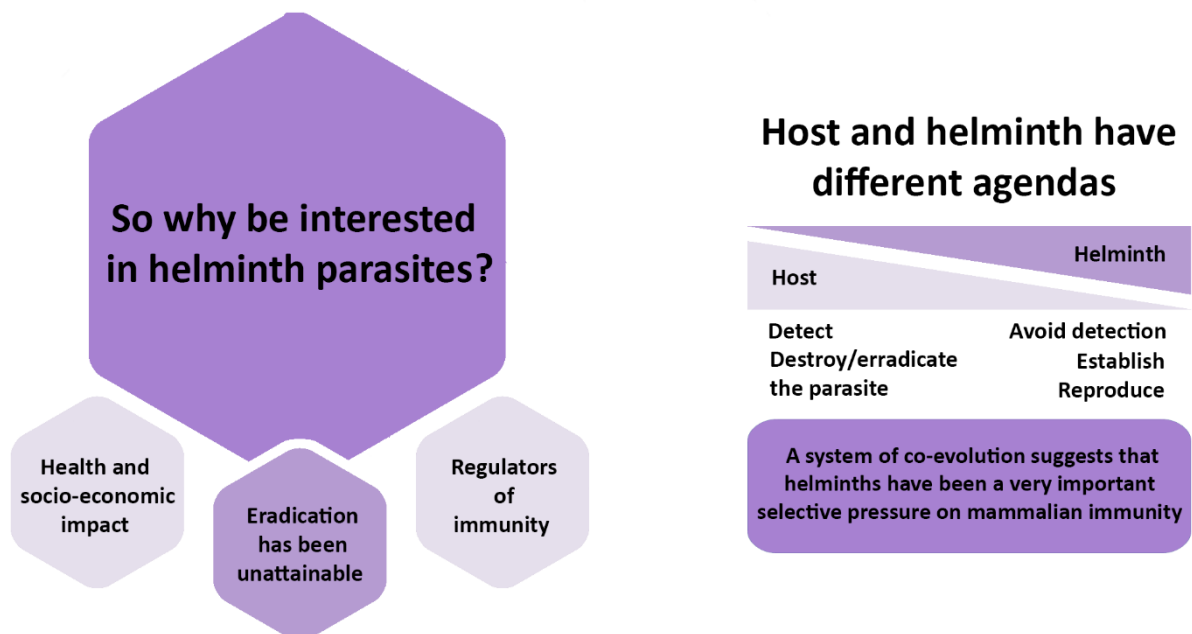


Figura 2: A importância de se estudar os helmintos parasitas e sua coevolução com os hospedeiros mamíferos. Fonte: Anexo 1.

A resposta imune durante infecções helmínticas envolve a resposta imune inata, incluindo a participação de células inatas e a produção coordenada de alarminas (IL-25, IL33, TSLP) e quimiocinas, além da resposta imune adaptativa, com a diferenciação de linfócitos *naive* em vários subconjuntos de células T efetoras. A comunicação entre as respostas imunes inatas e adaptativas ocorre com a participação de mediadores inflamatórios solúveis chamados de citocinas e quimiocinas, que são responsáveis pela ativação e recrutamento de leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos/macrófagos (Mo / MΦ), basófilos, eosinófilos, células dendríticas (DCs), mastócitos, células natural killer (NK), células linfoides inatas (ILC) e linfócitos (Anthony et al., 2007; Gazzinelli-Guimaraes et al., 2019; McSorley & Maizels, 2012). Neste sentido, o balanço entre as respostas Th2, Th9, TH17 e, em alguns casos Th1, além da ativação de células T regulatórias (Treg) e células T auxiliares foliculares (Tfh), é determinante para controle do parasito e da imunopatologia, que dependendo da intensidade da infecção, pode levar a uma resposta inflamatória exacerbada, comprometimento dos órgãos e tecidos parasitados, e até mesmo a morte do hospedeiro em casos graves de infecção. A natureza da resposta imune adaptativa é determinada pela espécie do parasito, ciclo biológico, tecidos e órgão afetados, intensidade e fase da infecção (aguda ou crônica) (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2019; Palucka & Banchereau, 1999).

Os helmintos parasitos são potentes indutores da resposta imune Th2, considerada a resposta imune protetora primária ativada durante as infecções helmínticas. É caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, responsáveis pela mudança de isotipo em células B para IgE e IgG1 (camundongos) ou IgG4 (humanos), hematopoese de eosinófilos e basófilos, expansão e ativação de macrófagos alternativamente ativados (AAMs) e mastócitos, além de hiperplasia de células caliciformes. Linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 2 (Th2) que expressam o fator de transcrição Gata-3 são importantes fontes produtoras dessas citocinas características da resposta do tipo 2, embora outras células do sistema imune inato, como mastócitos, basófilos, eosinófilos e células T *natural killer* invariáveis (iNKT) possam contribuir com a produção de IL-4 (Allen & Maizels, 2011; Anthony et al., 2007; Else et al., 2020; Finkelman et al., 1997).

O sistema imune inato além de antecipar e iniciar a resposta adaptativa Th2, também contribui acompanhando e reforçando as vias dessa resposta imune durante

o curso da infecção (Allen & Maizels, 2011). Infecções experimentais em camundongos, com helmintos que induzem uma resposta predominantemente Th2, contribuíram na identificação das alarminas IL-25, IL-33 e linfopietina estromal tímica (TSLP), secretadas por células epiteliais e importantes citocinas iniciadoras da resposta. A citocina IL-25 é produzida por células epiteliais e linfócitos do Th2 (Fort et al., 2001) em resposta à infecção, possuindo papel importante na proteção contra *Trichuris muris* (Owyang et al., 2006), *Nippostrongylus brasiliensis* (Price et al., 2010) e *Heligmosomoides polygyrus* (Zaiss et al., 2013). IL-33, um membro da família da IL-1, é também essencial para a proteção em resposta à infecção por vários helmintos. Esta citocina é armazenada no núcleo de células epiteliais em locais com função de barreira, como o epitélio, pulmão e intestino. Uma vez que lesionadas e induzidas a morte celular por necrose, essas células epiteliais secretam IL-33 que se liga ao seu receptor ST2 e ativa diversas células imunes, induzindo a produção de citocinas do tipo 2 pelas ILC2, linfócitos do tipo Th2, basófilos e mastócitos. (Ho et al., 2007; Matsuba-Kitamura et al., 2010; Schmitz et al., 2005). TSLP também é uma citocina importante na ativação de células imunes e diferenciação de linfócitos Th2, além de bloquear a produção de IL-12 pelas células dendríticas, limitando respostas do tipo 1 (Th1) (Harris & Loke, 2017; Massacand et al., 2009; Weatherhead et al., 2020) (Figura 3).

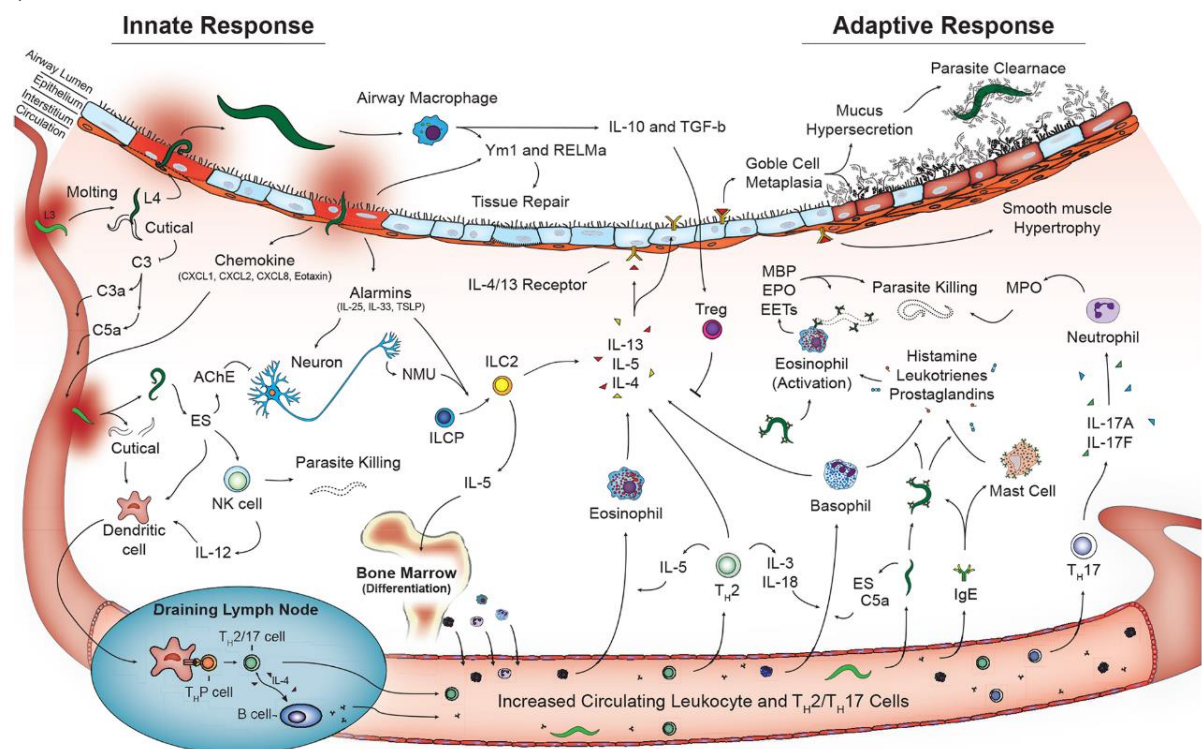


Figura 3: Ativação das respostas imunes inatas e adaptativas durante infecção por helmintos.
Fonte: Weatherhead et al., 2020.

Além da participação de células Th2, outros tipos de células T auxiliaadoras são importantes nas infecções helmínticas. OS linfócitos Tfh expressam o fator de transcrição BCL-6 e são cruciais para a regulação das respostas nos centros germinativos dos órgãos linfoides secundários (Haase & Voehringer, 2021; Meli et al., 2017). Os linfócitos Th1 expressam o fator de transcrição T-bet e podem desempenhar um importante papel nos estágios iniciais e na inflamação patológica de algumas helmintíases, como na fase aguda da esquistossomose e da infecção aguda por *Taenia crassiceps*. A resposta Th1 é caracterizada pela produção de IFN- γ e ativação de células imunes inatas, particularmente macrófagos (Anthony et al., 2007; Terrazas et al., 1999; Willms & Zurabian, 2010).

Os linfócitos Th9 foram recentemente caracterizadas pela produção de IL-9 e expressão dos fatores de transcrição PU.1 and IRF-4. A resposta imune Th9 tem sido associada com a eliminação de *Trichuris muris* e com a imunopatologia na esquistossomose, ambos em modelo murino (Weatherhead et al., 2020; Zheng et al., 2020), sendo então, necessários mais estudos para esclarecer o papel da resposta Th9 durante as infecções helmínticas em humanos. Outra resposta imune adaptativa importante é a Th17, caracterizada pela produção da citocina inflamatória IL17-A/IL-22/IL-23 e da quimiocina IL-8 (CXCL8). Os linfócitos Th17 expressam o fator de transcrição ROR γ t e estão envolvidas em várias condições inflamatórias neutrofílicas nos tecidos da barreira da mucosa, incluindo em infecções helmínticas (Ajendra et al., 2020; Hou et al., 2009; Mbow et al., 2013; D.S. Nogueira et al., 2016; Weaver et al., 2013). Por exemplo, a ativação da resposta Th17 em infecção por *N. brasiliensis* foi associada a uma produção inicial de IL-17A com consequente recrutamento de neutrófilos, lesão pulmonar e hemorragia, além da supressão da atividade de IFN- γ e da resposta imune Th2 (Ajendra et al., 2020; Schwartz et al., 2018).

Por fim, as infecções helmínticas podem induzir a expansão de linfócitos Treg, caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , atuando na imunidade protetora por meio da supressão da atividade das células T efetoras (Anthony et al., 2007; McSorley & Maizels, 2012). De maneira geral, as respostas Th2 são associadas à eliminação do

parasito e reparo tecidual, enquanto as respostas mistas Th1/Th17 são associadas à lesão tecidual e inflamação patológica (Figura 4). É importante ressaltar que os helmintos parasitos são macropatógenos e não podem ser fagocitados. Então, o sistema imune do hospedeiro utiliza da resposta humoral contra o parasito, por meio do mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA) para eliminar o parasito. CCDA ocorre quando células efetoras como eosinófilos e neutrófilos reconhecem anticorpos específicos ligados ao parasito, por exemplo IgE e IgG₁, resultando em um ataque citotóxico que promove a morte do helminto (Motran et al., 2018).

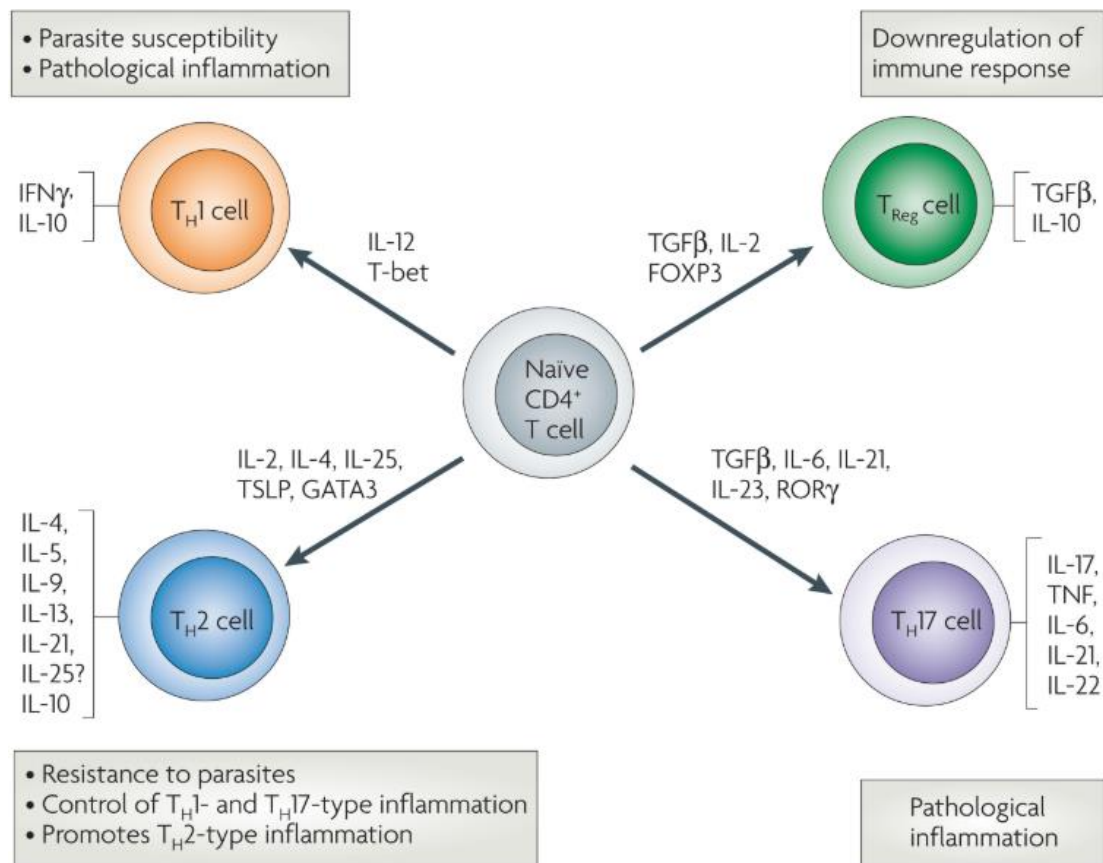


Figura 4: Células T auxiliaadoras e regulatórias. Fonte: Anthony et al., 2007.

1.6 Resposta imune na ascaridíase

A grande maioria dos estudos da ascaridíase humana são relacionados a fase crônica da doença, que ocorre após o estabelecimento dos vermes adultos no intestino delgado e, conseqüentemente, encontro de ovos nas fezes do hospedeiro. A principal razão disso é pelo fato que vermes adultos podem ser recuperados de humanos e porcos após administração de drogas anti-helmínticas, que resultam na eliminação dos parasitos do intestino. Além disso, os ovos podem ser dissecados do útero dos vermes adultos, detectados nas fezes por meio de procedimentos de diagnósticos e recuperados do meio ambiente (Holland et al., 2013). O padrão de resposta imune assemelha-se a de outras infecções crônicas por nematódeos gastrointestinais. É caracterizada pela participação das citocinas da resposta do tipo 2 e das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β , com elevados níveis séricos dos anticorpos IgG1, IgG4 e IgE, associado a uma eosinofilia periférica e tecidual (Bradley & Jackson, 2004). A presença dos vermes adultos estimula mecanismos protetores da mucosa como secreção de mucinas, aumento do peristaltismo da musculatura lisa intestinal, além de restringir a proliferação linfocitária e modular a atividade de citocinas característica da resposta imune Th1 (Bradley & Jackson, 2004; P. Cooper et al., 2001). Apesar dessa resposta polarizada do tipo 2 na fase crônica, Cooper e colaboradores (2004) demonstraram que não existem evidências de diminuição da expressão de citocinas características da resposta Th1, como o IFN- γ , em crianças infectadas provenientes de áreas endêmicas, sugerindo a ocorrência de uma resposta mista Th1/Th2, sobretudo na fase inicial (P. J. Cooper et al., 2004). Tal achado é análogo ao observado nas fases agudas de infecções experimentais por *Ascaris* spp., assim como em infecções naturais e experimentais por outros geohelmintos (P. J. Cooper et al., 2000; Fujiwara et al., 2006; P. H. Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Geiger et al., 2007).

Na ascaridíase larval, fase aguda da doença, larvas de *Ascaris* spp. migram para fígado e, posteriormente, para o pulmão, onde iniciam uma intensa resposta inflamatória. Contudo, há uma escassez de informações sobre o impacto da ascaridíase larval na saúde pública, devido às restrições éticas e logísticas no estudo dessa fase da doença, visto que as larvas só podem ser recuperadas após a morte do hospedeiro. Portanto, é de extrema importância a utilização de modelos animais para o estudo dos mecanismos de resposta imune presentes nas infecções por

Ascaris spp. (Holland et al., 2013). No entanto, não há um modelo experimental de ascaridíase em camundongos que demonstra o ciclo de vida completo do parasito. Sendo assim, os resultados presentes na literatura são referentes aos estágios iniciais da infecção e a migração hepatopulmonar das larvas de *Ascaris* spp. Estudos utilizando modelos experimentais murinos demonstraram que a migração das larvas pelo pulmão do hospedeiro induz uma resposta local inflamatória principalmente do tipo 2, associado a uma produção inicial de IL-5, seguido pelo aumento dos níveis de IL-4, IL-5, IL-6, IL-33, CCL11, CCL2, CXCL10, recrutamento de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares. (P. J. Cooper et al., 2000; Else et al., 2020; P. H. Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Maizels et al., 2012). Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2013) observaram que durante o pico de migração das larvas nos pulmões, por volta do oitavo dia pós infecção, a elevada produção de IL-6 foi correlacionada com o infiltrado de neutrófilos no tecido. Após a passagem das larvas pelo parênquima pulmonar, o infiltrado neutrofílico foi substituído por eosinófilos e células mononucleares, coincidindo com o aumento gradual de IL-4 e TNF- α (P. H. Gazzinelli-Guimarães et al., 2013). Além disso, Nogueira e colaboradores (2016) realizaram exposições múltiplas de *A. suum* e demonstraram que camundongos reinfectedos apresentaram redução da carga parasitária no pulmão associada a um aumento de celularidade no lavado bronco-alveolar (BAL), inflamação pulmonar granulocítica, com perfil misto de resposta imune Th2/Th17, caracterizado pela produção sérica das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 e TNF- α (Nogueira et al., 2016). Essa robusta resposta inflamatória durante a infecção por *Ascaris* spp. está associada a uma patologia pulmonar, caracterizada por persistente hiper responsividade das vias aéreas semelhante às doenças alérgicas como asma (Weatherhead et al., 2018). Além disso, observa-se uma piora na função pulmonar que é agravada após múltiplas exposições do parasito, mesmo observando uma proteção em relação à carga parasitária com a redução do número de larvas de *A. suum* após seguidas infecções (Nogueira et al., 2016).

1.7 Quimiocinas e o receptor atípico de quimiocinas ACKR2

O recrutamento de leucócitos para os tecidos é essencial na iniciação, manutenção e resolução dos processos inflamatórios do hospedeiro em resposta à infecção (Bachelierie et al. 2014; Nibbs & Graham, 2013). Para que ocorra esses movimentos coordenados dos leucócitos é importante que ocorra a indução da expressão de quimiocinas e seus respectivos receptores nas células alvos. (Griffith et al., 2014). Quimiocinas são pequenas moléculas (8-12 kDa), inicialmente descritas como citocinas quimiotáticas (Luster, 1998). Essas proteínas desempenham um importante papel fisiológico na biologia dos leucócitos e de outros tipos celulares, controlando a ativação e o recrutamento celular em estados basais e inflamatórios, bem como guiando os movimentos dos leucócitos. Participam dos mais diversos processos inflamatórios, tanto na imunidade inata quanto nas repostas imunes adaptativa (Bachelierie et al., 2014; Foxman et al., 1997; Mantovani, 1999; Russo et al., 2014).

O sistema de quimiocinas nos mamíferos é complexo e promíscuo, composto por um repertório de aproximadamente 50 ligantes e 20 receptores em humanos e camundongos, subdivididos em 4 grupos de acordo com a posição relativa dos dois resíduos de cisteína conservados adjacentes a região final amino-terminal da proteína: CXC, CC, CX3C e C, sendo a letra "C" referente a um resíduo de cisteína. A subfamília CC tem as duas primeiras cisteínas adjacentes. No grupo CXC, as duas primeiras cisteínas estão separadas por um aminoácido, sendo que alguns membros desta subfamília contêm um motivo antes da primeira cisteína amino-terminal, denominado ELR (Glutamato-Leucina-Arginina), o qual é responsável pela divisão em dois sub-grupos: quimiocinas CXC-ELR+ e CXC-ELR-. A subfamília CX3C é caracterizada por possuir duas cisteínas separadas por três aminoácidos, enquanto na subfamília C, a primeira cisteína é ausente (Bachelierie et al., 2014; Luster, 1998; Murphy et al., 2000; A. Zlotnik & Yoshie, 2000).

Há uma redundância funcional no sistema de quimiocinas: a maioria dos ligantes interagem com mais de um receptor, e a maioria dos receptores interagem com vários ligantes (Bachelierie et al., 2014; Bonecchi et al., 2009; Mantovani, 1999). Os receptores convencionais de quimiocinas pertencem a superfamília de receptores de sete domínios transmembranas pertencentes à classe A dos receptores acoplados

a proteína G (GPCRs) do tipo rodopsina. A sinalização mediada pela ligação quimiocina com seu receptor causa uma mudança conformacional na estrutura terciária deste receptor e subsequente endocitose, disparando sinais de ativação intracelular importantes para a migração e outras funções biológicas importantes da célula (Bachelierie et al., 2014, Griffith et al., 2014; Thelen & Stein, 2008). Por exemplo, o receptor CCR2 pode se ligar a várias quimiocinas da família CC, como CCL2, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13, CCL16. Por outro lado, o receptor CCR4 se liga apenas a CCL17 e CCL22, enquanto o único ligante conhecido para CXCR4, até o momento, é a quimiocina CXCL12 (Bachelierie, et al., 2014; Griffith et al., 2014; Russo et al., 2010; Sokol & Luster, 2016) (Tabela 1).

As quimiocinas podem ser amplamente definidas como quimiocinas inflamatórias (induzidas) ou homeostáticas (constitutivas) de acordo com sua função em determinado contexto. Quimiocinas inflamatórias como CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, CCL11, CCL24, CCL26, CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 são expressas normalmente em níveis insignificantes, mas após uma lesão tecidual ou infecção, são produzidas rapidamente e atuam no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Por outro lado, quimiocinas homeostáticas como CCL19, CCL21 e CXCL13, expressas no endotélio sanguíneo e linfático, são importantes na migração de linfócitos e células dendríticas para órgãos linfoides (Bachelierie et al., 2014; Griffith et al., 2014; Locati et al., 2002).

Chemokine	Other names	Receptor	Key/main immune function ^b
CXCL1	GRO α , MGSA, mouse KC	CXCR2	Neutrophil trafficking
CXCL2	GRO β , MIP-2 α , mouse MIP2	CXCR2	
CXCL3	GRO γ , MIP-2 β	CXCR2	
CXCL4	PF4	?	Procoagulant
CXCL5	ENA-78, mouse LIX	CXCR2	Neutrophil trafficking
CXCL6	GCP-2 (no mouse)	CXCR1, CXCR2	
CXCL7	NAP-2	CXCR2	
CXCL8	IL-8 (no mouse)	CXCR1, CXCR2	
CXCL9	Mig	CXCR3	Th1 response; Th1, CD8, NK trafficking
CXCL10	IP-10	CXCR3	
CXCL11	I-TAC	CXCR3	
CXCL12	SDF-1	CXCR4	Bone marrow homing
CXCL13	BLC, BCA-1	CXCR5	B cell and Tfh positioning LN
CXCL14	BRAK	?	Macrophage skin homing (human)
Cxcl15	Lungkine (mouse only)	?	?
CXCL16		CXCR6	NKT and ILC migration and survival
CCL1	I-309, mouse TCA3	CCR8	Th2 cell and Treg trafficking
CCL2	MCP-1, mouse JE	CCR2	Inflammatory monocyte trafficking
CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5	Macrophage and NK cell migration; T cell-DC interactions
CCL4	MIP-1 β	CCR5	
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	
Ccl6	C-10, MRP-1 (mouse only)	Unknown	?
CCL7	MCP-3, mouse Fic or MARC	CCR2, CCR3	Monocyte mobilization
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 (human); CCR8 (mouse)	Th2 response; skin homing (mouse)
Ccl9/10	MIP-1 γ , MRP-2 (mouse only)	Unknown	?
CCL11	Eotaxin-1	CCR3	Eosinophil and basophil migration
Ccl12	MCP-5 (mouse only)	CCR2	Inflammatory monocyte trafficking
CCL13	MCP-4 (no mouse)	CCR2, CCR3, CCR5	Th2 responses
CCL14	HCC-1 (no mouse)	CCR1	?
CCL15	Leukotactin-1, HCC-2, MIP-5 (no mouse)	CCR1, CCR3	?
CCL16	HCC-4, NCC-4, LEC (no mouse)	CCR1, CCR2, CCR5	?
CCL17	TARC	CCR4	Th2 responses, Th2 cell migration, Treg, lung and skin homing
CCL18	PARC, DC-CK1 (no mouse)	CCR8	Th2 response; marker AAM, skin homing
CCL19	ELC, MIP-3 β	CCR7	T cell and DC homing to LN
CCL20	MIP-3 α , LARC	CCR6	Th17 responses; B cell and DC homing to gut-associated lymphoid tissue
CCL21	SLC, 6CKine	CCR6, CCR7	T cell and DC homing to LN
CCL22	MDC	CCR4	Th2 response, Th2 cell migration, Treg migration
CCL23	MPIF-1, MIP-3 (no mouse)	Unknown	?
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2	CCR3	Eosinophil and basophil migration
CCL25	TECK	CCR9	T cell homing to gut; thymocyte migration
CCL26	Eotaxin-3	CCR3, CX3CR1	Eosinophil and basophil migration
CCL27	CTAK	CCR10	T cell homing to skin
CCL28	MEC	CCR3, CCR10	T cell and IgA plasma cell homing to mucosa
XCL1	Lymphotactin α , SCM-1 α	XCR1	Cross-presentation by CD8 ⁺ DCs
XCL2	Lymphotactin β , SCM-1 β (no mouse)	XCR1	
CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1	NK, monocyte, and T cell migration

Tabela 1: O sistema de quimiocinas. Fonte: modificada de Griffith et al., 2014.

O sistema quimiocina também apresenta um grupo de receptores atípicos de quimiocinas (ACKRs), que se assemelham estruturalmente com os receptores convencionais, mas utilizam uma via de sinalização alternativa, que não desencadeia a sinalização clássica de ativação celular, devido a uma modificação na segunda porção intracelular do receptor, em um domínio conhecido como DRYLAIV.

Portanto, ao contrário dos demais receptores de quimiocinas, estes receptores atípicos se ligam e sequestram seus ligantes específicos, exercendo uma importante função *scavenger*, degradando e reduzindo progressivamente os níveis das quimiocinas do meio extracelular, realizando, assim, uma regulação negativa sobre as quimiocinas inflamatórias (Bachelierie et al., 2014). Atualmente são descritos na literatura quatro receptores atípicos de quimiocinas: ACKR1 (DARC); ACKR2 (D6); ACKR3 (CXCR7); ACKR4 (CCX-CKR) (Bachelierie et al., 2014; de la Torre et al., 2005; Lee et al., 2013; Mantovani et al., 2001; Nibbs & Graham, 2013) (Figura 5).

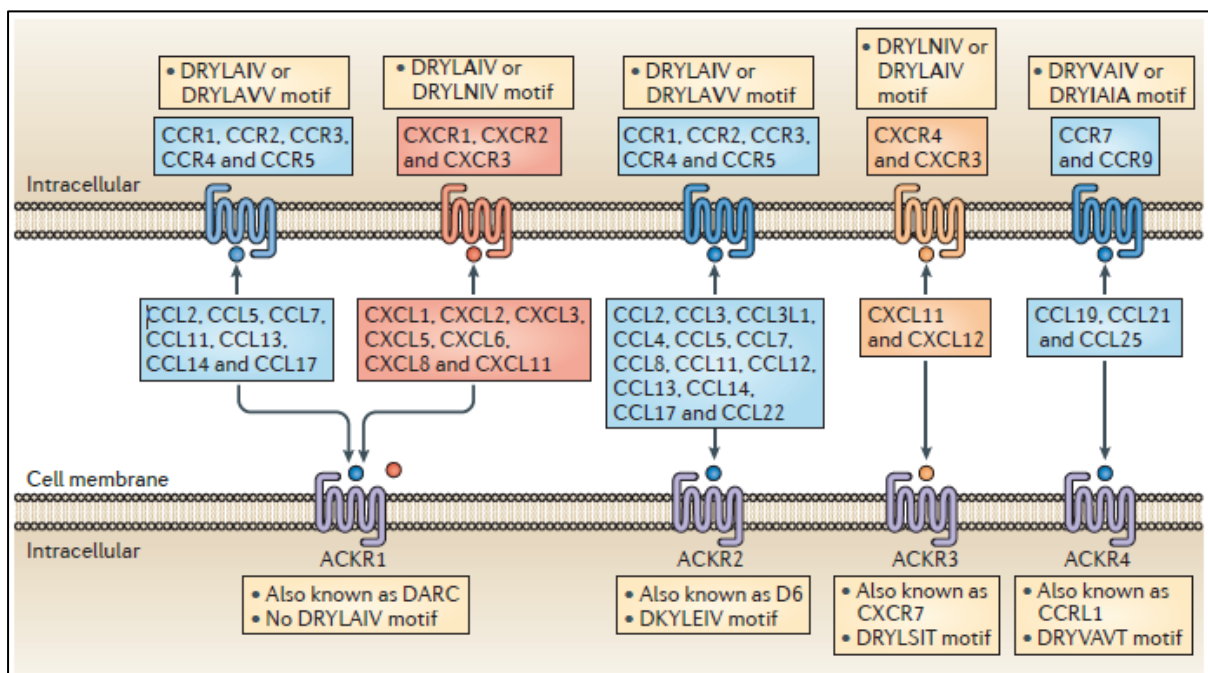


Figura 5: Receptores atípicos de quimiocinas. Fonte: Nibbs & Graham, 2013.

O receptor atípico de quimiocinas ACKR2, anteriormente conhecido como D6, foi identificado e caracterizado por Nibbs e colaboradores (1997). Esse receptor é capaz de se ligar a um amplo painel de quimiocinas inflamatórias da família CC reconhecidas pelos receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR4 e CCR5, internalizando

seus ligantes e realizando o *clearance* de quimiocinas do meio extracelular (Nibbs et al., 1997). O receptor ACKR2 é expresso principalmente nas células endoteliais dos vasos linfáticos da pele, intestino e pulmão; trofoblastos da placenta e alguns leucócitos como macrófagos alveolares e células B inatas (Bachelierie et al., 2014; Nibbs et al., 1997, 2001). Estudos utilizando camundongos deficientes para o receptor ACKR2 (ACKR2^{-/-}) demonstram que a ausência deste receptor desencadeia uma resposta inflamatória desregulada na pele parecida com psoríase (Jamieson et al., 2005). No intestino a resposta inflamatória em modelo experimental de colite também se mostrou alterada em camundongos ACKR2^{-/-} (Bordon et al., 2009). Outro estudo utilizando animais ACKR2^{-/-} mostrou que a deficiência nesse receptor está associada com a dificuldade de resolução da inflamação pulmonar (Whitehead et al., 2007). Além disso, estudo com infecção experimental de *Mycobacterium tuberculosis* mostrou que o receptor ACKR2 é importante no controle da resposta inflamatória sistêmica. A ausência desse receptor em camundongos infectados levou a um aumento dos níveis das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, com consequente aumento no recrutamento de macrófagos e linfócitos, associado a uma maior taxa de mortalidade dos animais e lesão tecidual (Liberto et al., 2008).

Muito do nosso conhecimento sobre o sistema imune tem sido facilitado pelo estudo em modelos animais, principalmente em camundongos. Estudos em camundongos são realizados para investigar todos os aspectos da resposta imune, incluindo imunidade mediada por células, a resposta humoral, imunidade inata e adaptativa, o tráfego e o papel das células efetoras, o papel dos mediadores inflamatórios (por exemplo, citocinas e quimiocinas), a resposta imune protetora contra agentes infecciosos e o desenvolvimento de vacinas. Além disso, os animais também são usados para modelar e mimetizar várias condições inflamatórias em humanos, como infecções agudas e crônicas, doenças crônicas e autoimunes, além de testes de medicamentos e vacinas para o tratamento e prevenção de diversas doenças (Russo et al., 2010). O papel das quimiocinas e de seus receptores é avaliado principalmente por meio de modelos experimentais, que permitem o uso de ferramentas como *knockout* genético, anticorpos neutralizantes e antagonistas dos receptores de quimiocinas (Russo et al., 2010). Apesar da importância dos modelos murinos na investigação dos mecanismos da resposta imune, bem como o papel das quimiocinas nas infecções por helmintos, alguns fatores relevantes inerentes que

influenciam a tradução dos dados do sistema de modelo de laboratório de roedor-helmintos para a aplicação clínica devem ser levados em consideração para melhor interpretação e compreensão da infecção humana (ver **Tabela 2**). Em contraste, a maioria dos estudos em humanos envolve a mensuração de quimiocinas no plasma e no soro para avaliar sua participação em uma variedade de condições patológicas, e essa abordagem sofre por ser associativa e não identificar estritamente as relações de causa-efeito.

Infection Paradigm	
1	Mice are typically given a bolus infection; people are more likely to get low dose infection or trickle infection over time (acute or protracted).
2	Experiments typically assess infection with a single species of helminth, whereas individuals in areas of endemic helminth infection are likely to be (or have been (see #3)) infected with other parasites (protozoan or helminth) or microbial pathogens (viral, bacterial fungal).
3	Laboratory mice have no history of infection, whereas from birth humans experience viral and bacterial infections that educate the immune system.
Individual Parameters	
4	Genetics – comparison of inbred strains of mice with ‘identical’ genomes with genetic heterogeneity in human populations.
5	Differences in the microbiome.
6	Age and Sex: while not exclusive, studies in mice have predominantly used males in an 8–16-week-old age range.
7	Host Health–specific pathogen-free (SPF) healthy mice are used in model studies whereas helminth-infected individuals may have a range of co-morbidities (e.g., diabetes, obesity) that will affect immunity.
8	Medication – individuals can be on a range of medications (see #7) that can modulate the immune response to infection with helminth parasites.
The Immune System	
9	Putative differences in immune cell subtypes and immune receptor expression (innate immunity receptors, cytokine receptors, chemokine receptors).
The Environment	
10	Mice are housed in a 12h:12h light:dark cycle in a temperature-controlled sanitized environment; helminths are endemic in poor world regions often with poor sanitation and perhaps limited access to clean water (see #s 2 & 3).
11	Mice have free access to a standardized balanced chow diet, whereas humans range from obese to malnourished with variable intake of essential vitamins and minerals that affect immune development and activity.
12	Stress and the release of hormones and steroids vary widely in humans whereas animal housing facilities aim to reduce/eliminate stress in housed rodents.

Tabela 2: Doze fatores que influenciam a tradução dos dados do sistema de modelo de laboratório de roedor-helmintos para a aplicação clínica. Fonte: Anexo 1.

As quimiocinas tem sido associadas a várias doenças e modelos experimentais com um importante componente inflamatório, como câncer (da Silva et al., 2017; Levina et al., 2009; Soria & Ben-Baruch, 2008), fibrose pulmonar (Russo et al., 2009, 2018), artrite (Charo & Ransohoff, 2006; Coelho et al., 2008), sepse (Castanheira et al., 2018; Cummings et al., 1999), obesidade (Gerhardt et al., 2001; Lumeng et al., 2007), asma (Mattos et al., 2020), e infecções por diversos patógenos (Bozza et al., 2021; Hamed et al., 2021; Lee T-H. et al., 2021; Matt et al., 2021; Pollenus et al., 2021; Tavares et al., 2020; Wang et al., 2021).

Diversos trabalhos têm estudado o sistema de quimiocinas no contexto de doenças helmínticas e seus principais achados podem ser visto na **Tabela 3**. Contudo, com base na especificidade parasita-hospedeiro, diferenças metodológicas dos modelos experimentais e cinética de produção das quimiocinas após infecção, é um desafio realizar afirmações generalizadas relacionadas ao papel das quimiocinas nas helmintíases. De modo geral, as infecções por helmintos induzem uma liberação inicial das quimiocinas inflamatórias CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL24, CCL26, CXCL8, CXCL1 e CXCL2 que são responsáveis pela ativação e recrutamento de células imunes inatas, incluindo monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas imaturas (iDCs), células NK, basófilos, entre outros. Neutrófilos, células NK e, ocasionalmente, eosinófilos possuem a capacidade de matar o parasita diretamente, logo no início da infecção. Além da ativação de eixos característicos de quimiocinas da resposta imune Th2, como CCL17/CCL22-CCR4 e CCL11/CCL24/CCL26-CCR3, a presença do parasita no tecido e seus antígenos excretados induzem a expressão do receptor CCR7 em células dendríticas em maturação (mDCs), que migram para os linfonodos via CCL19 e CCL21, quimiocinas cruciais para um desenvolvimento eficiente dos diversos tipos de respostas imunes adaptativas. A ativação das respostas Th1, Th2, Th17 e Treg resulta no recrutamento de leucócitos e amplifica a resposta inflamatória no tecido, resultando na eliminação do parasita e na imunopatologia associada à infecção (Figura 6). Informações mais detalhadas a respeito do papel das quimiocinas durante as infecções helmínticas estão presentes no **Anexo 1**, artigo de revisão produzido durante o doutoramento.

Chemokine axis	Key target	Main findings in helminth infections
CCL1-CCR8	Mo, MΦ, thymocyte, Th2 cells, T cells, NK	↑ CCL1 ↑CCR8 expression in ILC2 and T cells ILC2 expansion and maintenance Th2 immune response Expansion and maintenance of ILC2 Parasite elimination
CCL2-CCR2	Mo, MΦ, T cells, NK	↑ CCL2 Macrophage infiltration Granuloma formation Fibrosis Th2 immune response <i>T. muris</i> elimination
CCL3/CCL5-CCR1/CCR5	Mo, MΦ, T cells, NK, DCs	↑CCL3 ↑CCL5 (most helminthiasis) ↓CCL3 ↓CCL5 (strongyloidiasis) CCR1: ↑morbidity ↑granuloma ↑parasite burden CCR5: ↓mortality rate ↓liver pathology ↓granuloma ↑Treg
CCL11/CCL24/CCL26-CCR3	Eo, Ba, Mast	↑CCL11 ↑CCL24 ↑CCL26 Th2 immune response Eosinophil infiltration Parasite elimination ↑CCL24: eosinophilic meningitis ↑CCL11 ↑CCL24: schistosomal myeloradiculopathy ↑CCL11: pulmonary granuloma formation
CCL17/CCL22-CCR4	Th2 cells, Treg cells, Th17 cells	↑CCL22 ↑CCL17 Th2 immune response ↑CCR4 expression Aggressive Th2 pulmonary granulomatous response Fibrosis Eosinophilia Parasite elimination
CCL19/CCL21-CCR7	T cells, B cells, DCs	↑CCL19 ↑CCL21: B and T cells accumulation liver ↓CCL19 ↓CCL21: B and T cells loss in the spleen ↑CCR7 expression
CXCL8-CXCR1/CXCR2 CXCL1/CXCL2-CXCR2	Neu, Mo, NK, Ba, Mast cells	↑CXCL1 ↑CXCL2 ↑CXCL8 Neutrophil infiltration Th17 immune response Granuloma formation Parasite elimination
CXCL9/CXCL10/CXCL11-CXCR3	Th1 cells, NK, DCs, B cells	↑CXCL9 ↑CXCL10 (ascariasis) ↓CXCL9 ↓CXCL10 (trichuriasis) Dynamic expression or no production (schistosomiasis) ↑CXCL9 ↑CXCL10: antifibrotic role (schistosomiasis)
CXCL13-CXCR5	T cells, B cells, DCs	↑CXCR5 expression Tfh cell response Th2 immune response ↑CXCL13: B and T cells accumulation liver ↓CXCL13: B and T cells loss in the spleen

Tabela 3: Principais achados sobre o sistema de quimiocinas em infecções helmínticas.

Fonte: Modificada do Anexo 1.

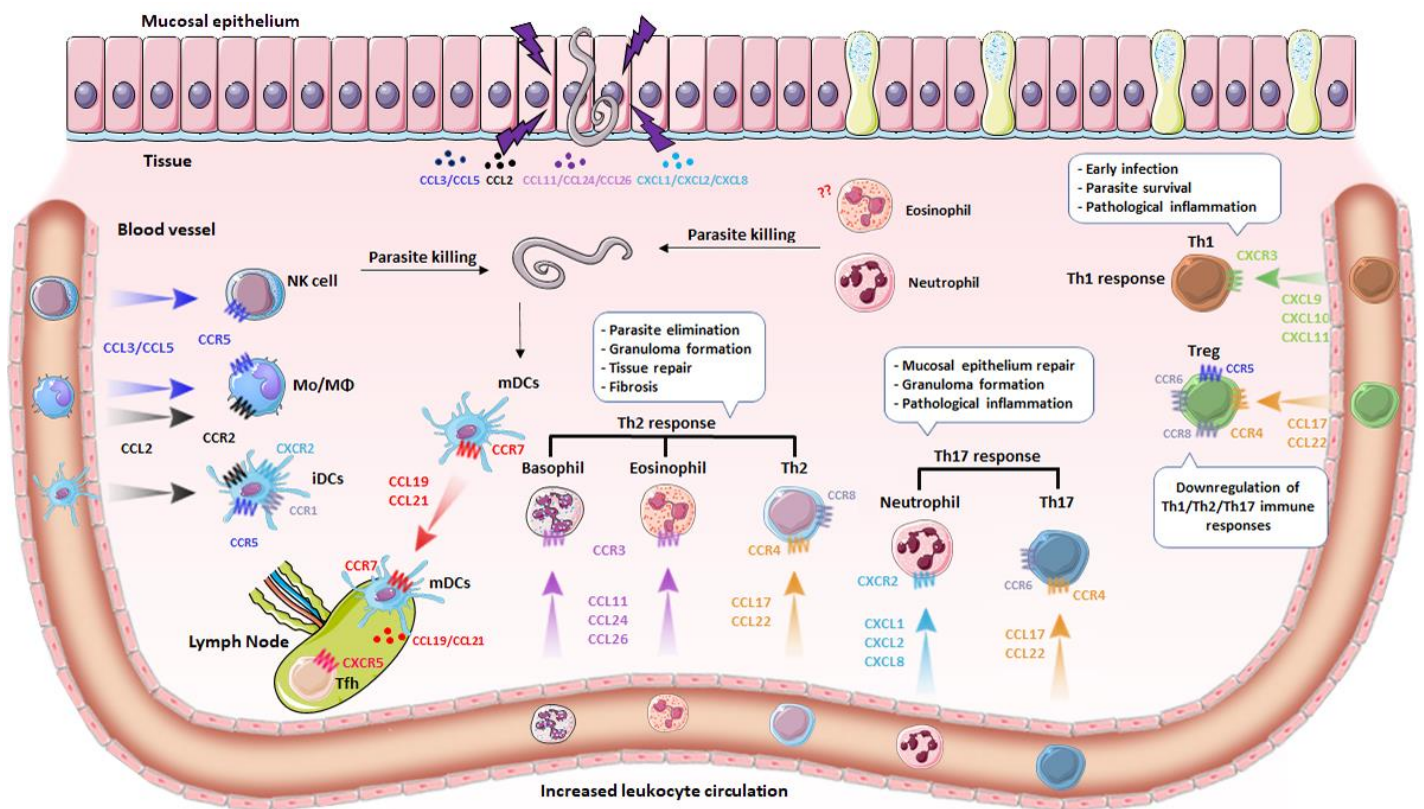


Figura 6: Principais eixos de quimiocinas ativados durante as infecções helmínticas. Fonte: Anexo 1.

Alguns estudos também demonstraram a participação das quimiocinas durante a ascaridíase. Gazzinelli-Guimarães et al. mostraram um aumento das quimiocinas CCL2, CCL5, CCL11 e CXCL10 nos pulmões de camundongos após primo-infecção com *A. suum* (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2019). Camundongos imunizados via intraperitoneal com proteína alergênica derivada de extrato de vermes adultos *A. suum* (APAS-3) desenvolveram uma resposta imune do tipo 2, caracterizada por aumento dos níveis de eosinófilos, IL-4, IL-5, CCL5, CCL11 e hiper responsividade nas vias aéreas, juntamente com aumento dos níveis plasmáticos de IgE (Itami et al., 2005). Além disso, a expressão de CCL11 e CCL26 também foi aumentada nos pulmões de suínos infectados com *A. suum*. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado um aumento na expressão de CCL17 e CCL22 no fígado desses animais infectados, além do aumento da produção dessas quimiocinas *in vitro* por macrófagos alveolares de porcos infectados (Dawson et al., 2009). Na ascaridíase humana, células

mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos infectados com *A. lumbricoides* desafiadas *in vitro* com antígeno do verme foram capazes de produzir CCL24. Curiosamente, a produção dessa quimiocina só foi observada em PBMCs de adultos e idosos, enquanto não foi observada em recém-nascidos e crianças (Lechner et al., 2013). Por fim, um estudo recente demonstrou que CCL24 foi o gene mais positivamente regulado em macrófagos estimulados com soro de porcos infectados com *A. suum* e soro de humanos infectados com *A. lumbricoides* CCL24 (Coakley et al., 2020). No entanto, o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 permanece desconhecido nas infecções helmínticas, sobretudo na ascaridíase.

2 Justificativa

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013), aproximadamente um quinto da população mundial está infectada por *Ascaris* spp. e mais da metade está sob risco de infecção. A ascaridíase é a doença tropical negligenciada mais prevalente no mundo, atingindo principalmente comunidades mais pobres e crianças em idade escolar. Devido sua relevância epidemiológica, possui grande impacto na saúde pública, vida social e economia (Brooker et al., 2006).

Os tratamentos disponíveis atualmente são com quimioterápicos que visam a eliminação do verme adulto (WHO, 1998). Apesar da eficácia das drogas anti-helmínticas, a erradicação das helmintíases parece ser um cenário distante devido às altas taxas de reinfecção em áreas endêmicas, a falta de vacinas eficazes e o aumento resistência ao tratamento anti-helmíntico. Complementarmente, não há tratamento disponível para a ascaridíase na fase larval, onde a migração de larvas causa uma importante inflamação pulmonar com prejuízos para o hospedeiro. Sendo assim, mais estudos relacionados aos mecanismos imunológicos da interação parasito-hospedeiro são necessários para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam minimizar seus efeitos nocivos nas populações mais prejudicadas.

O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 tem sido associado a diversas doenças e modelos experimentais que possuem um significativo componente inflamatório. No entanto, até o momento não há nenhum trabalho na literatura avaliando o papel do receptor ACKR2 nas infecções helmínticas. Considerando o importante papel do ACKR2 na regulação da resposta inflamatória aguda e crônica, este trabalho realizado contribuirá para o conhecimento relacionado à função regulatória do ACKR2 e sua relevância no contexto da resposta imune em doenças helmínticas, sobre tudo na ascaridíase.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Estudar o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 relacionado aos mecanismos imunológicos e fisiopatológicos da ascaridíase larval experimental, tanto na primo-infecção quanto na reinfecção por *Ascaris suum*, utilizando camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos deficientes para o receptor ACKR2.

3.2 Objetivos Específicos

- i) Avaliar a expressão do receptor ACKR2 na primo e reinfecção experimental por *A. suum* em camundongos C57BL/6 selvagens;
- ii) Avaliar a carga parasitária da primo e reinfecção experimental por *A. suum* em camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos ACKR2^{-/-};
- iii) Caracterizar o perfil leucocitário nas vias aéreas e no soro na primo e reinfecção experimental por *A. suum* em camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos ACKR2^{-/-};
- iv) Avaliar a fisiopatologia pulmonar, a inflamação pulmonar e hepática da primo e reinfecção experimental por *A. suum* em camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos ACKR2^{-/-};
- v) Analisar o perfil de citocinas pulmonares Th1, Th2 e Th17 na primo e reinfecção experimental por *A. suum* em camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos ACKR2^{-/-};

4 Materiais e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e camundongos machos deficientes para o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 (ACKR2^{-/-}), que possuem como fundo genético camundongos C57Bl/6, obtidos no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia da UFMG. Todos os animais estavam pesando entre 20-25g e foi realizado um *n* de aproximadamente 6 animais por grupo experimental. Durante o período de experimentação, os animais foram mantidos em micro isoladores de polipropileno Alesco® no biotério do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, localizado no departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG. Os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura, umidade e ciclo claro/escuro de 12 horas, além de livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos foram avaliados e realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFMG (CEUA - UFMG) sob o protocolo 175/2020 (Anexo 1).

4.2 Delineamento experimental

Os protocolos de infecções seguiram padronização proposta por estudos prévios (P. H. Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Denise Silva Nogueira et al., 2016), considerando que após quatorze dias de infecção não são encontradas larvas nos órgãos dos animais e que, o quarto e o oitavo dia pós-infecção são os picos de migração larval no fígado e no pulmão, respectivamente.

Camundongos WT e ACKR2^{-/-} foram divididos em três grupos experimentais: não-infectados (NI), primo-infectados (1X) e reinfectados (3X). Os animais do grupo NI receberam apenas PBS, animais do grupo 1X foram infectados com 2500 ovos larvados de *A. suum* no dia 0, e animais do grupo 3X foram infectados 3 vezes com 2500 ovos larvados de *A. suum* com intervalo de 14 dias entre as infecções. Os animais do grupo 1X foram eutanasiados após 4 e 8 dias de infecção, e os animais do grupo 3X foram eutanasiados 8 dias após a última infecção (Figura 7).

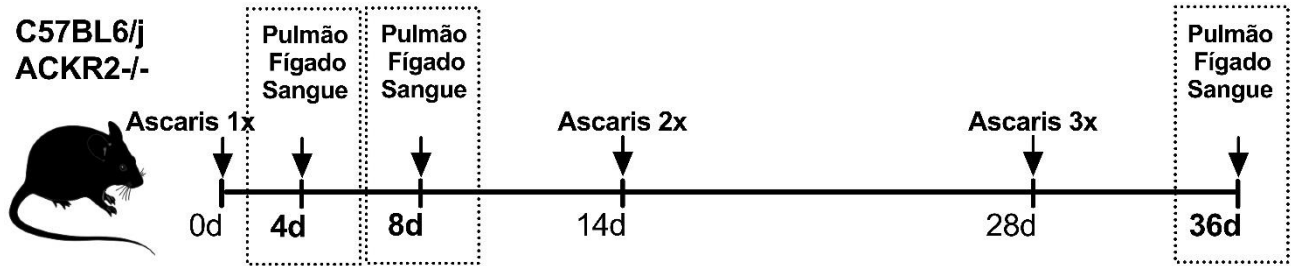


Figura 7: Delineamento experimental.

4.3 Obtenção e cultura de ovos de *Ascaris suum*

Vermes adultos fêmeas de *A. suum* foram recuperados de carcaças intestinais descartadas e doadas por um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Após levados para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos da Universidade Federal de Minas Gerais, os úteros dos parasitos foram dissecados. Os ovos isolados por maceração mecânica foram purificados por filtração em telas de nylon de 100 μm . A identificação e comprovação da espécie em questão foram confirmadas pelo uso de um conjunto de iniciadores espécie-específico desenvolvido pelo nosso grupo no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos e patenteados pela Universidade Federal de Minas Gerais (Composição, Processo, Uso e Kit para identificação e diferenciação molecular de duas espécies do gênero *Ascaris* - BR 102013008846).

Os ovos isolados foram cultivados para embrionamento em garrafas de cultura contendo 50 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 0,2 M) e mantidos em estufa a 26 °C em incubadora do tipo BOD (SP 50 RDE 35 Super) por até 400 dias, agitados manualmente três vezes por semana para oxigenação dos ovos. O percentual de embrionamento foi determinado a partir da contagem do número de ovos em microscópio óptico (Boes *et al.*, 1998).

4.3 Infecção experimental

Uma alíquota da cultura de ovos de *A. suum* foi centrifugada por 10 minutos, a 800 g, temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* ressuspendido em solução de hipoclorito de sódio 5% e incubado durante 2 horas em estufa climatizada (37°C e 5% CO₂) para rompimento da camada externa dos ovos e, conseqüentemente, facilitar a eclosão das larvas. Após essa incubação, a lavagem dos ovos deu-se pela adição de água filtrada e nova etapa de centrifugação semelhante à descrita acima, repetida por quatro vezes. Após a última centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em água filtrada e essa suspensão utilizada para o protocolo experimental de infecção.

Na primo infecção, modelo que se assemelha com a fase mais inicial e aguda da doença, os camundongos foram inoculados por gavagem com 0,2 mL da solução contendo 2.500 ovos embrionado, e depois com 0,1 mL de água filtrada para remover os ovos remanescentes na seringa e agulha, como descrita por Lewis colaboradores (2006). Nos grupos de reinfecção, modelo que se assemelha com a fase crônica da doença, os animais foram inoculados três vezes, no intervalo de 14 dias cada infecção, pelo mesmo procedimento descrito acima.

4.4 Procedimento de eutanásia

Os camundongos foram anestesiados com injeção subcutânea de Cetamina (130 mg/kg) e Xilazina (8.5 mg/kg), em solução fisiológica, para realização dos procedimentos de mecânica pulmonar, coleta de tecidos e coleta de sangue. Posteriormente, foi realizada a eutanásia dos animais por hipovolemia através da coleta de sangue da veia cava inferior.

4.5 Avaliação da função pulmonar por espirometria

Para a avaliação da função pulmonar, logo após a anestesia os camundongos foram traqueostomizados. Para tanto, a traqueia foi exposta removendo-se, cuidadosamente, a glândula submaxilar e a camada muscular que envolve a traqueia.

Uma pequena incisão foi feita na traqueia para permitir a entrada do cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 mL de espaço morto) e os animais foram colocados em um plestimógrafo conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems©, Wilmington, North Carolina USA).

Uma vez no plestimógrafo, os animais foram submetidos a uma frequência de respiração média de 160 inspirações por minuto até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração (Vanoirbeek et al.,2010). Durante a respiração mecânica foi detectada a resistência pulmonar (RI). Para determinar a capacidade residual funcional (FRC), a ventilação foi parada ao final da expiração com um fechamento imediato da válvula localizada próximo ao tubo endotraqueal. A respiração espontânea contra a válvula fechada e a conseqüente variação da pressão na caixa torácica foram utilizadas para calcular o FRC pela lei de Boyle. Para determinar a capacidade pulmonar total (TLC) e o volume residual (RV), foram realizadas manobras de pressão-volume quasi-estática. Os pulmões foram inflados até uma pressão padrão de +30 cm H₂O e, então, a pressão será diminuída, lentamente, até uma pressão negativa de -30 cm H₂O, determinando a curva pressão-volume (PV), capacidade inspiratória (IC) e capacidade vital (VC). Após as manobras mecânicas, o TLC e o RV foram calculados indiretamente pelas equações $TLC = IC + FRC$ e $RV = TLC - VC$. A complacência quase-estática pulmonar na pressão de +10 cm H₂O. Todas as manobras subótimas foram descartadas e, para cada teste realizado em cada animal, pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos.

4.6 Recuperação do lavado bronco alveolar

O lavado bronco alveolar (BAL) foi realizado com o objetivo de recuperar os leucócitos presentes no espaço alveolar. Após realizados os testes no plestimógrafo, os animais foram eutanasiados por hipovolemia, como descrito acima. A traqueia exposta dos animais foi canulada com um cateter de polipropileno de 1,7mm. O lavado foi realizado pela injeção de duas alíquotas de 1 mL de tampão salina-fosfato estéril (PBS 1X), injetadas e recolhidas 3 vezes cada, obtendo-se aproximadamente 2,0 ml

de volume final recuperado do lavado, formando um *pellet* de células que foi utilizado para contagem total e diferencial de leucócitos. O líquido recuperado foi centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi congelado para posterior análises. O *pellet* do BAL foi ressuspenso em 100 µL de PBS-BSA 3% e diluído 10 vezes em uma solução de Turk. Dessa solução de células foi colocado 10 µL na câmara de Neubauer e, então, realizada a contagem total de leucócitos na objetiva de 40X. Para a contagem diferencial de leucócitos, lâminas foram preparadas para uma citocentrifugação (Cytospin 3, Shandon) e coradas por um kit de panótico rápido (Laborclin). As contagens diferenciais foram realizadas em microscópio óptico com a objetiva de 100X, utilizando-se óleo de imersão.

4.7 Determinação da carga parasitária

A quantificação da carga parasitária foi realizada por meio da recuperação das larvas no pulmão e fígado. Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram manualmente picotados e colocados no aparelho de Baermann-Moraes modificado em solução de PBS para incubação por 4 horas a 37°C. Após esse período, todo o material sedimentado foi coletado e fixado em formaldeído 4%, seguido de contagem total das larvas presentes em microscópio óptico.

4.8 Análise hematológica

A coleta de sangue foi realizada no dia da eutanásia de todos os camundongos após a anestesia. Basicamente, 500 µL de sangue foram coletados da veia cava inferior, utilizando uma seringa de 1 mL, e transferido para tubos contendo anticoagulante EDTA. A contagem global de leucócitos foi realizada por contador hematológico automático Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de microscópio óptico, em lâminas de esfregaço sanguíneo corado por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL), até contabilizar 100 células. O número absoluto de cada população celular foi calculado a partir do número global de leucócitos.

4.9 Coleta e processamento do pulmão e fígado

Após a realização do BAL, os pulmões dos animais foram perfundidos com 5 mL de PBS 1X pelo ventrículo direito do coração, removendo-se o sangue do leito vascular pulmonar, seguido de extração do pulmão e fígado. O pulmão direito foi congelado para dosagem de EPO, MPO, citocinas e quimiocinas, e o pulmão esquerdo foi utilizado para realização das lâminas histológicas. Foi realizada, também, a extração do fígado para dosagem de EPO, MPO e análise histopatológica. Foram pesados 100 mg do pulmão e do fígado, e homogeneizados em 0.9 mL de uma solução para extração de citocinas e quimiocinas (NaCl 0.4 M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0.1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0.05%, 0.5% de BSA, 20 KI aprotinina), numa relação de 10% peso/volume e, posteriormente, centrifugados a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi congelado e o *pellet* ressuspensionado em 2 mL de tampão fosfato (0.1 M NaCl, 0.02 M NaPO₄, 0.015 M NaEDTA; pH 4.7) e homogeneizado; 1,5 mL de NaCl 0.2% foi adicionado e homogeneizado novamente; 1,5 mL de NaCl 1.6% com 5% de glicose foi adicionado, homogeneizado e vortexado. Estas amostras foram centrifugadas a 4° C, por 15 minutos, a uma velocidade de 10.000 rpm e o sobrenadante foi posteriormente descartado. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas e homogeneizadas em 0.8 mL de tampão fosfato (0.05 M Na₃PO₄, 0.5% HETAB; pH 5.4), congeladas em nitrogênio líquido e então descongeladas, sendo este processo repetido por 3 vezes. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 4° C, por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático.

4.10 Quantificação da atividade das enzimas MPO e EPO

Foram realizados ensaios enzimáticos para avaliar a atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) e a mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos. Para o ensaio de MPO, após o processo de lise térmica realizado no nitrogênio líquido, 25 µL das amostras foram adicionadas em placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 25 µL do reagente 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração de 1,6 mM e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Ao final desta etapa foi adicionado 100 µL de H₂O₂ diluído em tampão fosfato

(0.05 M Na_3PO_4 , 0.5% HTAB; pH 5.4), numa concentração final de 0,003%, e a placa foi novamente incubada por 5 minutos a 37°C. Após a incubação, a reação foi parada pela adição de 100 μL de H_2SO_4 1M e a leitura da absorbância foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 450 nm.

Para o ensaio de EPO, após a lise térmica, 75 μL das amostras foi adicionado à placa de 96 poços. Em seguida, 75 μL da solução de substrato (OPD 0,1 mM em tampão Tris-HCl 75mM, H_2O_2 6,6 mM; pH 8) foi colocado na presença das amostras. A reação ocorreu por 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. A reação foi, então, parada pela adição de H_2SO_4 1M e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) com filtro para 492 nm.

4.11 Quantificação das enzimas TGO e TGP

Foram realizados ensaios enzimáticos para avaliar a atividade das enzimas TGO e TGP, como indicador de lesão hepática. Os ensaios foram realizados através da adaptação de kit comercial (Bioclin Quibasa), seguindo as instruções do fabricante. O volume de plasma utilizado foi de 10 μL por amostra para cada ensaio.

4.12 Dosagem de proteínas totais e hemoglobina no BAL

As concentrações das proteínas totais presentes no BAL foram determinadas pelo método do ácido bicinônico usando kit comercial (BCA, Sigma-Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. Foi realizado uma curva padrão, utilizando BSA, e os valores de densidade óptica (OD) obtidos a 562 nm foram interpolados na curva para se determinar a concentração de proteínas dessas amostras.

As concentrações de hemoglobina foram dosadas por método colorimétrico utilizando cianometahemoglobina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm contra solução de Drabkin, modificada (Labtest Diagnóstica). O padrão de hemoglobina (Labtest Diagnóstica) foi utilizado para

preparação de uma curva padrão, com o objetivo de se determinar a concentração das mesmas.

4.13 Dosagem de citocinas, quimiocinas e IgA

As dosagens de citocinas, quimiocinas e IgA presentes no trabalho foram realizadas pelo ensaio de ELISA sanduíche, seguindo-se as instruções do fabricante (R&D Systems, EUA). De modo geral, microplacas de 96 poços (Nunc Maxi Sorb) foram cobertas com anticorpo de captura (citocinas e quimiocinas) ou extrato de verme adulto (IgA), diluídas em tampão carbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35 mM, NaN_3 3.1 mM; pH 9,5) e incubados overnight. Após a incubação, a placa foi lavada com PBS suplementado com 0,05% de Tween20 e, então, foi feito o bloqueio das reações inespecíficas utilizando soluções de bloqueio (PBS-BSA 1%) por 1 hora. Posteriormente, 50 μL das amostras foram pipetados e incubados overnight. Após a incubação, a placa foi lavada para retirar o excesso das amostras, e foram adicionados os respectivos anticorpos de detecção, nas concentrações recomendadas, por mais 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução de estreptavidina por 30 minutos. As placas foram novamente lavadas com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução reveladora (OPD) da atividade da peroxidase por mais 30 minutos. A reação foi, então, bloqueada com a adição de 50 μL de solução de bloqueio H_2SO_4 2N e a leitura da absorbância determinada logo em seguida em 492 nm em espectrofotômetro (VersaMax ELISA, Molecular Devices, EUA). As concentrações das amostras foram expressas em pg/mL de sobrenadante a partir da análise da curva padrão através do software SOFTmax PRO 6.3 (Molecular Devices Corp.).

4.14 Expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no tecido pulmonar por qRT-PCR

Os lóbulos superiores direito do pulmão dos animais C57BL/6j WT foram utilizados para verificar o nível de expressão do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no tecido pulmonar. Para analisar a expressão do receptor no tecido, 100 mg de pulmão dos animais foram utilizados para extração de RNA. Os tecidos foram homogeneizados juntamente com reagente TRIzol™ (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop para o cálculo de concentração, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA total. As amostras de RNAs foram então utilizadas para os experimentos de qRT-PCR. A síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada com o kit Hig-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado no aparelho Applied Biosystems 7500, usando TaqMan (Invitrogen) associada com iniciadores específicos: CCBP2 (ACKR2) – Mm00445551_m1, lote: 1097925 e 18S: Hs99999901_s1, lote: 1245488; seguindo orientações do fabricante. Para análise de expressão de ACKR2 em tecido pulmonar foi utilizado o gene 18S como gene de referência. A média dos valores de Ct foram usados para calcular a expressão relativa do transcrito de RNA mensageiros sobre a quantidade total de 18S, através do cálculo de $2^{(-\Delta\text{Ct})}$.

4.15 Análise histopatológica do pulmão e fígado

Após a coleta do fígado e pulmão, as amostras foram fixadas em formol a 4%, desidratados em diluições alcólicas crescentes, diafanizados em xilol, infiltrado e incluído em parafina. Foram obtidos cortes com 4 μm de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e confeccionadas lâminas para análises histopatológica e semiquantitativa. As lesões exibidas no parênquima pulmonar e hepático foram descritas quanto a intensidade das lesões, inflamação, e fenômenos vasculares. Para análise semiquantitativa das lesões presentes no parênquima pulmonar, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de Imagem (Motic 2.0). Para o score da inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular e inflamação do parênquima,

foram capturadas 20 imagens aleatórios por animal com aumento de 20X. O score foi baseado na metodologia descrita previamente por Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2018), baseado em 6 graus para inflamação das vias aéreas sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas (ausente); grau 1 algumas vias aéreas possuem um pequeno número de células (discreto); grau 2 algumas vias respiratórias possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria das vias aéreas possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 a maioria das vias aéreas estão significativamente inflamadas (intensa); grau 5 todas as vias aéreas estão completamente inflamadas (grave). Do mesmo modo, o score foi baseado em 6 graus para inflamação perivascular sendo: grau 0, ausência de células inflamatórias em torno dos vasos (ausente); grau 1, alguns vasos possuem um pequeno número de células inflamatórias (discreta); grau 2, alguns vasos possuem inflamação significativa (moderada); grau 3, a maioria dos vasos possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4, a maioria dos vasos estão significativamente inflamados (intenso); grau 5, todos os vasos estão completamente inflamados. Por último, o score para inflamação do parênquima foi baseado em 6 graus sendo: grau 0, igual a menos que 1% do parênquima afetado; grau 1, de 1 a 9% do parênquima afetado; grau 2, de 10 a 29% do parênquima afetado; grau 3, de 30 a 49% do parênquima afetado; grau 4, de 50 a 69% do parênquima afetado; grau 5, mais de 70% do parênquima afetado.

Para o score das lesões hepáticas foram digitalizadas 20 imagens aleatórios por animal com aumento de 20X. A gravidade da lesão hepática foi avaliada através de score baseado em 4 graus para lesão do parênquima hepático: grau 0, ausência de células inflamatórias em torno dos hepatócitos, vasos sanguíneos, ductos biliares e capilares; grau 1, regiões do parênquima hepático com pequeno número de células inflamatórias; grau 2, parênquima hepático apresentando focos de infiltrado inflamatório, bem como infiltrado inflamatório perivascular e em torno dos ductos, áreas de moderadas de necrose dispersas pelo parênquima; grau 3, parênquima hepático apresentando infiltrado inflamatório difuso e multifocal, exuberantes focos inflamatórios, exuberantes áreas de necrose dispersas pelo parênquima.

4.16 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc., EUA). O teste de Grubb foi utilizado para detectar os possíveis *outliers* nas amostras. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados. Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T Student para dados paramétricos e Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Para análises de variâncias entre três ou mais grupos foi utilizado o teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (dados paramétricos), ou o teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns (dados não-paramétricos). Todos os testes foram considerados significativos quando o valor de p foi igual ou inferior a 0,05.

5 Resultados

5.1 Caracterização da carga parasitária e da resposta inflamatória pulmonar em camundongos C57BL/6 após primo e reinfecção com *Ascaris suum*: participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2

Primeiramente, foi realizada a caracterização da carga parasitária e da resposta inflamatória pulmonar causada pela primo-infecção com 2500 larvas de *A. suum*, no pico de migração larval do pulmão (8 d.p.i.), e após três infecções com 2500 larvas de *A. suum*, com intervalo de quatorze dias, em camundongos C57BL/6J selvagens (WT), modelo experimental padronizado pelo nosso laboratório anteriormente, que se assemelha a fase aguda (primo-infecção) e crônica (reinfecção) da ascaridíase (Figura 8A). Como esperado, podemos constatar a presença de larvas no pulmão dos camundongos do grupo primo-infectado (1X) e, após a reinfecção com o parasito (3X), observamos uma proteção em relação à carga parasitária, observado pela redução no número de larvas recuperadas, tanto no parênquima pulmonar quanto nas vias aéreas (BAL) (Figura 8B).

Em relação aos processos de exsudação de proteínas e hemorragia, causados pela passagem da larva no tecido associado ao processo inflamatório gerado, observamos um aumento dos níveis de proteína total tanto no grupo primo-infectado quanto reinfectedo. Por outro lado, observamos aumento de hemoglobina nas vias aéreas apenas dos camundongos do grupo 1X, com diminuição dos níveis de hemoglobina após seguidas infecções (Figura 8C). Ao avaliar o recrutamento leucocitário para as vias aéreas, houve um aumento no número de neutrófilos nos animais primo infectados. Nos animais do grupo 3X, observamos um aumento intensificado de células totais, caracterizado pelo aumento tanto de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos no BAL (Figura 8D).

Com o objetivo de avaliar a função pulmonar dos animais infectados por *A. suum*, foi realizado análises da mecânica pulmonar dos camundongos por meio da técnica de espirometria forçada, que detecta diferentes parâmetros fisiológicos nos pulmões de camundongos: (i) avaliação da perda de volume pulmonar em função da lesão tecidual, causada principalmente por edema e espessura das vias aéreas, demonstrado pela Capacidade Inspiratória; (ii) avaliação das propriedades elásticas

do tecido pulmonar, tratando-se da capacidade de expansão do pulmão, mensurada pela medida de Complacência Dinâmica; (iii) avaliação do Volume Expiratório Forçado a 50 msec (FEV 50), volume exalado durante os primeiros 50 milissegundos de uma manobra expiratória forçada respectivamente, iniciada a partir do nível de Capacidade Pulmonar Total e (iv) avaliação do grau de obstrução ao fluxo de ar medidas pela Resistência Pulmonar (RI), que é a resistência do trato respiratório ao movimento do fluxo de ar durante a inspiração e expiração normais, e índice de Tiffeneau (FEV/FVC), medida que expressa o volume de ar expirado em determinado tempo (FEV) sobre a capacidade vital forçada (FVC). Portanto, após realizar as manobras de espirometria forçada nos camundongos, observamos alterações na função pulmonar nos animais após a primo e reinfecção por *A. suum*. Essas alterações refletem na redução de medidas de volume e elasticidade pulmonar devido aos processos inflamatórios no tecido. A piora da função pulmonar foi mais acentuada em relação ao índice de Tiffeneau e resistência pulmonar nos animais do grupo 3X em relação ao grupo 1X. Por outro lado, encontramos uma piora mais acentuada em relação a capacidade inspiratória e complacência dinâmica nos animais do grupo 1X em relação ao grupo 3X (Figura 8E).

Por fim, com o objetivo de avaliar a participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na ascaridíase larval experimental, realizamos ensaios de PCR em tempo real e observamos um aumento da expressão desse receptor no pulmão de camundongos WT após infecção por *A. suum*, representado por um aumento expressivo nos camundongos do grupo 3X (Figura 8F). A partir desse conjunto de dados, os resultados sugerem uma participação do receptor ACKR2 na resposta imune durante a infecção experimental por *A. suum*.

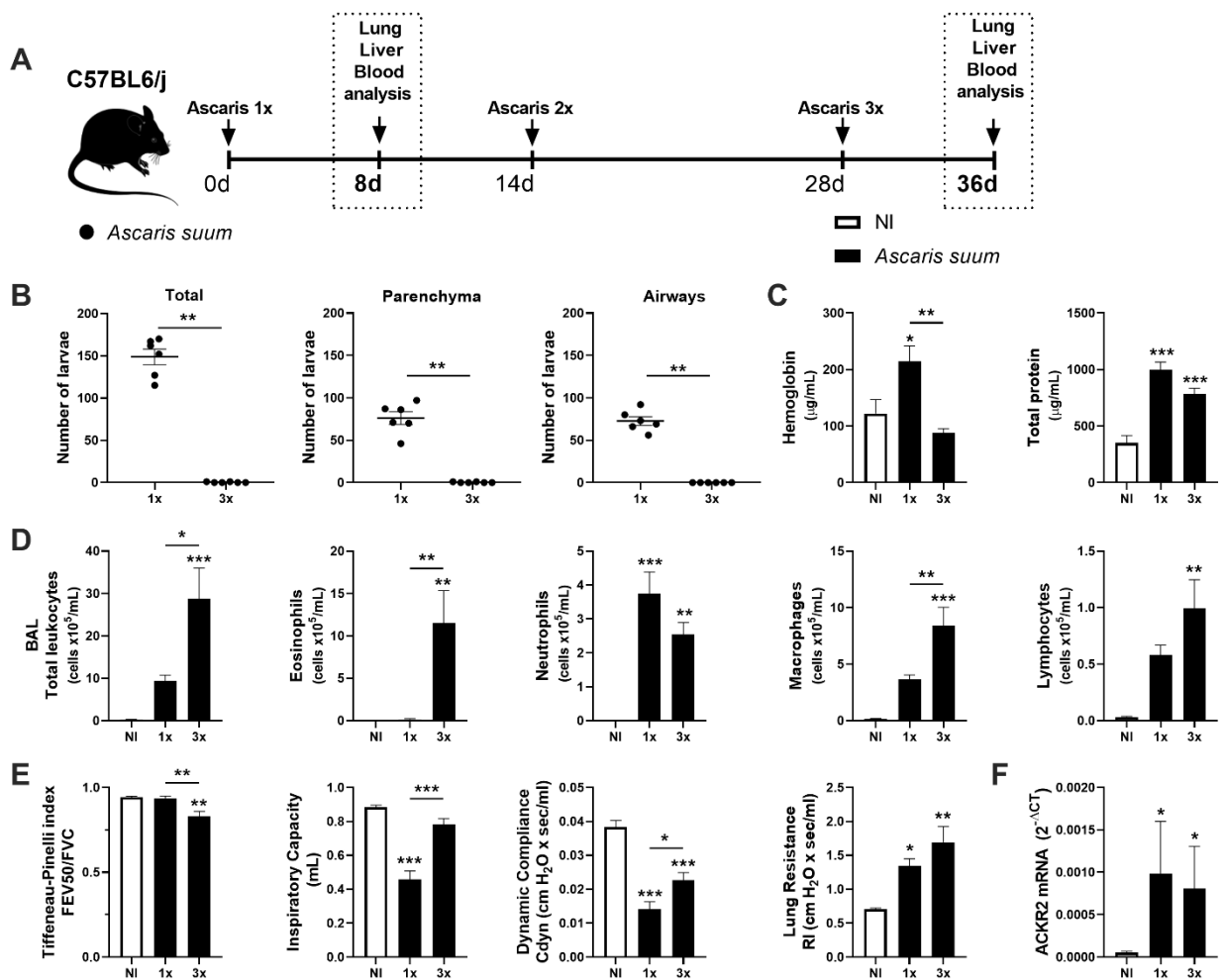


Figura 8: Avaliação da carga parasitária, resposta inflamatória nas vias aéreas, mecânica pulmonar e expressão do receptor ACKR2 no pulmão de camundongos C57BL6/J WT primo-infectados (1X), 8 dpi, e reinfecção (3X), com *A. suum*. A) delineamento experimental da primo (1X) e reinfecção (3X) com *A. suum* em animais WT; B) número de larvas totais recuperadas no pulmão (carga do BAL mais carga do parênquima), número de larvas no parênquima pulmonar e número de larvas no BAL; C) dosagem de proteínas e hemoglobina no BAL; D) contagem total e diferencial de leucócitos no BAL; E) avaliação da mecânica pulmonar por espirometria; F) expressão por PCR em tempo real do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 no pulmão. Foram utilizados os testes Mann-Whitney U e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média \pm SEM, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2 Papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na primo-infecção por *Ascaris suum* no pico de migração larval no pulmão

5.2.1 O receptor ACKR2 está envolvido no controle da carga parasitária e na resposta inflamatória nas vias aéreas após primo-infecção por *A. suum*

Após a caracterização da resposta inflamatória e da participação do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na ascaridíase larval, avaliamos o papel desse receptor no controle da carga parasitária e na resposta inflamatória pulmonar na primo-infecção, no pico de migração larval do pulmão (8 dpi), em camundongos C57BL/6J (WT) e camundongos deficientes para o receptor ACKR2 (ACKR2^{-/-}) (Figura 9A). Então, podemos observar que camundongos ACKR2^{-/-} 1X possuem um maior número de larvas recuperadas no pulmão quando comparados com animais WT 1x (Figura 9B).

Em relação aos processos de exsudação de proteínas e hemorragia, causados pela passagem da larva no tecido associado ao processo inflamatório gerado, observamos um aumento nos níveis de proteína total e hemoglobina nas vias aéreas dos camundongos ACKR2^{-/-} 1X quando comparados com camundongos WT 1X (Figura 9C). Ao avaliar o recrutamento leucocitário para as vias aéreas, a infecção por *A. suum* induziu um maior infiltrado celular nos animais ACKR2^{-/-} 1X, caracterizado pelo aumento acentuado de neutrófilos e eosinófilos no BAL, em relação aos animais WT 1X (Figura 9D). Associado a esse achado, foi verificada uma maior produção de IgA no BAL de camundongos ACKR2^{-/-} 1X comparados aos camundongos WT 1X (Figura 9E).

Portanto, esses resultados indicam que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 possui papel importante no controle da migração das larvas de *A. suum* e na resposta inflamatória nas vias aéreas, representado pela exsudação de proteínas e hemorragia, além do recrutamento de leucócitos e produção de IgA no BAL.

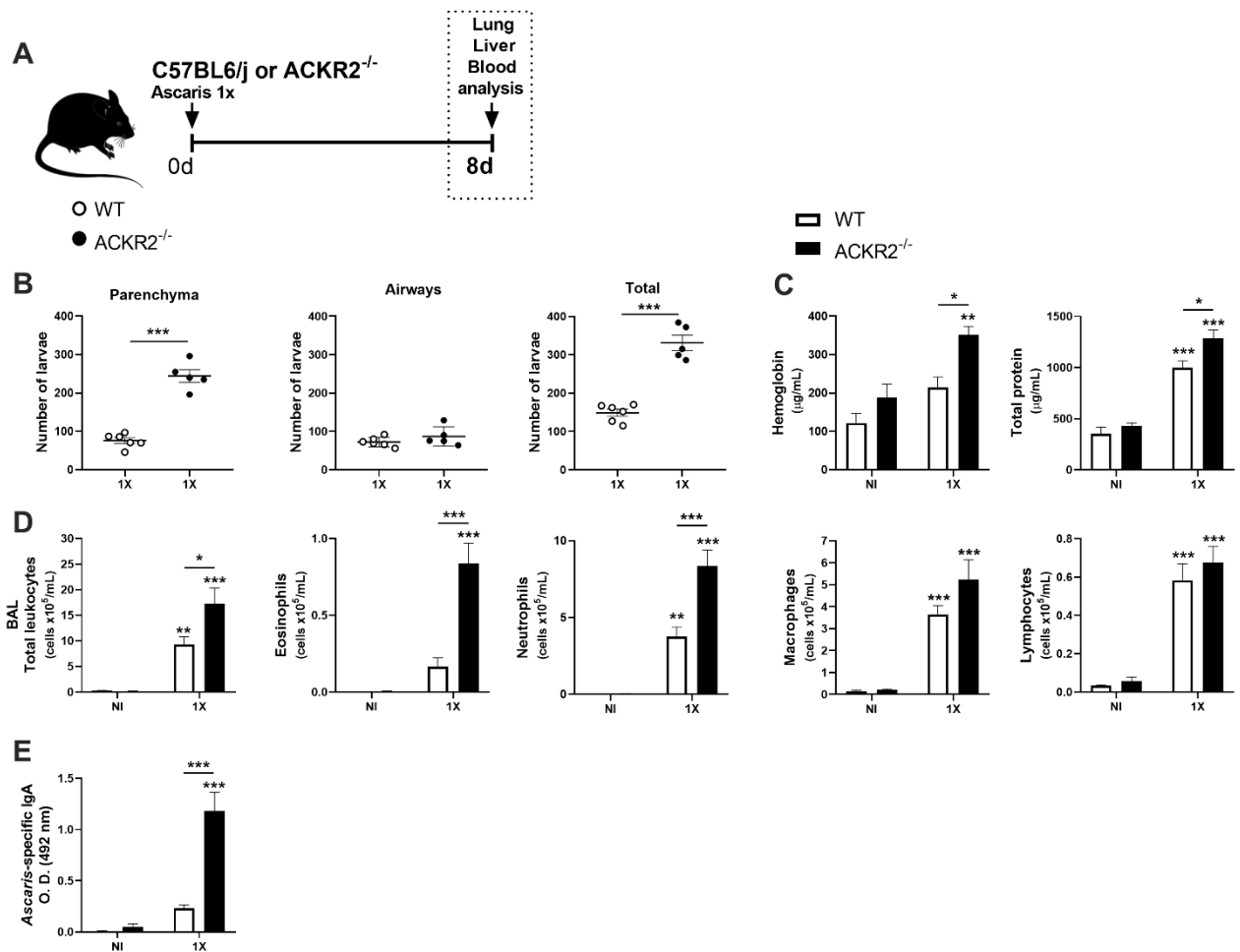


Figura 9: Avaliação da carga parasitária e resposta inflamatória nas vias aéreas de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2^{-/-} primo-infectados, 8 dpi com *A. suum*. A) delineamento experimental da primo-infecção com *A. suum* em camundongos WT e ACKR2^{-/-}; B) número de larvas totais recuperadas no pulmão (carga do BAL mais carga do parênquima), número de larvas no parênquima pulmonar e número de larvas no BAL; C) dosagem de proteínas e hemoglobina no BAL; D) contagem total e diferencial de leucócitos no BAL; E) dosagem de IgA no BAL pelo ensaio de ELISA. Foram utilizados os testes T Student e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média ± SEM, onde *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

5.2.2 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na regulação dos processos inflamatórios e fisiopatológicos no parênquima pulmonar após primo-infecção por *A. suum*

Sabendo que a ausência do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 gerou modificações no padrão de recrutamento leucocitário para as vias aéreas, com aumento da carga parasitária no pulmão, realizamos análises histopatológicas e técnicas semiquantitativas (*Score*) com o intuito de avaliar a intensidade das lesões no tecido pulmonar provocadas pela infecção por *Ascaris suum*. Os animais não-infectados, tanto os animais WT quanto os animais ACKR2^{-/-}, apresentaram aspecto histológico compatível com a normalidade (Figura 10B). Quando observado os pulmões dos camundongos infectados WT e ACKR2^{-/-}, os mesmos exibiram microscopicamente lesões no parênquima, caracterizadas por espessamento dos septos interalveolares as custas de infiltrado inflamatório polimorfonuclear (seta), com predominância de eosinófilos (Figura 10B). Também foi possível observar presença de zonas hemorrágicas (cabeças de seta) e vasos hiperêmicos, com comprometimento maior do parênquima pulmonar nos camundongos ACKR2^{-/-} 1X quando comparado com camundongos WT 1X (Figura 10B). Esses resultados foram avaliados através do *score* total da inflamação pulmonar e verificou-se que durante a migração das larvas pelos pulmões há aumento da inflamação total pulmonar nos animais WT 1X e ACKR2^{-/-} 1X quando comparado aos respectivos controles (Figura 10A). No entanto, os animais ACKR2^{-/-} 1X apresentaram maior índice de inflamação total nos pulmões do que animais WT 1X, sendo representado por um aumento de inflamação peribrônquica, perivascular e parenquimal (Figura 10A).

Com o objetivo de avaliar a atividade neutrofílica e eosinofílica no parênquima pulmonar, foram realizados ensaios enzimáticos para dosagens dos níveis das enzimas MPO e EPO. Corroborando com a análise histopatológica, a quantificação de EPO e MPO indicou um aumento de eosinófilos (Figura 10C) e neutrófilos (Figura 10D), respectivamente, no tecido pulmonar 8 dias após a infecção por *A. suum*, tanto nos animais WT quanto nos animais ACKR2^{-/-}, sendo esse aumento de granulócitos mais pronunciado nos animais ACKR2^{-/-} 1X.

Além disso, a espirometria dos camundongos demonstrou uma piora da função pulmonar nos animais infectados, com redução das medidas de volume, como Volume Expiratório Forçado e Capacidade Inspiratória, e na perda de elasticidade pulmonar, refletida pela perda de Complacência Dinâmica, tanto nos animais WT 1X quanto nos animais ACKR2^{-/-} 1X. Além disso, podemos observar um maior grau de obstrução ao fluxo de ar nos camundongos ACKR2^{-/-} 1X comparados com camundongos WT 1X, refletido em uma piora na mecânica pulmonar mais acentuada quando verificado o índice de Tiffeneau e Resistência Pulmonar (Figura 10E). Em resumo, foi possível verificar que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na regulação da resposta inflamatória pulmonar e dos processos fisiopatológicos durante a migração larval de *A. suum* pelos pulmões dos camundongos.

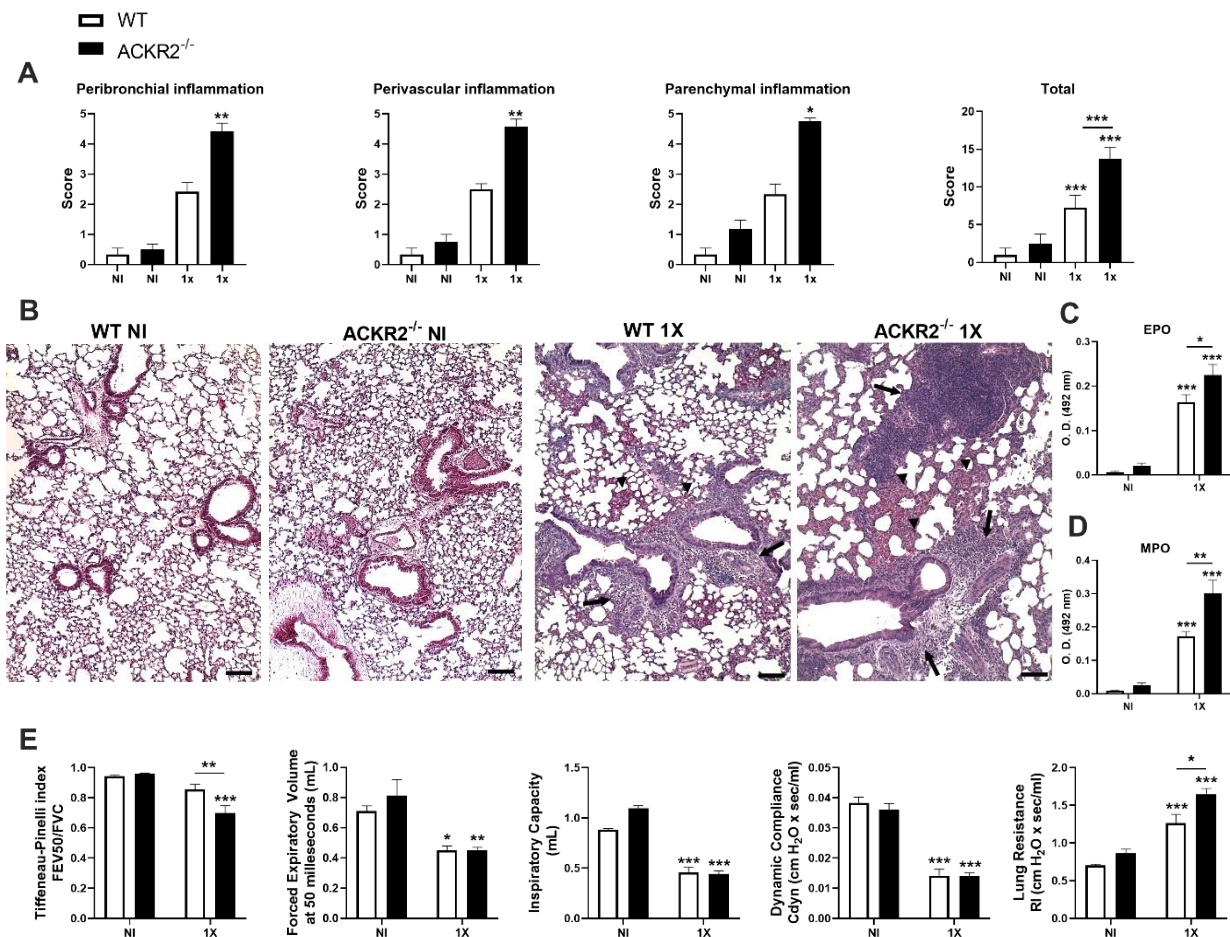


Figura 10: Avaliação da resposta inflamatória no parênquima pulmonar e mecânica pulmonar de camundongos C56BL6/J WT e ACKR2^{-/-} primo-infectados, 8 dpi com *A. suum*. A) score da inflamação peribronquial, score da inflamação perivascular, score da inflamação no parênquima, score da inflamação pulmonar total; B) Cortes histológicos de pulmão corados em H&E, infiltrado inflamatório polimorfonuclear (setas), zonas hemorrágicas (cabeças de seta). Barra de escala = 50 µm; C) atividade da enzima EPO no pulmão; D) atividade da enzima MPO no pulmão; E) avaliação da mecânica pulmonar por espirometria. Foram utilizados os testes Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média ± SEM, onde *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

5.2.3 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 participa da regulação dos níveis pulmonares de quimiocinas e citocinas após primo-infecção por *A. suum*

Com o intuito de avaliar a participação do receptor ACKR2 na produção de quimiocinas e citocinas importantes na resposta à infecção por *A. suum*, foi realizado o ensaio de ELISA no pulmão de camundongos após primo-infecção. Podemos observar que a infecção causou um aumento de quimiocinas importantes que são reguladas pelo receptor ACKR2, como CCL2, CCL3 e CCL11, tantos nos animais WT quanto nos ACKR2^{-/-} (Figura 11A). Em relação ao perfil de citocinas após infecção, observamos um aumento esperado e já descrito anteriormente na literatura de IL-6, INF-γ, IL-4, IL-5 e IL-17A em camundongos WT. De modo interessante, diferentemente dos animais WT 1X, apesar dos animais ACKR2^{-/-} infectados apresentarem um aumento de citocina da resposta imune Th2 como IL-5 e da citocina inflamatória IL-1β, observamos uma ausência de produção de IL-6 e INF-γ ou até mesmo uma diminuição da produção de IL-12 (Figura 11B), sugerindo que o receptor ACKR2 é também importante para o desenvolvimento de uma resposta Th1 característica da fase mais inicial da infecção por *A. suum*.

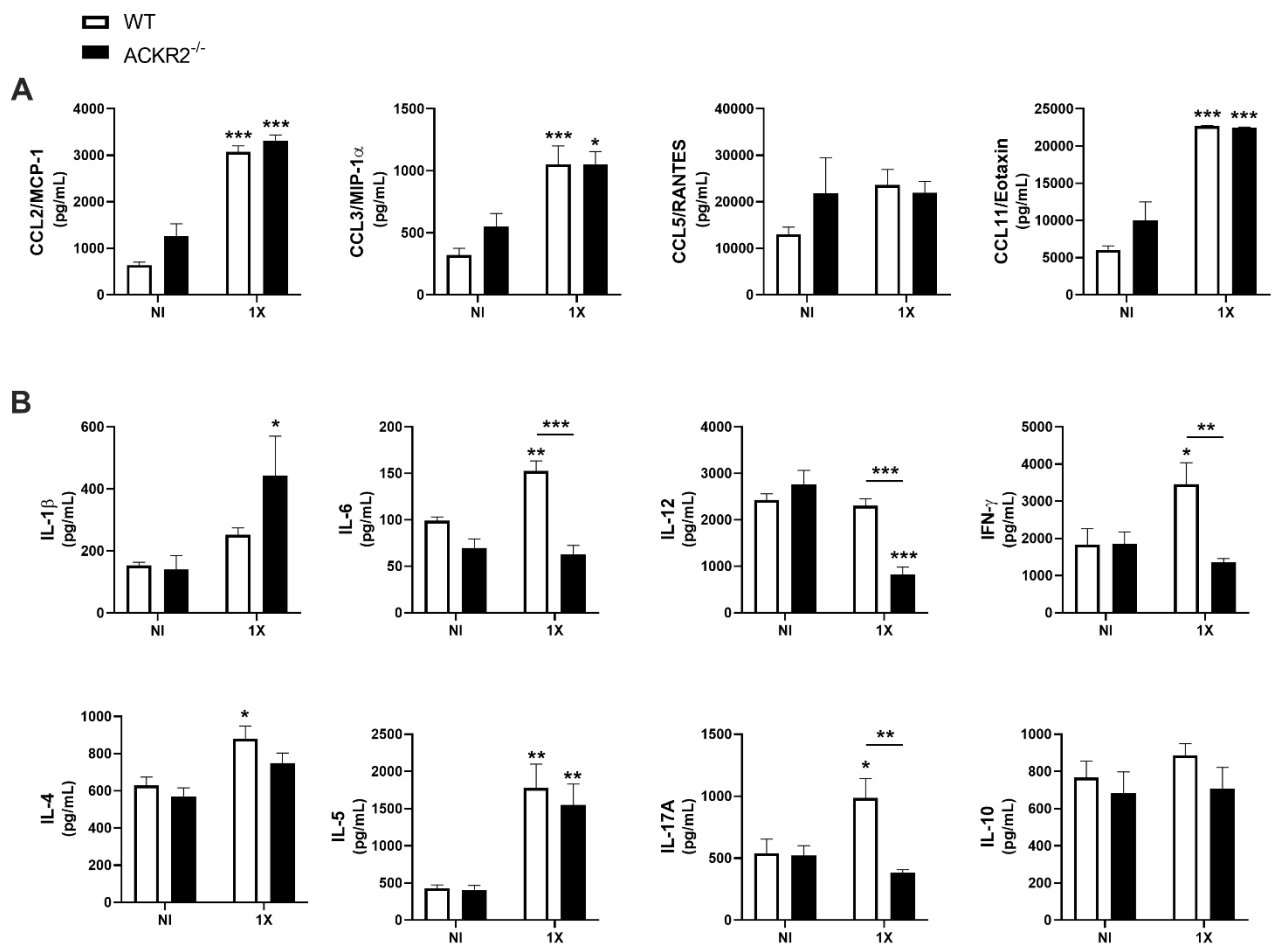


Figura 11: Níveis de quimiocinas e citocinas no tecido pulmonar de camundongos C56BL6/J WT e ACKR2^{-/-} primo-infectados, 8 dpi com *A. suum*. A) níveis pulmonares das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11 quantificadas pelo ensaio ELISA; B) níveis pulmonares das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL17A e IL-10 quantificadas pelo ensaio ELISA. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média \pm SEM, onde * p <0,05; ** p <0,01 e *** p <0,001.

5.2.4 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na regulação dos processos inflamatórios sistêmicos e hepáticos após primo-infecção por *A. suum*

Após avaliar o papel do receptor ACKR2 na migração larval de *A. suum* e na resposta inflamatória pulmonar, avaliamos a resposta inflamatória sistêmica e a importância desse receptor nos processos fisiopatológicos causados no fígado, tendo em vista que antes de alcançar os pulmões, as larvas migraram pelo tecido hepático.

Por meio da contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico, verificou-se o aumento no número de leucócitos totais no sangue dos animais ACKR2^{-/-} 1X em relação controle e aos animais WT 1X. Esse aumento foi caracterizado pelo aumento de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (Figura 12A).

Algumas quimiocinas importantes da família CC, importantes no contexto inflamatório e que são reguladas pelo receptor *scavenger* ACKR2, foram quantificadas no soro dos animais. Camundongos deficientes para o receptor de quimiocinas ACKR2 apresentaram elevados níveis das quimiocinas CCL3 e CCL11 no soro após primo-infecção por *A. suum*, enquanto animais WT 1X apresentaram elevados níveis das quimiocinas CCL2 e CCL11 (Figura 12D).

Em seguida foi realizada a avaliação da lesão hepática por meio de análises histológicas e *score* de inflamação do fígado. Os animais não-infectados, tanto os animais WT quanto os animais ACKR2^{-/-}, apresentaram aspecto histológico compatível com a normalidade (Figura 12C). Quando observado parênquima hepático dos camundongos infectados ACKR2^{-/-}, os mesmos exibiram focos de intenso infiltrado inflamatório (setas) (Figura 12C). Por outro lado, animais WT primo-infectados apresentaram apenas um discreto infiltrado inflamatório em poucas regiões (Figura 12C). Esses resultados foram corroborados na avaliação do *score* de inflamação no fígado, onde animais ACKR2^{-/-} exibiram maior índice de *score* de inflamação quando comparados com seus controles e com animais WT 1X (Figura 12B). Por tanto, esses resultados demonstram que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 possui, também, papel na regulação sistêmica, elevando níveis de mediadores inflamatórios e leucocitose no sangue, e na regulação de processos fisiopatológicos do fígado.

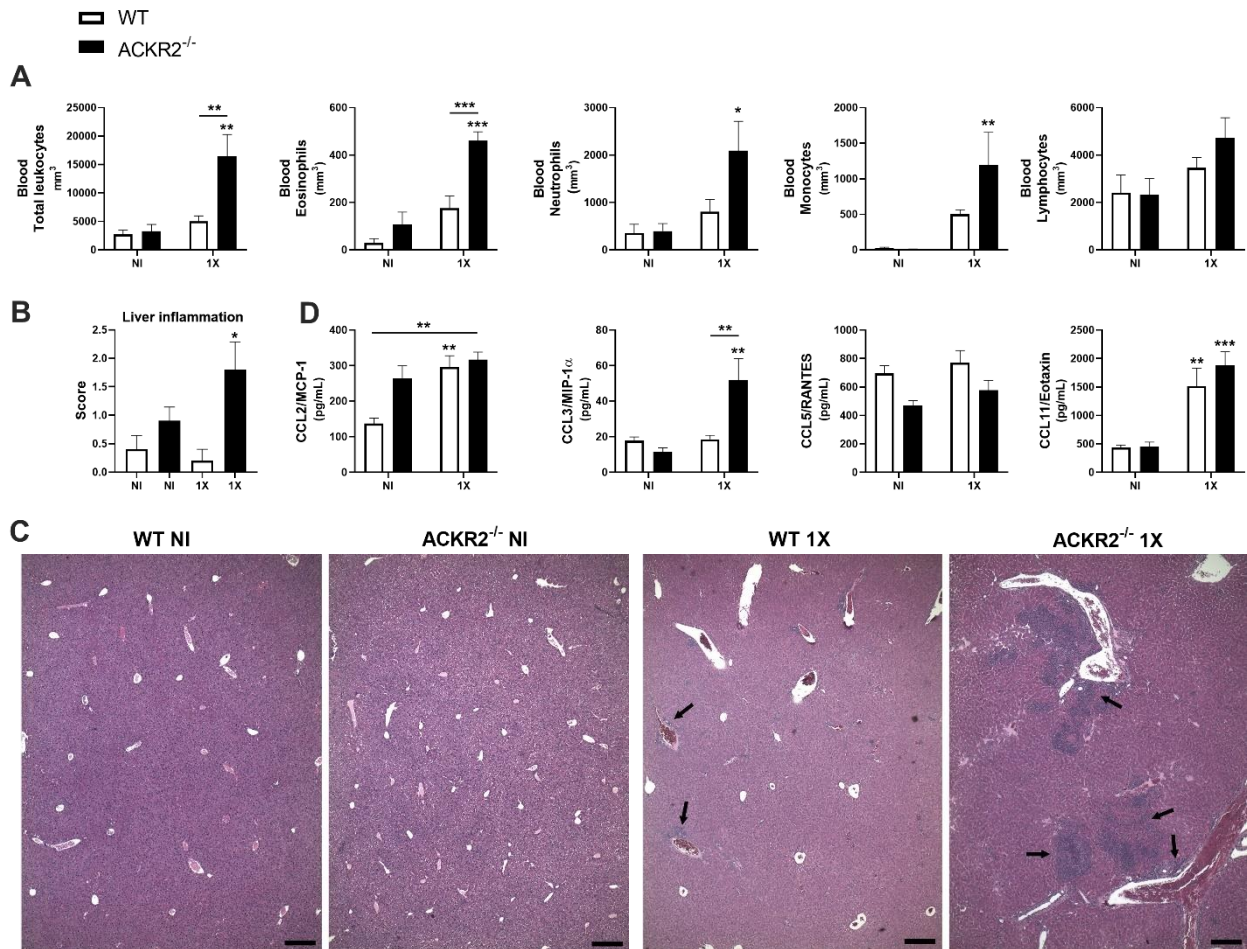


Figura 12: Avaliação de quimiocinas sistêmicas, leucocitose no sangue periférico e análise histopatológica do fígado de camundongos WT e ACKR2^{-/-} primo-infectados, 8 dpi com *A. suum*. A) contagem total de leucócitos, contagem de neutrófilos, contagem de monócitos, contagem de eosinófilos, contagem de linfócitos; B) score de inflamação do fígado; C) cortes histológicos de fígado corados em H&E, infiltrado inflamatório (setas). Barra de escala = 100 μ m. D) níveis séricos das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11 quantificadas pelo ensaio ELISA. Foram utilizados os testes Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média \pm SEM, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3 Papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na reinfecção por *Ascaris suum*

5.3.1 O receptor ACKR2 está envolvido no controle da carga parasitária e na resposta inflamatória nas vias aéreas após reinfecção por *A. suum*

Após estudar o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na primoinfecção experimental por *A. suum*, infectamos camundongos WT e ACKR2^{-/-} três vezes, com intervalo de quatorze dias entre as infecções e, oito dias após a última infecção, os animais foram eutanasiados com o objetivo de estudar o papel desse receptor no controle da carga parasitária no pulmão e na resposta imune envolvida na infecção (Figura 13A). Avaliando a carga parasitária no pulmão dos camundongos infectados, podemos observar uma proteção no pulmão relacionada a presença dos parasitos, com expressiva redução da carga tanto nos animais WT 3X quanto nos animais ACKR2^{-/-} 3X (Figura 13B). Por tanto, a reinfecção de *A. suum* é capaz de gerar uma resposta imune capaz de eliminar o parasito tanto nos animais WT quando nos animais deficientes para o receptor atípico de quimiocinas ACKR2.

Posteriormente, estudamos a resposta inflamatória nos animais após a reinfecção. Em relação aos processos de exsudação de proteínas e hemorragia, causados pela passagem da larva no tecido associado ao processo inflamatório gerado, observamos um aumento nos níveis de hemoglobina nas vias aéreas dos camundongos ACKR2^{-/-} 3X, mesmo sem a presença do parasito no pulmão (Figura 13C). Ao avaliar o exsudato de proteína nas vias aéreas, encontramos um elevado nível de proteínas após reinfecção, sendo esse aumento de maior intensidade nos camundongos ACKR2^{-/-} 3X quando comparados com camundongos WT 3X (Figura 13C). Ao avaliar o recrutamento leucocitário para as vias aéreas, a infecção por *A. suum* induziu um aumento no recrutamento de leucócitos para as vias aéreas de ambos grupos experimentais, porém um infiltrado celular mais intenso nos animais ACKR2^{-/-} 3X comparado aos animais WT 3X, representado pelo aumento de neutrófilos, eosinófilos, e linfócitos no BAL, (Figura 13D). Associado a esse achado, foi verificado uma maior produção de IgA no BAL de camundongos ACKR2^{-/-} 3X comparados aos camundongos WT 1X (Figura 13E).

Portanto, esses resultados indicam que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2, apesar de não prejudicar na eliminação do parasito após as reinfecções *por A. suum*, possui um papel importante no controle da resposta inflamatória das vias aéreas, como foi observado pelos níveis de proteína e hemoglobina, assim como pela intensificação do recrutamento leucocitário e produção de IgA no BAL.

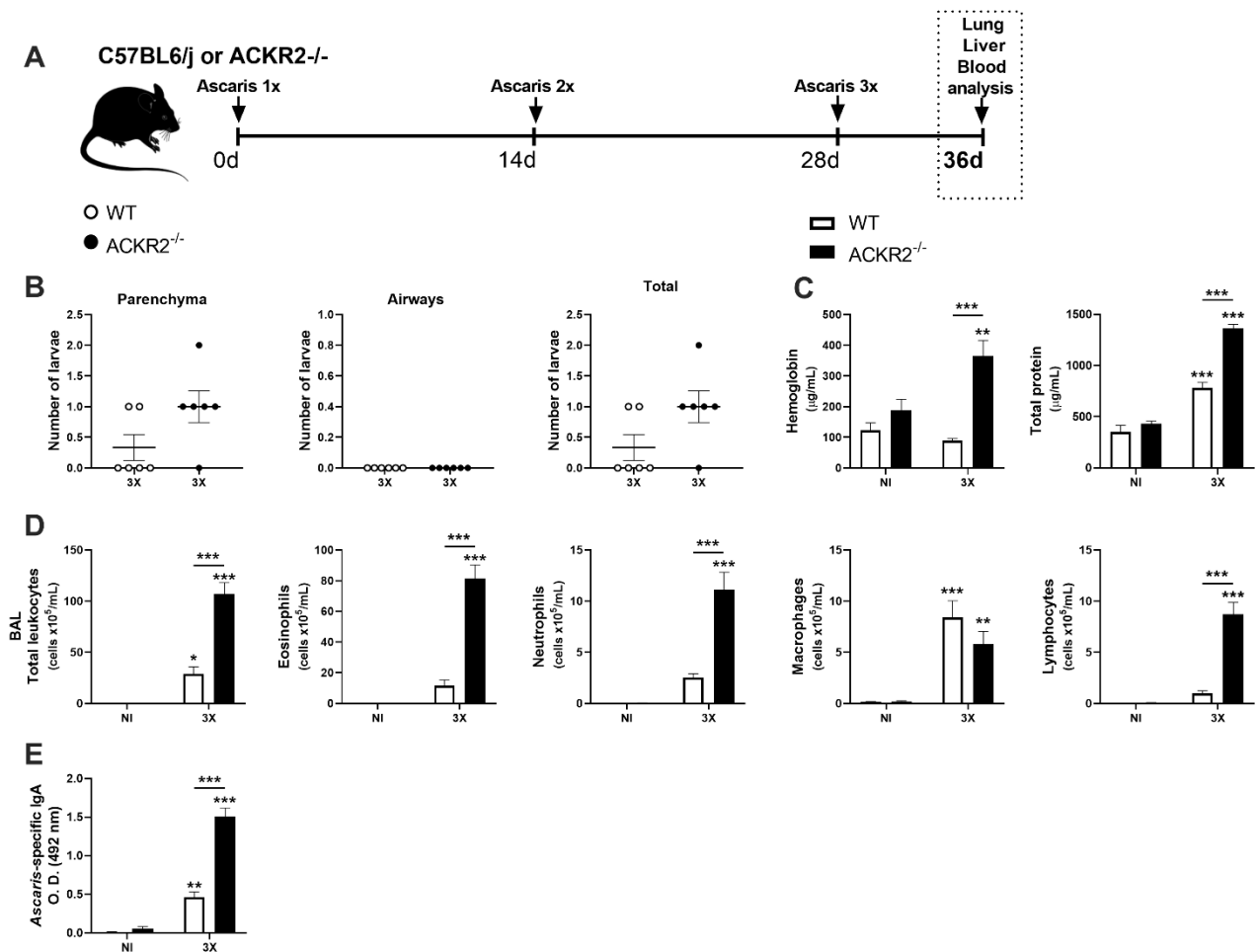


Figura 13: Avaliação da carga parasitária e resposta inflamatória nas vias aéreas de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2^{-/-} reinfectados 3X com *A. suum*. A) delineamento experimental da reinfecção com *A. suum* em camundongos WT e ACKR2^{-/-}; B) número de larvas totais recuperadas no pulmão (carga do BAL mais carga do parênquima), número de larvas no parênquima pulmonar e número de larvas no BAL; C) dosagem de proteínas e hemoglobina no BAL; D) contagem total e diferencial de leucócitos no BAL; E) produção de IgA no BAL pelo ensaio de ELISA. Foram utilizados os testes Mann-Whitney U e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média \pm SEM, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.2 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na regulação dos processos inflamatórios e fisiopatológicos no parênquima pulmonar após reinfecção por *A. suum*

O parênquima pulmonar foi avaliado por análises histopatológicas e técnicas semiquantitativas (*Score*), visto que a ausência do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 intensificou a resposta inflamatória nas vias aéreas dos animais após a reinfecção com *A. suum*, mesmo com a proteção em relação a carga parasitária. Os animais não-infectados, tanto os animais WT quanto os animais ACKR2^{-/-}, apresentaram aspecto histológico compatível com a normalidade (Figura 14B). Quando observado os pulmões dos camundongos infectados WT e ACKR2^{-/-}, os mesmos exibiram microscopicamente lesões no parênquima, caracterizadas por espessamento dos septos interalveolares as custas de infiltrado inflamatório polimorfonuclear (setas), com predominância de eosinófilos (Figura 14B). Esses resultados foram avaliados através do *score* total da inflamação pulmonar e verificou-se que durante a migração das larvas pelos pulmões há aumento da inflamação pulmonar tanto nos animais WT 3X quanto nos ACKR2^{-/-} 3X quando comparado aos respectivos controles (Figura 14A). Também foi possível observar presença de zonas hemorrágicas (cabeças de seta) e vasos hiperêmicos, com comprometimento maior do parênquima pulmonar nos camundongos ACKR2^{-/-} 3X quando comparado com camundongos WT 3X (Figura 14B). Nos camundongos ACKR2^{-/-} 3X também foi identificado inflamação peribrônquica (setas) mais exuberante do que em camundongos WT 3X (Figura 14B).

Com o objetivo de avaliar a atividade neutrofílica e eosinofílica no parênquima pulmonar, foi quantificado o conteúdo granulocítico no parênquima pulmonar por meio dos ensaios enzimáticos para dosagens dos níveis das enzimas MPO e EPO. Foi observado um aumento nos níveis de EPO e MPO indicou no tecido pulmonar após reinfecção por *A. suum*, tanto nos animais WT quanto nos animais ACKR2^{-/-} 3X (Figura 14C e 14D).

Associado a esse achado, foi verificado uma piora da função pulmonar mais acentuada nos camundongos ACKR2^{-/-} 3X, com redução das medidas de volume, como Volume Expiratório Forçado, índice de Tiffeneau e Capacidade Inspiratória, na

perda de elasticidade pulmonar, refletida pela perda de Complacência Dinâmica, e aumento de resistência pulmonar (Figura 14E).

Sendo assim, foi possível verificar que apesar de uma resposta inflamatória exacerbada no tecido pulmonar de ambos grupos experimentais infectados, os camundongos ACKR2^{-/-} 3X possuem uma função pulmonar mais prejudicada pela infecção por *A. suum* que os camundongos WT.

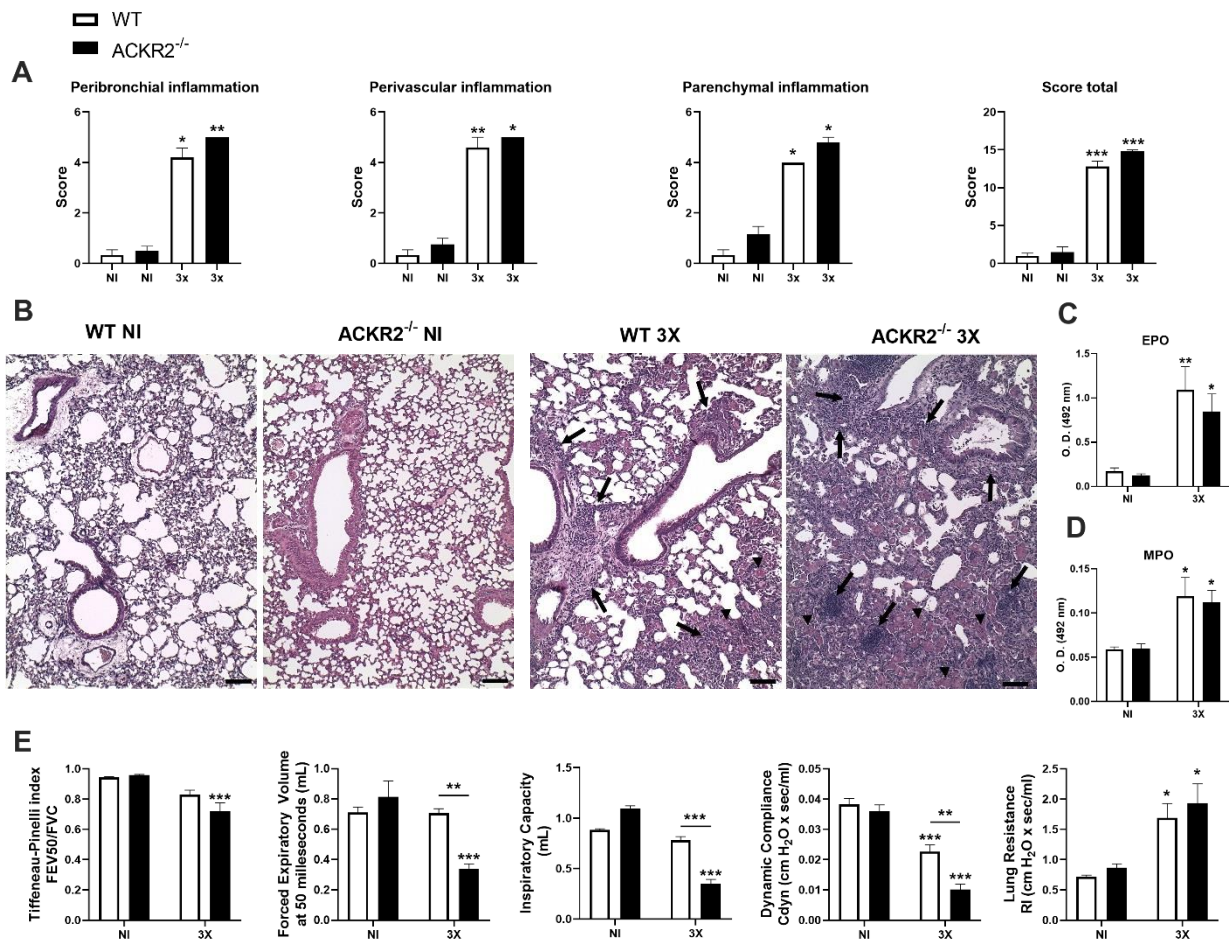


Figura 14: Avaliação da resposta inflamatória no parênquima pulmonar de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2^{-/-} reinfectedados com *A. suum*. A) score da inflamação peribronquial, score da inflamação perivascular, score da inflamação no parênquima e score da inflamação pulmonar total; B) cortes histológicos de pulmão corados em H&E; infiltrado inflamatório polimorfonuclear (setas), zonas hemorrágicas (cabeças de seta). Barra de escala = 50 μ m; C) atividade da enzima EPO no pulmão; D) atividade da enzima MPO no pulmão; E) avaliação mecânica pulmonar por espirometria. Foram utilizados os testes Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey Dados representados como média \pm SEM, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e

5.3.3 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 participa da regulação dos níveis pulmonares de citocinas após reinfecção por *A. suum*

Com o intuito de avaliar a participação do receptor ACKR2 na produção de citocinas importantes na resposta à infecção por *A. suum*, foi realizado o ensaio de ELISA no pulmão de camundongos após a reinfecção. Podemos observar que a reinfecção causou um aumento das citocinas IL-1 β e IL-4, e uma diminuição da citocina IL-12 em ambos grupos experimentais (Figura 15). Além disso, observamos um aumento da citocina IL-6 apenas nos camundongos WT 1X (Figura 15). Por outro lado, os camundongos ACKR2^{-/-} não apresentaram o aumento da citocina IL-6 e podemos observar uma diminuição da citocina IL-5 nesses camundongos (Figura 15), o que demonstra um perfil de respostas de citocinas também diferente após reinfecção por *A. suum*.

□ WT
 ■ ACKR2^{-/-}

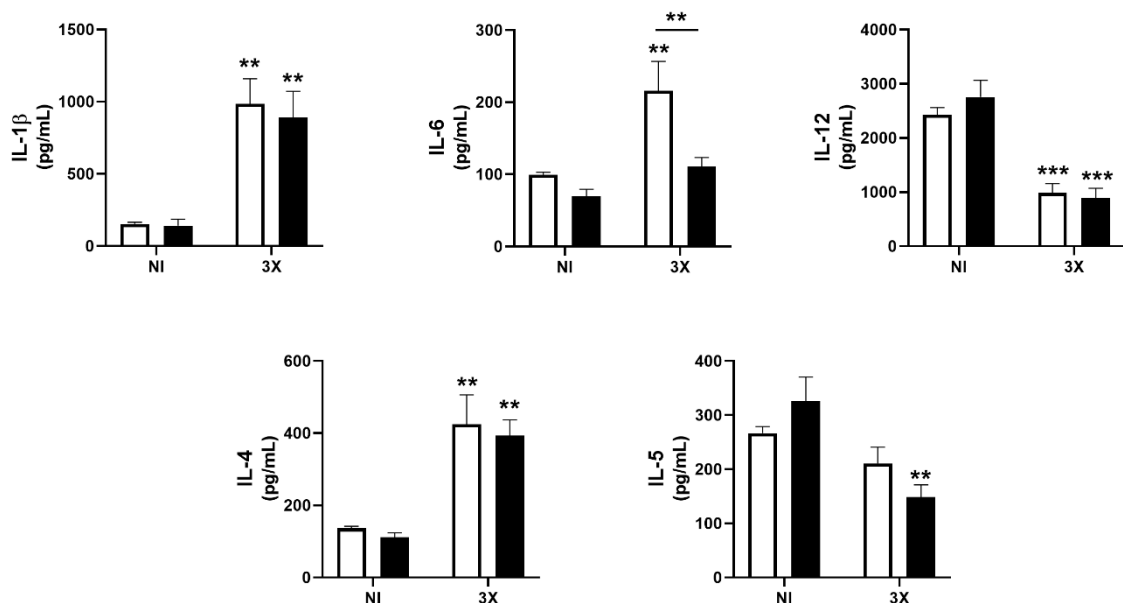


Figura 15: níveis citocinas no tecido pulmonar de camundongos C56BL6/J WT e ACKR2^{-/-} reinfectedados com *A. suum*. Níveis pulmonares das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-4 e IL-5 quantificadas pelo ensaio ELISA. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey Dados representados como média \pm SEM, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.4 Intensificação dos processos inflamatórios sistêmicos e hepáticos após reinfecção por *A. suum*

Após avaliar o papel do receptor ACKR2 na resposta inflamatória pulmonar após reinfecção, avaliamos a resposta inflamatória sistêmica e os processos fisiopatológicos hepáticos após a reinfecção com *A. suum*. Por meio da contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico, verificou-se o aumento no número de leucócitos totais no sangue dos animais infectados, tanto WT quanto ACKR2^{-/-} (Figura 16A). Essa exacerbada leucocitose foi caracterizada pelo aumento de eosinófilos e linfócitos nos animais deficientes para o receptor ACKR2 (Figura 16A), e eosinófilos e monócitos nos animais WT (Figura 16A).

Em seguida, foi realizada a avaliação da lesão hepática por meio de análises histológicas e *score* de inflamação do fígado. Os animais não-infectados, tanto os animais WT quanto os animais ACKR2^{-/-}, apresentaram aspecto histológico compatível com a normalidade (Figura 16C). Quando observado o parênquima hepático dos camundongos ACKR2^{-/-} 3X, os mesmos exibiram focos de intenso infiltrado inflamatório (setas) (Figura 16C), assim como os animais WT 3X (Figura 16C). Esses resultados foram corroborados na avaliação do *score* de inflamação no fígado, onde os animais reinfectedados de ambos grupos experimentais exibiram maior índice de *score* de inflamação quando comparados com seus controles (Figura 16B).

Por tanto, esses resultados demonstram que a reinfecção por *A. suum* é responsável pelo aumento de leucocitose no sangue periférico, com algumas diferenças no perfil leucocitário entre os grupos experimentais, e lesões no fígado tanto nos animais WT quanto nos animais ACKR2^{-/-}.

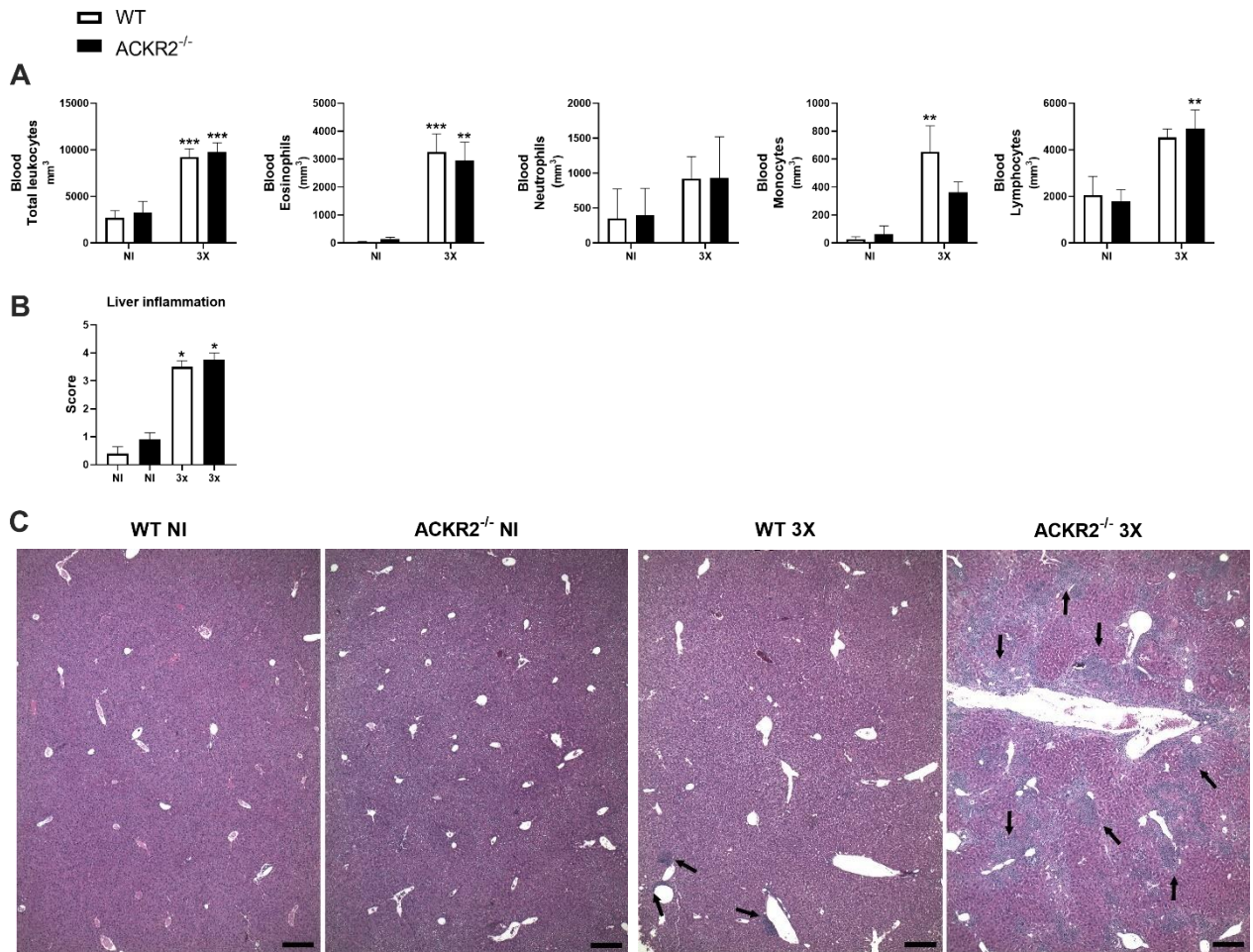


Figura 16: Avaliação da leucocitose no sangue periférico e análise histopatológica do fígado de camundongos C57BL/6/J WT e ACKR2^{-/-} reinfetados com *A. suum*. A) Contagem total de leucócitos, contagem de neutrófilos, contagem de monócitos, contagem de eosinófilos e contagem de linfócitos no sangue periférico; B) *score* de inflamação do fígado; C) cortes histológicos de fígado corados em H&E, infiltrado inflamatório (setas). Barra de escala = 100 μ m. Foram utilizados os testes Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média \pm SEM, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$.**

5.4 Papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na primo-infecção por *Ascaris suum* no pico de migração larval do fígado

5.4.1 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 está envolvido no controle da carga parasitária e na regulação da leucocitose sanguínea e das vias aéreas após quatro dias de infecção por *A. suum*

Após explorar o papel do receptor ACKR2 na primo-infecção, com foco no pico de migração larval do pulmão, e na reinfeção por *A. suum*, avaliamos por último o papel do receptor ACKR2 na primo-infecção experimental por *Ascaris suum*, agora com foco no pico de migração larval do fígado. Sendo assim, camundongos WT e ACKR2^{-/-} foram infectados com 2500 larvas de *A. suum* e, quatro dias após infecção, os animais foram eutanasiados (Figura 17A) com o objetivo de se avaliar a carga parasitária no fígado e pulmão, além da resposta imune envolvida na infecção.

Primeiramente, avaliamos a carga parasitária no fígado e pulmão dos animais infectados, tendo em vista que quatro dias após infecção é o pico de migração larval no fígado, como descrito anteriormente em outros trabalhos do nosso laboratório. Diferente do esperado, encontramos um maior número de larvas recuperadas no fígado dos animais WT 1X quando comparamos com animais ACKR2^{-/-} 1X, que apresentou um número de larvas reduzido em relação aos animais selvagens infectados (Figura 17B). No entanto, ao avaliar o número de larvas no pulmão dos animais infectados, observamos um aumento de número de larvas totais no pulmão dos camundongos ACKR2^{-/-} 1X, referente às larvas presentes no parênquima, quando comparamos com animais WT 1X (Figura 17B).

Por meio da contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico, já foi possível observar um aumento no número de leucócitos totais no sangue dos animais ACKR2^{-/-} 1X comparados com seu controle e com animais WT 1X (Figura 17D). Essa exacerbada leucocitose nos animais deficientes para o receptor ACKR2 foi caracterizado pelo aumento de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos (Figura 17D). Nos animais WT 1X, verificou-se apenas um aumento do número de monócitos comparados com seu controle.

Ao avaliar o recrutamento leucocitário para as vias aéreas, após quatro dias de infecção por *A. suum* houve um aumento no recrutamento de leucócitos totais nos

animais ACKR2^{-/-} 1X comparado com animais WT 1X, caracterizado pelo aumento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos no BAL (Figura 17E). Enquanto nos animais WT 1X observamos um aumento significativo apenas no número de linfócitos.

Portanto, esses resultados sugerem que o receptor ACKR2 parece estar envolvido também nos processos que influenciam a cinética de migração das larvas, fazendo com que elas alcancem os pulmões em um tempo mais precoce nos animais ACKR2^{-/-} quando comparamos com animais WT, visto que após quatro dias, já encontramos um número reduzido de larvas no fígado e um aumento pronunciado de larvas nos pulmões, associado a um maior recrutamento leucocitário nas vias aéreas dos camundongos infectados ACKR2^{-/-} quando comparamos com animais infectados WT.

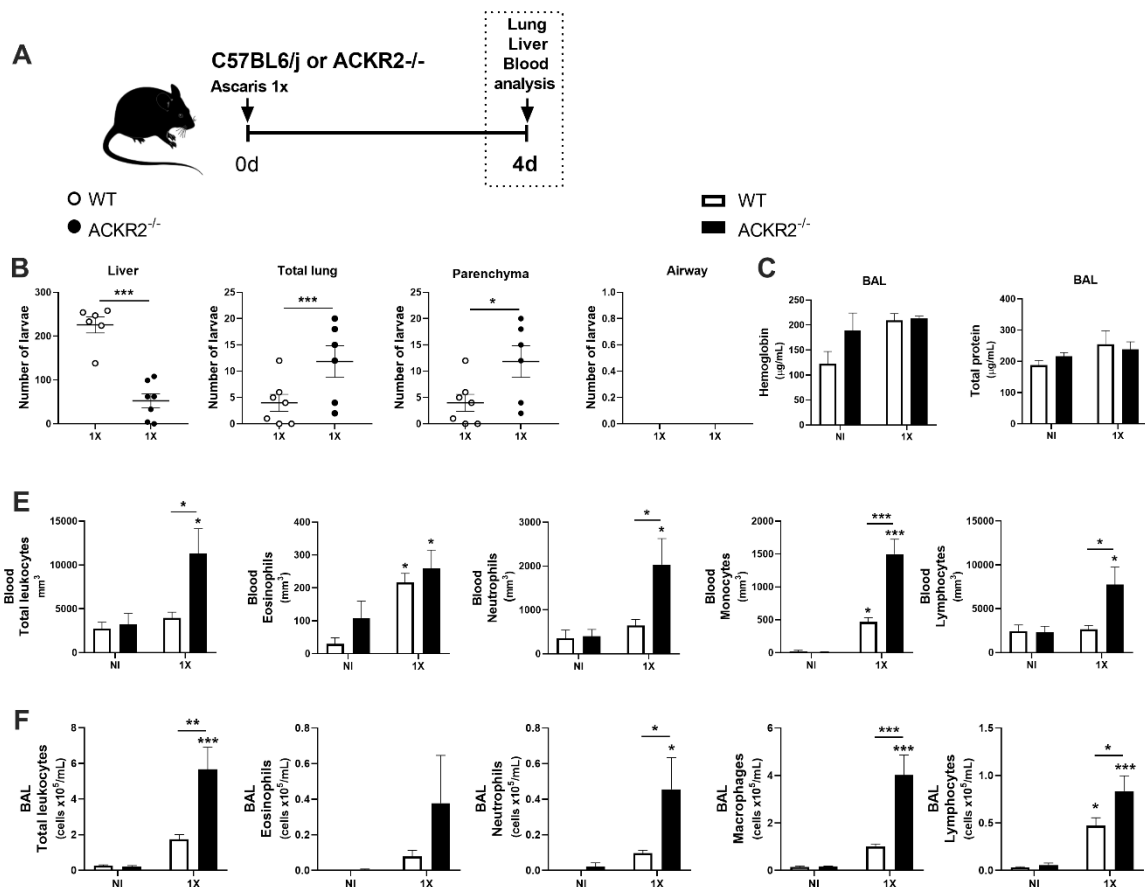


Figura 17: Avaliação da carga parasitária no fígado e pulmão, leucitose no sangue periférico nas vias aéreas de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2^{-/-} após quatro dias de infecção por *A. suum*. A) delineamento experimental quatro dias após infecção por *A. suum* em camundongos WT e ACKR2^{-/-}; B) número de larvas totais recuperadas no fígado e pulmão; C) dosagem de proteínas e hemoglobina no BAL; D) contagem total e diferencial de leucócitos no BAL; E) contagem total de leucócitos, contagem de neutrófilos, contagem de monócitos, contagem de eosinófilos e contagem de linfócitos no sangue periférico. Foram utilizados os testes T Student e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média ± SEM, onde *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

5.4.2 O receptor ACKR2 participa da regulação dos processos inflamatórios hepáticos após quatro dias de infecção por *A. suum*

Em seguida, realizamos a avaliação da inflamação hepática após quatro dias de infecção com *A. suum*. Ao avaliar a lesão hepática por meio de análises histológicas e *score* de inflamação do fígado, observamos que os animais não-infectados, tanto os animais WT quanto os animais ACKR2^{-/-}, apresentaram aspecto histológico compatível com a normalidade (Figura 18E). Quando observado o parênquima hepático dos camundongos infectados, tanto os animais WT quanto os animais ACKR2^{-/-} apresentaram focos de infiltrado inflamatório (setas) (Figura 18E). Esses resultados foram corroborados na avaliação do *score* de inflamação no fígado, onde animais ambos grupos experimentais infectados exibiram maior índice de *score* de inflamação quando comparados com seus controles (Figura 18A).

Avaliamos o conteúdo granulocítico no tecido hepático por meio dos ensaios enzimáticos para dosagens dos níveis das enzimas MPO e EPO. Podemos observar um aumento dos níveis de MPO e EPO (Figura 18C e 18D) no fígado dos animais WT infectados. Por último, avaliamos a atividade das enzimas TGO e TGP que são indicadores de lesão hepática. Podemos observar um aumento de TGO e TGP em ambos grupos infectados, porém com um aumento mais pronunciado de TGP nos animais WT infectados, quando comparados com os animais ACKR2^{-/-} infectados (Figura 18B).

Esse conjunto de resultados sugerem que com quatro dias de infecção por *A. suum*, no pico de migração larval do fígado, os animais WT infectados apresentam uma intensa resposta inflamatória hepática, que está associada a um aumento da atividade de MPO e EPO, marcadores de lesão hepática e do score histopatológico do tecido. Além disso, apesar de neste tempo de infecção encontrarmos já um número reduzido de larvas no fígado dos camundongos *ACKR2*^{-/-}, observamos também marcadores de lesão ainda elevados nestes animais.

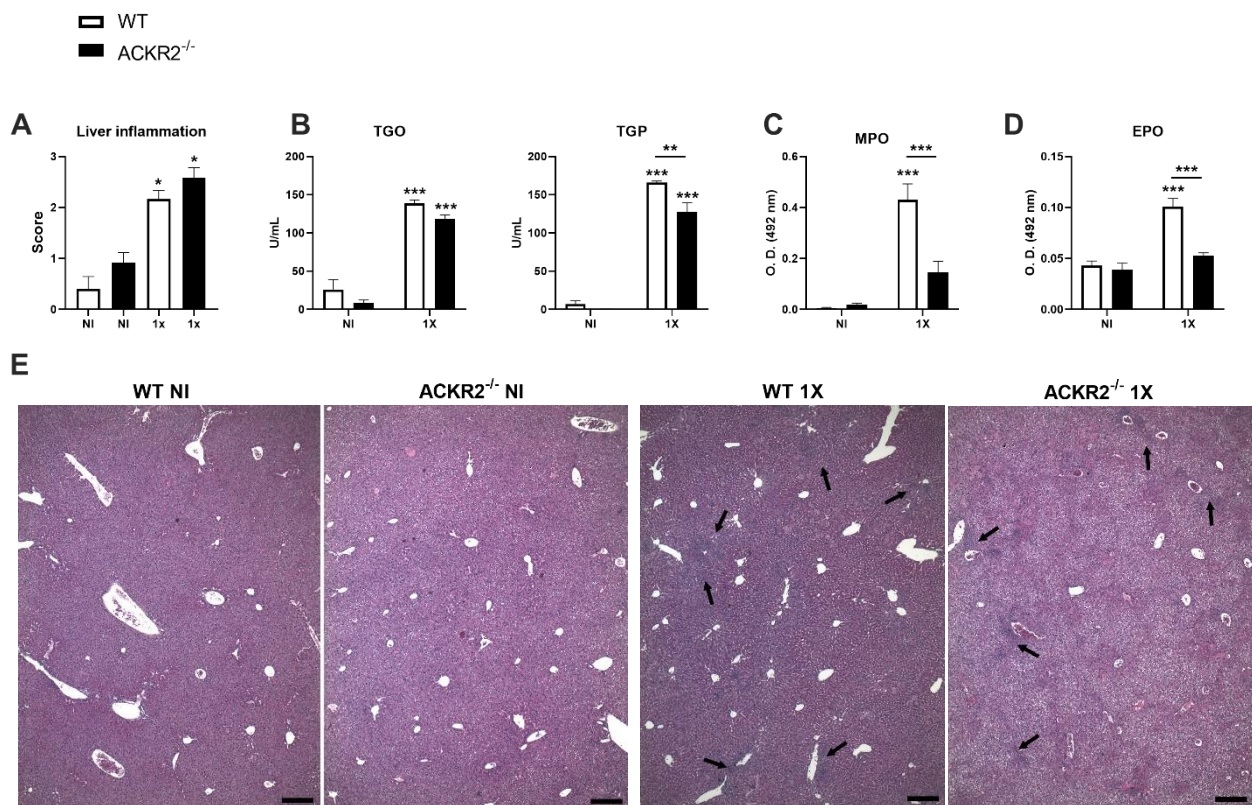


Figura 18: Avaliação da resposta inflamatória e análise histopatológica hepática de camundongos C57BL6/J WT e *ACKR2*^{-/-} após quatro dias de infecção por *A. suum*. A) score de inflamação do fígado; B) atividade das enzimas TGO e TGP; C) atividade da enzima MPO; D) atividade da enzima EPO; E) cortes histológicos de fígado corados em H&E, infiltrado inflamatório (setas). Barra de escala = 100 μm. Foram utilizados os testes Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média ± SEM, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.4.3 O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante na regulação dos processos inflamatórios no parênquima pulmonar após quatro dias de infecção por *A. suum*

Por fim, o parênquima pulmonar foi avaliado por análises histopatológicas e técnicas semiquantitativas (*score*), visto que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 influencia na carga parasitária pulmonar e no recrutamento leucocitário para as vias aéreas após quatro dias de infecção por *A. suum*. Os animais não-infectados, tanto os animais WT quanto os animais ACKR2^{-/-}, apresentaram aspecto histológico compatível com a normalidade (Figura 19B). Quando observado os pulmões dos camundongos infectados WT e ACKR2^{-/-}, os mesmos exibiram microscopicamente lesões no parênquima, caracterizadas por espessamento dos septos interalveolares as custas de infiltrado inflamatório (setas) (Figura 19D). Esses resultados foram avaliados através do *score* total da inflamação pulmonar e verificou-se que durante a migração das larvas pelos pulmões após quatro dias de infecção, há aumento da inflamação pulmonar nos animais WT 1X e ACKR2^{-/-} 1X, de maneira semelhante, quando comparado aos respectivos controles (Figura 19A). No entanto, observamos uma piora na função pulmonar apenas nos camundongos ACKR2^{-/-} infectados, com redução do Volume Expiratório Forçado e aumento de resistência à entrada de ar, observado pelo índice de Tiffeneau e Resistência Pulmonar, quando comparados com os camundongos WT infectados, sugerindo mais uma vez a participação do receptor ACKR2 nos processos fisiopatológicos pulmonares.

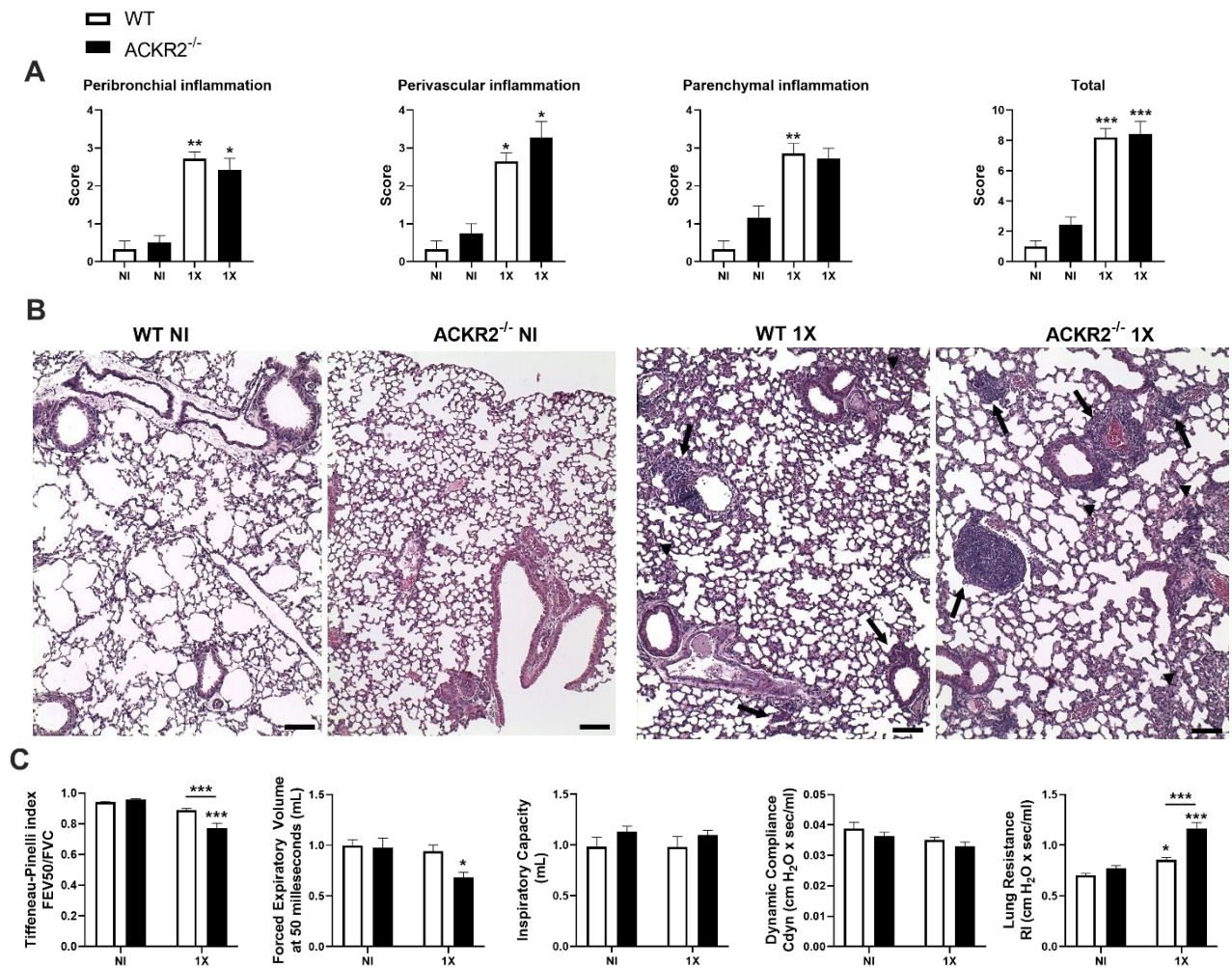


Figura 19: Avaliação da resposta inflamatória e mecânica pulmonar de camundongos C57BL6/J WT e ACKR2^{-/-} após quatro dias de infecção por *A. suum*. A) score da inflamação peribronquial, score da inflamação perivascular, score da inflamação no parênquima e score da inflamação pulmonar total; B) cortes histológicos de pulmão corados em H&E; infiltrado inflamatório polimorfonuclear (setas), zonas hemorrágicas (cabeças de seta). Barra de escala = 50 μ m; C) avaliação mecânica pulmonar por espirometria. Foram utilizados os testes Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns e One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Dados representados como média \pm SEM, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.5 Sumário dos resultados

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, podemos sumarizar:

- A primo e reinfeção por *A. suum* induz a expressão do receptor ACKR2 no pulmão dos camundongos;
- O receptor ACKR2 possui papel importante no controle da carga parasitária na infecção aguda por *A. suum*;
- O receptor ACKR2 é importante na iniciação de uma resposta mista Th1/Th2/Th17 na infecção aguda por *A. suum*;
- O receptor ACKR2 possui papel importante na regulação do recrutamento leucocitário e nos processos fisiopatológicos pulmonares na infecção aguda e crônica por *A. suum*;
- O receptor ACKR2 parece estar envolvido nos processos que influenciam a cinética de migração hepatopulmonar das larvas, visto que sua deficiência antecipa a chegada dos parasitos no pulmão.

6 Discussão

O receptor atípico de quimiocinas ACKR2 possui um importante papel no controle das respostas inflamatórias em vários tecidos. É responsável pela internalização e degradação intracelular de várias quimiocinas inflamatórias da família CC, como CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL17, CCL22, entre outras (Nibbs & Graham, 2013). O papel regulatório do receptor ACKR2 tem sido estudado no contexto de várias doenças com resultados controversos, podendo contribuir tanto com a proteção quanto com a exacerbação dos processos inflamatórios. Tavares e colaboradores (2020) demonstraram que a ausência do receptor ACKR2 na infecção experimental por influenza é responsável pela robusta formação de tecido linfóide associado ao brônquio (BALT), acompanhado pelo aumento da resposta Th1 e uma resposta imune humoral que controla a carga viral, além de induzir uma eficiente resolução da inflamação, resultando em uma melhora da função pulmonar e sobrevivência dos camundongos (Tavares et al., 2020). De maneira semelhante, o receptor ACKR2 contribuiu com o comprometimento da resposta imune e patologia pulmonar em modelo murino de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, visto que camundongos ACKR2^{-/-} apresentaram uma diminuição da resposta inflamatória, porém com aumento de linfócitos Gama Delta produtores de IFN- γ , associado a uma diminuição dos parâmetros de fibrose e uma melhora da função pulmonar (Russo et al., 2019). Em contrapartida, em modelo de sepse, Castanheira e colaboradores (2018) demonstraram que animais deficientes para o receptor ACKR2 são mais susceptíveis à falência múltipla dos órgãos e morte associada à sepse, destacando o papel protetor do receptor ACKR2 neste contexto inflamatório (Castanheira et al., 2018). A deficiência do receptor ACKR2 em camundongos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* também foi responsável por uma intensa resposta inflamatória e maior letalidade desses animais, associado a um acúmulo exagerado de leucócitos nos pulmões, rins, fígado e linfonodos (Liberto et al., 2008). No entanto, não há nenhum trabalho na literatura relacionado ao receptor atípico de quimiocinas ACKR2 durante infecções por helmintos, sobretudo na ascaridíase. Este foi o primeiro trabalho desenvolvido que estudou o papel deste receptor regulatório durante infecção pelo nematódeo *Ascaris suum*, tanto na fase inicial quanto na fase crônica da infecção. De maneira geral, nossos resultados indicam que o receptor ACKR2 possui um importante papel protetor na ascaridíase larval experimental. Participa no controle da

carga parasitária pulmonar da fase inicial da infecção, bem como na regulação da resposta inflamatória e nos processos fisiopatológicos pulmonares e hepáticos, após primo e reinfecção por *Ascaris suum*.

O primeiro passo do nosso trabalho foi realizar a caracterização da resposta inflamatória pulmonar na primo e na reinfecção em camundongos C57Bl/6. Como demonstrado anteriormente (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013), podemos observar um aumento no número de larvas recuperadas no pulmão após oito dias de infecção, tanto no parênquima pulmonar quanto nas vias aéreas. Nos camundongos reinfecçados, observamos o fenômeno de proteção com redução da carga parasitária no pulmão. Essa proteção foi observada em trabalhos anteriores tanto na reinfecção por *A. suum* (Nogueira et al., 2016), quanto após múltiplas exposições ao *Strongyloides ratti*, por exemplo (Dawkins & Grove, 1982). Além disso, a migração das larvas pelo tecido pulmonar é responsável por uma resposta inflamatória característica da infecção, acompanhado de hemorragia, aumento do exsudato proteico, aumento do infiltrado celular e piora da função pulmonar dos animais. Esse padrão de resposta imune corrobora com trabalhos anteriores, onde demonstram um recrutamento inicial de neutrófilos, que após múltiplas exposições, há uma intensificação do recrutamento leucocitário que se dá pelo aumento de macrófagos e linfócitos, além de uma intensa inflamação pulmonar eosinofílica e neutrofílica (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Nogueira et al., 2016).

Tendo em vista que a expressão do receptor de quimiocinas ACKR2 aumenta em vários contextos inflamatórios como infecção por *M. tuberculosis* (Liberto et al., 2008), influenza (Tavares et al., 2020), e fibrose pulmonar induzida por bleomicina (Russo et al., 2019), realizamos a quantificação do mRNA do ACKR2 no pulmão camundongos após primo e reinfecção pelo nematódeo *A. suum*. De maneira inédita, nossos resultados demonstram um aumento na expressão desse receptor no pulmão dos animais após infecção aguda e crônica, sugerindo seu possível papel regulatório no curso da infecção.

Sendo assim, após verificar o aumento da expressão do ACKR2 no pulmão de camundongos infectados por *A. suum*, nosso próximo passo foi estudar o papel do receptor ACKR2 na ascaridíase larval experimental. Para isso, realizamos nosso modelo experimental de primo-infecção em camundongos selvagens WT e ACKR2^{-/-}. Ao avaliar a carga parasitária no pulmão, o maior número de larvas nos animais

ACKR2^{-/-} reflete em uma maior hemorragia, observado pelo aumento de hemoglobina, acompanhado de uma maior exsudação de proteínas no BAL destes animais. O aumento do exsudato proteico nas vias aéreas reflete o edema e extravasamento de proteínas decorrentes de um evento inflamatório (Lin et al., 2008).

Ao analisarmos o perfil leucocitário e a produção de IgA nas vias aéreas, observamos que animais ACKR2^{-/-} possuem um infiltrado inflamatório de maior intensidade quando comparamos com animais WT, caracterizado pelo aumento expressivo do número de eosinófilos e neutrófilos, associado a uma produção exacerbada de IgA. De maneira semelhante, observamos uma maior atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido pulmonar, associado a um aumento da inflamação peribronquial, perivascular e parenquimatosa nos animais ACKR2^{-/-} infectados quanto comparamos com animais WT infectados. Esses achados se complementam com a avaliação da mecânica pulmonar, onde observamos uma piora de função pulmonar mais acentuada nos animais deficientes para o receptor ACKR2, resultado de maior lesão e edema no tecido pulmonar. Uma intensificação da leucocitose também foi observada no sangue dos animais ACKR2^{-/-} 1X quando comparamos com animais WT 1X, representado pelo aumento de eosinófilos, neutrófilos e monócitos. Durante as infecções por helmintos, os eosinófilos e neutrófilos possuem função efetora determinante que pode desencadear proteção, imunopatologia ou até mesmo permitir o estabelecimento dos parasitos no hospedeiro (Makepeace et al., 2012). O receptor ACKR2 tem se mostrado importante na regulação do recrutamento leucocitário em alguns estudos. Em modelo de sepse foi demonstrado um aumento do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, pulmão, coração e rim dos animais ACKR2^{-/-} (Castanheira et al., 2018). Em um estudo de inflamação alérgica das vias aéreas, Whitehead e colaboradores (2007) observaram que o ACKR2 é importante no controle de eosinofilia pulmonar característica deste modelo murino de asma (Whitehead et al., 2007). A deficiência do receptor ACKR2 também causa um exacerbado acúmulo de leucócitos no pulmão, rim, fígado e linfonodo de camundongos infectados com *M. tuberculosis* (Liberto et al., 2008).

É importante ressaltar que apesar dos neutrófilos serem tipicamente relacionados a resistência bacteriana e viral, eles são importantes células efetoras durante as infecções helmínticas, tanto na fase inicial da infecção quanto na infecção

crônica. Os neutrófilos são uma das primeiras células recrutadas após a invasão do parasito no tecido e podem contribuir diretamente com sua eliminação via mecanismo dependente de mieloperoxidase, durante a resposta imune inata, além de causar uma inflamação lesiva ao tecido dependendo do nível de sua atividade (Galioto et al., 2006; O'Connell et al., 2011). Neutrófilos apoptóticos juntamente com IL-4 e IL-13 são também importantes para o reparo tecidual associado a diferenciação de macrófagos alternativamente ativados em fases mais tardias da infecção (Bosurgi et al., 2017). Camundongos infectados com *S. stercoralis* que possuem um déficit de neutrófilos apresentaram uma maior sobrevivência das larvas (O'Connell et al., 2011). Além disso, neutrófilos também estão presentes no granuloma hepático induzido por ovos de *S. japonicum* e contribuem com a resposta inflamatória local (Chuah et al., 2013, 2014).

Por outro lado, o papel dos eosinófilos nas infecções helmínticas tem sido amplamente discutido devido a evidências conflitantes em relação a capacidade dos eosinófilos em matar o helminto, com dados demonstrando que os eosinófilos podem realizar uma função anti-helmíntica ou até mesmo possuir um papel protetor para o parasito. Alguns estudos mostraram *in vivo* a capacidade larvicida dos eosinófilos na presença de anticorpos e/ou complemento (Butterworth et al., 1979; David et al., 1980; Hamann et al., 1990; Haque et al., 1981; Kazura & Grove, 1978; Weatherhead et al., 2020). Contudo, diferentes achados *in vivo* tornam este cenário mais complexo. Apesar da toxicidade dos grânulos proteicos dos eosinófilos tanto para o esquistossomo quanto para a larva, a depleção de eosinófilos não teve nenhum impacto significativo nas seguintes medidas tradicionais da doença em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (Sher et al., 1990; Swartz et al., 2006): granuloma, carga parasitária e conteúdo do ovo. Por outro lado, a ausência de eosinófilos resultou em uma sobrevivência prolongada das formas larvais de *Strongyloides stercoralis* (Rotman et al., 1996), *Angiostrongylus cantonensis* (Sasaki et al., 1993) and *A. suum* (Nogueira et al., 2021) em camundongos. Então, embora a participação dos eosinófilos seja uma característica fundamental na infecção por helmintos, seu exato papel na resposta imune do hospedeiro permanece incerto e provavelmente é espécie-hospedeiro específico. Recentemente, Nogueira e colaboradores (2021) demonstraram a importância dos eosinófilos para a produção de IgA no pulmão, inflamação tecidual, remodelamento e controle da carga parasitária

durante a ascaridíase larval experimental murina (Nogueira et al., 2021). Nossos dados corroboram em parte com estes resultados, pois podemos correlacionar o aumento de eosinófilos com o aumento exacerbado da produção de IgA nos animais ACKR2^{-/-} 1X. No entanto, apesar do aumento de neutrófilos, eosinófilos e dos níveis de IgA, observamos também o aumento da carga parasitária após primo-infecção nestes animais, indicando que a eliminação do parasito é multifatorial e que, devido alguma peculiaridade da ausência do receptor ACKR2, até mesmo um aumento no número de eosinófilos e IgA não foi capaz evitar um atraso no controle da carga parasitária nestes animais. Sendo assim, resolvemos avaliar quimiocinas importantes que são reguladas pelo receptor ACKR2 e citocinas importantes na resposta imune da fase aguda da infecção por *A. suum*, com o intuito de investigar diferenças na resposta imune que poderiam explicar esse aumento da carga parasitária na ausência do receptor ACKR2.

Demonstramos que após a primo-infecção houve um aumento no nível das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL11 no pulmão e no sangue dos camundongos WT e ACKR2^{-/-}, com exceção de CCL3 no sangue que aumentou apenas nos ACKR2^{-/-}. Essas quimiocinas são reguladas pelo receptor ACKR2 e importantes no recrutamento de macrófagos, linfócitos e eosinófilos (Bachelierie et al., 2014; Nibbs & Graham, 2013), corroborando com o aumento do infiltrado leucocitário nos camundongos após infecção. Diversos trabalhos têm demonstrado a participação das quimiocinas em infecções helmínticas. Esses achados foram discutidos detalhadamente na revisão que se encontra anexada neste documento (ver Anexo 1). De modo geral, as quimionas mensuradas neste trabalho também foram relatadas em alguns outros estudos relacionados à infecção por *Ascaris* sp., apesar do papel dessas quimiocinas serem pouco explorado neste contexto (Dawson et al., 2009; Gazzinelli-Guimaraes et al., 2019; Itami et al., 2005).

A quimiocina CCL2 se liga com seu receptor CCR2 e é importante no recrutamento de monócitos/macrófagos, linfócitos e células NK. Estudos tem associado a produção de CCL2 com o desenvolvimento de uma resposta Th2 (Bachelierie et al., 2014; DeSchoolmeester et al., 2003; Gu et al., 2000; Lukacs et al., 1997). Também possui papel importante na formação de granuloma e fibrose na esquistossomose (Chensue et al., 1995; Lu et al., 1998; Warmington et al., 1999),

além de ser um biomarcador para nefropatia e dano renal relacionado ao esquistossomo (Duarte et al., 2014; Hanemann et al., 2013).

CCL3 e CCL5 são consideradas quimiocinas inflamatórias promiscuas que se ligam com alta afinidade aos receptores CCR1 e CCR5, que são expressados em vários tipos leucocitários, incluindo monócitos/macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células NK e células dendríticas (Bachelerie et al., 2014; Sokol & Luster, 2016). O papel dessas quimiocinas tem sido explorado principalmente na esquistossomose, onde a ativação do receptor CCR1 tem sido relacionado com aumento da formação de granuloma e aumento da carga parasitária, associado a uma maior mortalidade de camundongos em modelo experimental (Gao et al., 1997; Lukacs et al., 1993; Souza et al., 2005). Por outro lado, o receptor CCR5 tem sido associado a uma proteção a infecção por *Schistosoma* sp., com redução de granuloma e patologia hepática, acompanhado de aumento de células Treg e diminuição da mortalidade dos animais (Souza et al., 2011).

CCL11 é a principal quimiocina responsável pelo recrutamento de eosinófilos, juntamente com CCL24 e CCL26. Ela se liga seletivamente ao receptor CCR3 presente principalmente em eosinófilos, além de basófilos e mastócitos (Bachelerie, Ben-Baruch, et al., 2014b; Griffith et al., 2014b) Portanto, é uma quimiocina intimamente ligada às respostas imunes Th2 e é produzida nas mais variadas infecções helmínticas após exposição de citocinas como IL-4 e IL-13 (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2019; Kazura & Grove, 1978; Pease, 2011; Silveira-Lemos et al., 2010).

Ao avaliar o perfil de citocinas no pulmão dos animais, mostramos que após primo-infecção, animais selvagens apresentam um aumento de IL-6, IFN- γ , IL-4 e IL-5. Esses dados são confirmados com achados na literatura que demonstram um perfil de resposta mista Th1/Th2 na infecção aguda murina (Gazzinelli-Guimarães et al., 2018; Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Nogueira et al., 2016; Nogueira et al., 2021; Oliveira et al., 2019) e humana por *Ascaris* sp. (Cooper et al., 2000), além de ter importância na resposta imune da infecção aguda por outros helmintos como *Schistosoma* sp. (Anthony et al., 2007), *Taenia crassiceps* (Terrazas et al., 1999; Willms & Zurabian, 2010) e *Trichinella spiralis* (Ilic et al., 2011). Observamos também um aumento de IL-17A nos camundongos selvagens infectados, corroborando também com achados relacionados com infecção aguda por *A. suum* em

camundongos C57Bl/6 (Oliveira et al., 2019), ou infecção crônica em camundongos BALB/c (Nogueira et al., 2016). De modo interessante, podemos observar que apesar dos animais ACKR2^{-/-} infectados apresentarem uma resposta Th2 inicial, evidenciado pelo aumento de IL-5, não observamos o aumento de IFN- γ e foi possível detectar até mesmo uma diminuição dos níveis de IL-12 após infecção. IFN- γ e IL-12 são citocinas importantes da resposta Th1, sugerindo que a deficiência de uma resposta mista Th1/Th2 pode resultar em uma dificuldade na eliminação do parasito na fase inicial da infecção. Alguns estudos mostram que a ausência do receptor ACKR2 na pele de camundongos leva a um acúmulo inadequado de leucócitos inflamatórios dentro e ao redor de vasos linfáticos, dificultando o fluxo de entrada e saída de células dendríticas, o que poderia explicar o prejuízo na iniciação de respostas imune adaptativas. Esse congestionamento de leucócitos nos tecidos e vasos linfáticos também poderia explicar a exagerada resposta inflamatória aguda vista nos camundongos ACKR2^{-/-} infectados, pela dificuldade de drenagem de células inflamatórias, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios nestes animais (Lee et al., 2011, 2013; Liu et al., 2006; Nibbs & Graham, 2013).

Além disso, a citocina IL-1 β se encontra elevada apenas nos animais infectados ACKR2^{-/-}. IL-1 β é uma citocina inflamatória importante na ativação da imunidade inata, mas que geralmente está associada a uma inflamação patológica (Dinarello, 2018), que vai de encontro aos nossos resultados que demonstram uma resposta inflamatória exacerbada associada a piora da função pulmonar nos camundongos deficientes para o receptor ACKR2.

Antes das larvas alcançarem os pulmões atingindo seu pico de migração no oitavo de infecção, elas migraram pelo tecido hepático. Então, realizamos uma análise histopatológica do fígado no intuito de verificar a influência do receptor ACKR2 na inflamação e recuperação dos processos inflamatórios no tecido hepático após as larvas terem migrado pelo órgão e alcançado os pulmões. Nossos resultados demonstram um maior score de inflamação no fígado, com intenso infiltrado inflamatório, nos animais deficientes para o receptor ACKR2 comparados com animais selvagens, que apresentaram um nível de inflamação mais compatível com a normalidade. Esses resultados sugerem que o receptor ACKR2 podem ter influência na resolução dos processos inflamatórios, visto que foi demonstrado que o ACKR2 é

importante na resolução da resposta inflamatória em diferentes condições patológicas como infecções, alergia e câncer (Bonavita et al., 2016).

Posteriormente, estudamos o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na infecção crônica por *A. suum*, onde infectamos os animais três vezes com 2500 ovos, com um intervalo de quatorze dias entre as infecções. Ao avaliar a carga parasitária dos animais, observamos também o fenômeno de proteção nos animais ACKR2^{-/-}, demonstrado anteriormente após múltiplas exposições ao parasito em animais WT (Nogueira et al., 2016). Mesmo com essa proteção em relação a carga parasitária, observamos um aumento dos níveis de hemoglobina no BAL dos animais ACKR2^{-/-} decorrente do processo inflamatório, que não foi constatado em animais WT, além do exsudato proiteico no BAL destes animais que se encontra ainda mais elevado que nos animais selvagens. Ao avaliar o perfil leucocitário, observamos que após reinfecções com *A. suum* há uma intensificação do infiltrado leucocitário nas vias aéreas dos animais ACKR2^{-/-}, caracterizado pelo aumento de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, comparados com animais WT. Essa intensificação da resposta inflamatória nas vias aéreas foi acompanhada de um aumento na produção de IgA no BAL destes animais. A mensuração de MPO e EPO no tecido pulmonar, *score* histopatológico e a leucocitose sanguínea se mostraram elevadas em ambos grupos experimentais, sem diferenças significantes. Essa exacerbação da resposta inflamatória nas vias aéreas dos camundongos deficientes para o ACKR2 foi capaz de refletir em uma piora ainda mais intensa da função pulmonar destes animais, caracterizada por uma piora em medidas de volume como FEV50, IC, perda de elasticidade pela diminuição da Cdyn, além de maior resistência a entrada de ar no pulmão pela diminuição do índice de Tiffeneau e aumento da resistência pulmonar. Então, esses resultados demonstram que a ausência do ACKR2 não interfere na eliminação do parasito após reinfecções. Contudo, este receptor ainda possui um papel regulatório importante na inflamação e na fisiopatologia pulmonar causada pelo parasito.

Ao avaliar quimiocinas importantes na resposta imune da ascaridíase crônica, observamos um aumento da produção da citocina IL-4 e IL-1 β , e uma diminuição da citocina IL-12 em ambos grupos de reinfecção. Foi demonstrado que após múltiplas exposições, a resposta imune protetora contra o *A. suum* é a resposta Th2, verificada pelo aumento de citocinas características dessa resposta como IL-4 (Nogueira et al.,

2016). Como discutido anteriormente, a resposta imune do tipo 2 é amplamente estudada e considerada a resposta protetora primária a uma variedade de helmintos parasitas. Ela é iniciada por células inatas que promovem a diferenciação dos linfócitos Th2, produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, e amplificação do recrutamento de células inatas que são responsáveis por sustentar a resposta Th2, resultando em uma potente e orquestrada resposta, com participação de células efetoras e células produtoras de anticorpos (Anthony et al., 2007). Vale a pena notar que os helmintos parasitas são metazoários macropatógenos e não podem ser fagocitados. Então, o sistema imune do hospedeiro também utiliza da resposta humoral para combater a infecção, através do mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo para eliminar o parasito. Este mecanismo ocorre quando células efectoras como eosinófilos e neutrófilos reconhecem anticorpos específicos ligados ao parasito (e.g., IgE, IgG₁), resultando em um ataque citotóxico capaz de eliminar o helminto (Motran et al., 2018). Esses achados relacionados ao perfil de citocinas sugerem que apesar da deficiência do receptor ACKR2, os animais foram capazes de desenvolver uma resposta Th2 protetora que é característica da infecção, porém sem a regulação do recrutamento leucocitário, que se mostrou muito intenso nas vias aéreas prejudicando a função pulmonar dos animais. Avaliamos também a influência do receptor ACKR2 na inflamação hepática após reinfecções. Nossos dados demonstram um intenso infiltrado inflamatório no fígado dos animais, que não se diferiu entre os grupos infectados.

Por fim, após estudar o papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2, na infecção aguda e crônica por *A. suum*, com foco no sitio inflamatório pulmonar, avaliamos o papel deste receptor ainda no início da primo-infecção, com foco no sitio inflamatório hepático, após quatro dias de infecção. Para isso, avaliamos a carga parasitária do fígado e do pulmão dos animais infectados. De maneira interessante e inesperada, podemos observar que animais deficientes para o receptor ACKR2 possuem uma menor carga parasitária no fígado, comparados com animais WT, e que essa carga já se encontra elevada no pulmão nesse tempo precoce de infecção. Estes resultados sugerem que o receptor ACKR2 possa estar influenciando na cinética de migração das larvas, fazendo com que elas alcancem os pulmões precocemente.

Realizamos a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue e no BAL dos animais e mesmo neste tempo precoce de infecção, já constatamos uma

leucocitose aumentada tanto nas vias aéreas quanto no sangue dos animais ACKR2^{-/-} comparados com animais WT, indicando um possível processo inflamatório pulmonar. Dada essa diferença na cinética de migração larval, estudamos a inflamação hepática neste tempo inicial de infecção. Apesar do *score* de inflamação, e medidas de TGO e TGP aparecerem aumentados em ambos grupos experimentais de infecção, podemos observar um aumento mais intenso de TGP nos animais WT infectados. Essas duas enzimas são biomarcadores clássicos de lesão hepática que podem indicar dano celular, infecção, lesão medicamentosa, intoxicação, tumores, traumas, dentro outros fatores. A enzima TGP é mais específica para indicação de lesão hepática, visto que TGO também é produzida no coração, músculos, rim e cérebro (Goorden et al., 2013). Além disso, as medidas das enzimas MPO e EPO se mostraram elevadas apenas nos animais selvagens. Esses dados sugerem uma inflamação hepática mais intensa nos animais WT comparados com animais ACKR2^{-/-}, após quatro dias de infecção. Considerando que encontramos um maior número de larvas no fígado dos animais selvagens, justifica um infiltrado eosinofílico e neutrofílico mais intenso, associado a maiores níveis de marcadores de lesão hepática nestes animais.

Tendo em vista essa possível mudança de cinética de migração larval e chegada de larvas precoce no pulmão de camundongos ACKR2^{-/-}, associado a um maior infiltrado leucocitário nas vias aéreas, realizamos análises histopatológicas e mecânica pulmonar. Nossos resultados demonstram que apesar do *score* de inflamação no tecido pulmonar se encontrar semelhante em ambos grupos experimentais infectados, essa maior carga parasitária pulmonar nos camundongos ACKR2^{-/-}, associado ao um maior infiltrado leucocitário nas vias aéreas, foi capaz de resultar em uma piora da função pulmonar após apenas quatro dias de infecção, caracterizado pela diminuição de medidas de volume (FEV50) e aumento da resistência da entrada de ar com diminuição do índice de Tiffeneau e aumento da resistência pulmonar. Por outro lado, animais WT infectados ainda possuem sua função pulmonar preservada.

Sendo assim, nossos resultados demonstram que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 é importante para o controle da carga parasitária na fase inicial da ascaridíase larval experimental. Sua deficiência culmina em um atraso na eliminação do parasito, associado a uma dificuldade em iniciar uma resposta mista

Th1/Th2, sugerindo sua importância na fase inicial da infecção. Além disso, a ausência do ACKR2 resulta em uma resposta inflamatória exacerbada e disfunção pulmonar mais intensa nos animais ACKR2^{-/-}. Após múltiplas exposições, a deficiência deste receptor não impediu o desenvolvimento de uma resposta imune que seja capaz de eliminar o parasito. No entanto, o receptor ACKR2 se mostra um importante regulador da resposta inflamatória gerada pela infecção, controlando o nível de recrutamento leucocitário e limitando a perda de função pulmonar nos camundongos selvagens infectados. Por último, avaliamos o curso da infecção com o foco inflamatório hepático, com apenas quatro dias de primo-infecção por *A. suum*. De modo interessante, observamos que o receptor ACKR2 pode influenciar na cinética da migração hepatopulmonar das larvas, visto que encontramos uma redução de larvas no fígado dos animais ACKR2^{-/-} associado a um número elevado de parasitos no pulmão neste tempo precoce de infecção.

7 Conclusão

Nosso conjunto de dados demonstram que o receptor atípico de quimiocinas ACKR2 possui importante papel regulatório protetor na ascaridíase larval experimental. Participa no controle da carga parasitária na fase inicial da infecção, na resposta imune e nos processos fisiopatológicos do tecido pulmonar e hepático na infecção aguda e crônica por *Acaris suum*. Além disso, nossos resultados também sugerem que o receptor ACKR2 possui influência na cinética de migração hepatopulmonar realizada pelas larvas.

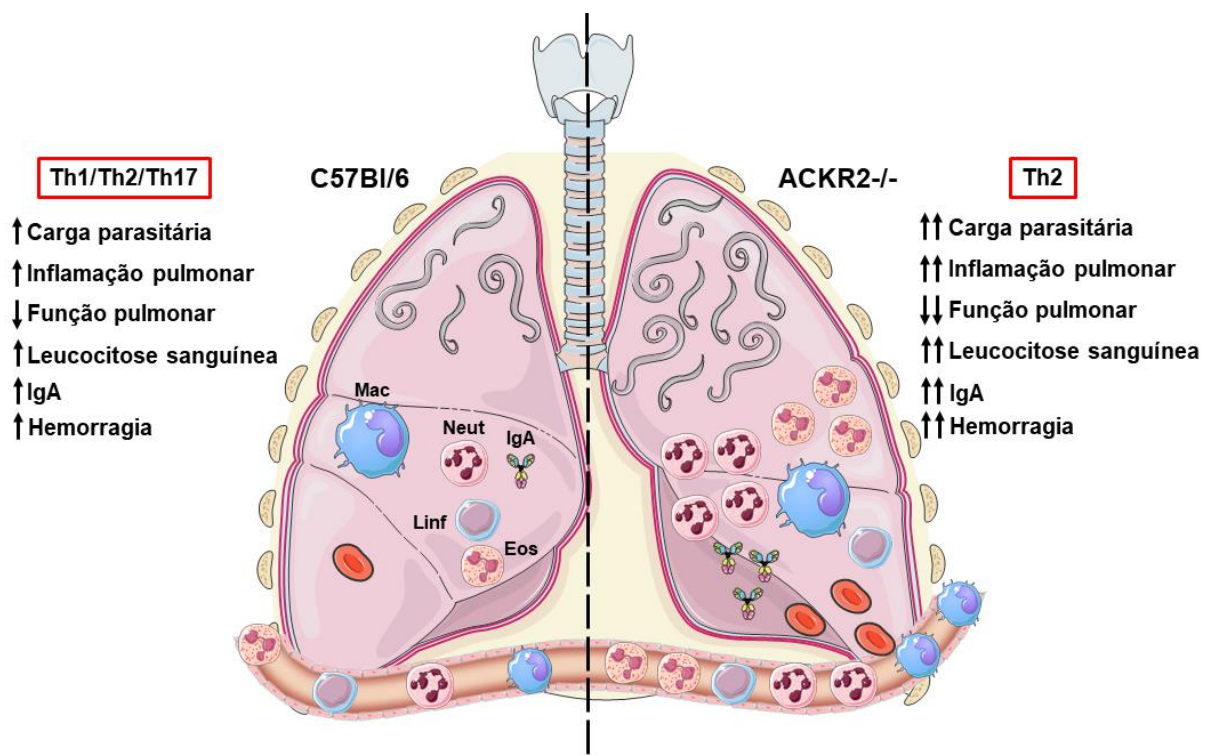


Figura 20: Papel protetor do receptor atípico de quimiocinas na ascaridíase larval experimental.

8 Referências Bibliográficas

- Ahmad, M., Malik, P., Hassan, S., & Dwivedi, S. (2015). Ascariasis presenting as hematemesis in a young boy. *Journal of Health Research and Reviews*.
<https://doi.org/10.4103/2394-2010.158128>
- Ahmed, A., Al-Mekhlafi, H. M., Azam, M. N., Ithoi, I., Al-Adhroey, A. H., Abdulsalam, A. M., & Surin, J. (2012). Soil-transmitted helminthiasis: A critical but neglected factor influencing school participation of Aboriginal children in rural Malaysia. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S003118201100237X>
- Ajendra, J., Chenery, A. L., Parkinson, J. E., Chan, B. H. K., Pearson, S., Colombo, S. A. P., Boon, L., Grecis, R. K., Sutherland, T. E., & Allen, J. E. (2020). IL-17A both initiates, via IFN γ suppression, and limits the pulmonary type-2 immune response to nematode infection. *Mucosal Immunology*, 13(6), 958–968.
<https://doi.org/10.1038/s41385-020-0318-2>
- Akuthota, P., Wang, H. B., Spencer, L. A., & Weller, P. F. (2008). Immunoregulatory roles of eosinophils: A new look at a familiar cell. In *Clinical and Experimental Allergy*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03037.x>
- Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/nri2992>
- Anderson, T. J. C., & Jaenike, J. (1997). Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001339>
- Anderson, T. J. C., Romero-Abal, M. E., & Jaenike, J. (1993). Genetic structure and epidemiology of ascaris populations: Patterns of host affiliation in guatemala. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182000079294>
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban Jr., J. F., Stadecker, M. J., Gause, W. C., Urban, J. F., Stadecker, M. J., Gause, W. C., Urban Jr., J. F., Stadecker, M. J., & Gause, W. C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, 7(12), 975–987. <https://doi.org/10.1038/nri2199>
- Azhar, M., Sheikh, A. S. ibtai. F., Khan, A., Mustafa, S., Shah, I. A. I., & Hameed, B. (2015). HEPATOBILIARY ASCARIASIS COMPLICATED BY PANCREATITIS. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*.
- Bachelerie, F., Ben-baruch, A., Burkhardt, A. M., Combadiere, C., Farber, J. M., Graham, G. J., Horuk, R., Sparre-ulrich, A. H., Locati, M., Luster, A. D.,

- Mantovani, A., Matsushima, K., Murphy, P. M., Nibbs, R., Nomiya, H., Power, C. A., Proudfoot, A. E. I., Rosenkilde, M. M., & Rot, A. (2014). *International Union of Pharmacology . LXXXIX . Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. January*, 1–79.
- Bachelier, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A. M., Combadiere, C., Farber, J. M., Graham, G. J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A. H., Locati, M., Luster, A. D., Mantovani, A., Matsushima, K., Murphy, P. M., Nibbs, R., Nomiya, H., Power, C. A., Proudfoot, A. E. I., Rosenkilde, M. M., Rot, A., ... Zlotnik, A. (2014a). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 1–79.
<https://doi.org/10.1124/pr.113.007724>
- Barbosa, F. S. (2015). *POTENCIAL ZOONÓTICO DA ASCARIDIOSE HUMANA E SUÍNA : ASPECTOS MOLECULARES , MORFOLÓGICOS E FILOGENÉTICOS DAS ESPÉCIES Ascaris lumbricoides e Ascaris suum*. 94f.
<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUBD-AC7HTR>
- Barreto, M. L., Genser, B., Strina, A., Teixeira, M. G., Assis, A. M. O., Rego, R. F., Teles, C. A., Prado, M. S., Matos, S. M. A., Alcântara-Neves, N. M., & Cairncross, S. (2010). Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002058>
- Betson, M., Nejsum, P., Bendall, R. P., Deb, R. M., & Stothard, J. R. (2014). Molecular epidemiology of ascariasis: A global perspective on the transmission dynamics of ascaris in people and pigs. *Journal of Infectious Diseases*.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu193>
- Bonavita, O., Mollica Poeta, V., Setten, E., Massara, M., & Bonecchi, R. (2016). ACKR2: An Atypical Chemokine Receptor Regulating Lymphatic Biology. *Frontiers in Immunology*, 7, 691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00691>
- Bonecchi, R., Galliera, E., Borroni, E. M., Corsi, M. M., Locati, M., & Mantovani, A. (2009). Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 540–551. <https://doi.org/10.2741/3261>
- Bordon, Y., Hansell, C. A. H., Sester, D. P., Clarke, M., Mowat, A. M., & Nibbs, R. J. B. (2009). *The Atypical Chemokine Receptor D6 Contributes to the Development*

- of Experimental Colitis 1*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802802>
- Bosurgi, L., Cao, Y. G., Cabeza-Cabrerizo, M., Tucci, A., Hughes, L. D., Kong, Y., Weinstein, J. S., Licona-Limon, P., Schmid, E. T., Pelorosso, F., Gagliani, N., Craft, J. E., Flavell, R. A., Ghosh, S., & Rothlin, C. V. (2017). Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science (New York, N.Y.)*, *356*(6342), 1072–1076. <https://doi.org/10.1126/science.aai8132>
- Bozza, S., Iannitti, R. G., Pariano, M., Renga, G., Costantini, C., Romani, L., & Bayry, J. (2021). Small molecule ccr4 antagonists protect mice from aspergillus infection and allergy. *Biomolecules*, *11*(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biom11030351>
- Bradley, J. E., & Jackson, J. A. (2004). Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. *Parasite Immunology*, *26*(11–12), 429–441. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00730.x>
- Brooker, S., Alexander, N., Geiger, S., Moyeed, R. A., Stander, J., Fleming, F., Hotez, P. J., Correa-Oliveira, R., & Bethony, J. (2006). Contrasting patterns in the small-scale heterogeneity of human helminth infections in urban and rural environments in Brazil. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.05.009>
- Butterworth, A. E., Wassom, D. L., Gleich, G. J., Loegering, D. A., & David, J. R. (1979). Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *122*(1), 221–229.
- Castanheira, F. V. E. S., Borges, V., Sônego, F., Kanashiro, A., Donate, P. B., Melo, P. H., Pallas, K., Russo, R. C., Amaral, F. A., Teixeira, M. M., Ramalho, F. S., Cunha, T. M., Liew, F. Y., Alves-Filho, J. C., Graham, G. J., & Cunha, F. Q. (2018). The Atypical Chemokine Receptor ACKR2 is Protective Against Sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, *49*(6), 682–689. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000969>
- Chan, M. S. (1997). The global burden of intestinal nematode infections - Fifty years on. In *Parasitology Today*. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01144-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01144-7)
- Charo, I. F., & Ransohoff, R. M. (2006). The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *New England Journal of Medicine*, *354*(6), 610–621. <https://doi.org/10.1056/nejmra052723>

- Chauhan, V., Thakur, S., & Rana, B. (2015). Ascariasis as a cause of hepatic abscess: A report of 3 cases. *Indian Journal of Medical Microbiology*.
<https://doi.org/10.4103/0255-0857.158576>
- Chensue, S. W., Warmington, K. S., Lukacs, N. W., Lincoln, P. M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., & Kunkel, S. L. (1995). Monocyte chemotactic protein expression during schistosome egg granuloma formation: Sequence of production, localization, contribution, and regulation. *American Journal of Pathology*, *146*(1), 130–138.
- Chuah, C., Jones, M. K., Burke, M. L., Mcmanus, D. P., Owen, H. C., & Gobert, G. N. (2014). Defining a pro-inflammatory neutrophil phenotype in response to schistosome eggs. *Cellular Microbiology*, *16*(11), 1666–1677.
<https://doi.org/10.1111/cmi.12316>
- Chuah, C., Jones, M. K., Burke, M. L., Owen, H. C., Anthony, B. J., McManus, D. P., Ramm, G. A., & Gobert, G. N. (2013). Spatial and temporal transcriptomics of *Schistosoma japonicum* -induced hepatic granuloma formation reveals novel roles for neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, *94*(2), 353–365.
<https://doi.org/10.1189/jlb.1212653>
- Coakley, G., Volpe, B., Bouchery, T., Shah, K., Butler, A., Geldhof, P., Hatherill, M., Horsnell, W. G. C., Esser-von Bieren, J., & Harris, N. L. (2020). Immune serum-activated human macrophages coordinate with eosinophils to immobilize *Ascaris suum* larvae. *Parasite Immunology*, *42*(7), e12728.
<https://doi.org/10.1111/pim.12728>
- Coelho, F. M., Pinho, V., Amaral, F. A., Sachs, D., Costa, V. V., Rodrigues, D. H., Vieira, A. T., Silva, T. A., Souza, D. G., Bertini, R., Teixeira, A. L., & Teixeira, M. M. (2008). The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and Rheumatism*, *58*(8), 2329–2337. <https://doi.org/10.1002/art.23622>
- Cooper, P., Chico, M., Sandoval, C., & Espinel, I. (2001). Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination. *Infection And*, *69*(3), 1574–1580. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1574>
- Cooper, P. J., Chico, M. E., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Kennedy, M. W., Urban, Jr., J. F., Griffin, G. E., & Nutman, T. B. (2000). Human Infection with *Ascaris lumbricoides* Is Associated with a Polarized Cytokine Response. *The*

- Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/315830>
- Cooper, P. J., Chico, M. E., Sandoval, C., & Nutman, T. B. (2004). Atopic Phenotype Is an Important Determinant of Immunoglobulin E–Mediated Inflammation and Expression of T Helper Cell Type 2 Cytokines to *Ascaris* Antigens in Children Exposed to Ascariasis . *The Journal of Infectious Diseases*.
<https://doi.org/10.1086/423944>
- Craig, J. M., & Scott, A. L. (2014). Helminths in the lungs. *Parasite Immunology*, 36(9), 463–474. <https://doi.org/10.1111/pim.12102>
- Crompton, D. W. T. (2001). *Ascaris* and ascariasis. In *Advances in Parasitology*.
[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(01\)48008-0](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(01)48008-0)
- Cummings, C. J., Martin, T. R., Frevert, C. W., Quan, J. M., Wong, V. A., Mongovin, S. M., Hagen, T. R., Steinberg, K. P., & Goodman, R. B. (1999). Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(4), 2341–2346.
- da Silva, J. M., dos Santos, T. P. M., Sobral, L. M., Queiroz-Junior, C. M., Rachid, M. A., Proudfoot, A. E. I., Garlet, G. P., Batista, A. C., Teixeira, M. M., Leopoldino, A. M., Russo, R. C., & Silva, T. A. (2017). Relevance of CCL3/CCR5 axis in oral carcinogenesis. *Oncotarget*, 8(31), 51024–51036.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16882>
- David, J. R., Butterworth, A. E., & Vadas, M. A. (1980). Mechanism of the interaction mediating killing of *Schistosoma mansoni* by human eosinophils. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(5), 842–848.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.842>
- Dawkins, H. J., & Grove, D. I. (1982). Immunisation of mice against *Strongyloides ratti*. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 66(3), 327–333.
<https://doi.org/10.1007/BF00925349>
- Dawson, H., Solano-Aguilar, G., Beal, M., Beshah, E., Vangimalla, V., Jones, E., Botero, S., & Urban, J. F. (2009). Localized Th1-, Th2-, T regulatory cell-, and inflammation-associated hepatic and pulmonary immune responses in *Ascaris suum*-infected swine are increased by retinoic acid. *Infection and Immunity*, 77(6), 2576–2587. <https://doi.org/10.1128/IAI.00827-07>
- de la Torre, Y. M., Locati, M., Buracchi, C., Dupor, J., Cook, D. N., Bonecchi, R., Nebuloni, M., Rukavina, D., Vago, L., Vecchi, A., Lira, S. A., & Mantovani, A. (2005). Increased inflammation in mice deficient for the chemokine decoy

- receptor D6. *European Journal of Immunology*, 35(5), 1342–1346.
<https://doi.org/10.1002/eji.200526114>
- DeSchoolmeester, M. L., Little, M. C., Rollins, B. J., & Else, K. J. (2003). Absence of CC Chemokine Ligand 2 Results in an Altered Th1/Th2 Cytokine Balance and Failure to Expel *Trichuris muris* Infection. *The Journal of Immunology*, 170(9), 4693–4700. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4693>
- Dey, R., Saha, R., & Dey, R. (2012). Right-sided scrotal ascariasis. *Tropical Parasitology*. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.97253>
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8–27.
<https://doi.org/10.1111/imr.12621>
- Duarte, D. B., Vanderlei, L. A., De Azevêdo Bispo, R. K., Pinheiro, M. E., Da Silva, G. B., Martins, A. M. C., Meneses, G. C., & De Francesco Daher, E. (2014). Renal function in hepatosplenic schistosomiasis - An assessment of renal tubular disorders. *PLoS ONE*, 9(12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115197>
- Easton, A., Gao, S., Lawton, S. P., Bennuru, S., Khan, A., Dahlstrom, E., Oliveira, R. G., Kepha, S., Porcella, S. F., Webster, J., Anderson, R., Grigg, M. E., Davis, R. E., Wang, J., & Nutman, T. B. (2020). Molecular evidence of hybridization between pig and human ascaris indicates an interbred species complex infecting humans. *ELife*, 9, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.61562>
- Else, K. J., Keiser, J., Holland, C. V., Grencis, R. K., Sattelle, D. B., Fujiwara, R. T., Bueno, L. L., Asaolu, S. O., Sowemimo, O. A., & Cooper, P. J. (2020). Whipworm and roundworm infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1).
<https://doi.org/10.1038/s41572-020-0171-3>
- Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C. A., Morris, S. C., Madden, K. B., Gause, W. C., & Urban Jr., J. F. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu.Rev.Immunol.*, 15, 505–533.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.505>
- Fort, M. M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S. M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R., Muchamuel, T., Hurst, S. D., Zurawski, G., Leach, M. W., Gorman, D. M., & Rennick, D. M. (2001). IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00243-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00243-6)

- Foxman, E. F., Campbell, J. J., & Butcher, E. C. (1997). Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.139.5.1349>
- Fujiwara, R. T., Geiger, S. M., Bethony, J., & Mendez, S. (2006). Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. In *Parasite Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00821.x>
- Galioto, A. M., Hess, J. A., Nolan, T. J., Schad, G. A., Lee, J. J., & Abraham, D. (2006). *Role of Eosinophils and Neutrophils in Innate and Adaptive Protective Immunity to Larval Strongyloides stercoralis in Mice*. *74*(10), 5730–5738.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01958-05>
- Galvin, T. J. (1968). Development of Human and Pig Ascaris in the Pig and Rabbit. *The Journal of Parasitology*. <https://doi.org/10.2307/3276967>
- Galzerano, A., Sabatini, E., & Durì, D. (2010). Ascaris lumbricoides infection: An unexpected cause of pancreatitis in a western Mediterranean country. *Eastern Mediterranean Health Journal*. <https://doi.org/10.26719/2010.16.3.350>
- Gao, J. L., Wynn, T. A., Chang, Y., Lee, E. J., Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Tiffany, H. L., Westphal, H., Kwon-Chung, J., & Murphy, P. M. (1997). Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *Journal of Experimental Medicine*, *185*(11), 1959–1968. <https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1959>
- Gazzinelli-Guimarães, A. C., Gazzinelli-Guimarães, P. H., Nogueira, D. S., Oliveira, F. M. S., Barbosa, F. S., Amorim, C. C. O., Cardoso, M. S., Kraemer, L., Caliari, M. V., Akamatsu, M. A., Ho, P. L., Jones, K. M., Weatherhead, J., Bottazzi, M. E., Hotez, P. J., Zhan, B., Bartholomeu, D. C., Russo, R. C., Bueno, L. L., & Fujiwara, R. T. (2018). IgG induced by vaccination with ascaris suum Extracts is protective against infection. *Frontiers in Immunology*, *9*(NOV).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02535>
- Gazzinelli-Guimaraes, P. H., De Queiroz Prado, R., Ricciardi, A., Bonne-Année, S., Scurba, J., Karmele, E. P., Fujiwara, R. T., & Nutman, T. B. (2019). Allergen presensitization drives an eosinophil-dependent arrest in lung-specific helminth development. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(9), 3686–3701.
<https://doi.org/10.1172/JCI127963>
- Gazzinelli-Guimarães, P. H., Gazzinelli-Guimarães, A. C., Silva, F. N., Mati, V. L. T., Dhom-Lemos, L. de C., Barbosa, F. S., Passos, L. S. A., Gaze, S., Carneiro, C.

- M., Bartholomeu, D. C., Bueno, L. L., & Fujiwara, R. T. (2013). Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *International Journal for Parasitology*, *43*(9), 697–706.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.02.009>
- GBD. (2019). *Ascariasis — Level 4 cause*. 1–2.
http://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/trichuriasis-level-4-cause
- Geiger, S. M., Caldas, I. R., Mc Glone, B. E., Campi-Azevedo, A. C., De Oliveira, L. M., Brooker, S., Diemert, D., Corrêa-Oliveira, R., & Bethony, J. M. (2007). Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. *Parasite Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00950.x>
- Gelpi, A. P., & Mustafa, A. (1967). Seasonal pneumonitis with eosinophilia. A study of larval ascariasis in Saudi Arabs. In *The American journal of tropical medicine and hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1967.16.646>
- Gelpi, A. P., & Mustafa, A. (1968). *Ascaris* pneumonia. *The American Journal of Medicine*. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(68\)90109-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(68)90109-5)
- Gerhardt, C. C., Romero, I. A., Canello, R., Camoin, L., & Strosberg, A. D. (2001). Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *175*(1–2), 81–92.
[https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00394-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00394-X)
- Goorden, S. M. I., Buffart, T. E., Bakker, A., & Buijs, M. M. (2013). [Liver disorders in adults: ALT and AST]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, *157*(43), A6443.
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014a). Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review of Immunology*, *32*(1), 659–702. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014b). Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>
- Gu, L., Tseng, S., Horner, R. M., Tam, C., Loda, M., & Rollins, B. J. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*, *404*(6776), 407–411. <https://doi.org/10.1038/35006097>
- Haase, P., & Voehringer, D. (2021). Regulation of the humoral type 2 immune response against allergens and helminths. *European Journal of Immunology*, *51*(2), 273–279. <https://doi.org/10.1002/eji.202048864>

- Hamann, K. J., Gleich, G. J., Checkel, J. L., Loegering, D. A., McCall, J. W., & Barker, R. L. (1990). In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *144*(8), 3166–3173.
- Hamed, M. E., Naeem, A., Alkadi, H., Alamri, A. A., Alyami, A. S., & Aljurryan, A. (2021). Elevated Expression Levels of Lung Complement Anaphylatoxin , Neutrophil Chemoattractant Chemokine IL - 8 , and RANTES in MERS - CoV - Infected Patients : Predictive Biomarkers for Disease Severity and Mortality. *Journal of Clinical Immunology*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01061-z>
- Hanemann, A. L. P., Libório, A. B., Daher, E. F., Martins, A. M. C., Pinheiro, M. C. C., Sousa, M. S., & Bezerra, F. S. M. (2013). Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in patients with chronic schistosomiasis mansoni: Evidences of subclinical renal inflammation. *PLoS ONE*, *8*(11), 8–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080421>
- Haque, A., Ouaiissi, A., Joseph, M., Capron, M., & Capron, A. (1981). IgE antibody in eosinophil- and macrophage-mediated in vitro killing of *Dipetalonema viteae* microfilariae. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *127*(2), 716–725.
- Harris, N. L., & Loke, P. (2017). Review Recent Advances in Type-2-Cell-Mediated Immunity : Insights from Helminth Infection. *Immunity*, *47*(6), 1024–1036. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.015>
- Ho, L. H., Ohno, T., Oboki, K., Kajiwara, N., Suto, H., Iikura, M., Okayama, Y., Akira, S., Saito, H., Galli, S. J., & Nakae, S. (2007). IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-Fc RI signals. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.0407200>
- Holland, C. V., Behnke, J. M., & Dold, C. (2013). Chapter 5 – Larval Ascariasis: Impact, Significance, and Model Organisms. In *Ascaris: The Neglected Parasite*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396978-1.00005-7>
- Hotez, P. J. (2008). Holidays in the sun and the Caribbean’s forgotten burden of neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *2*(5), 2007–2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000239>
- Hotez, P. J., Alvarado, M., Basáñez, M. G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., Brooker, S. J., Brown, A. S., Buckle, G., Budke, C. M., Carabin, H., Coffeng, L. E., Fèvre, E. M., Fürst, T., Halasa, Y. A., Jasrasaria, R., Johns, N. E., Keiser, J.,

- King, C. H., ... Naghavi, M. (2014). The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>
- Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J., & Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1311–1321. <https://doi.org/10.1172/JCI34261>
- Hotez, P. J., & Kamath, A. (2009). Neglected tropical diseases in sub-Saharan Africa: Review of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(8), 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000412>
- Hou, X., Fu, Y., Wang, W., Tong, J., Pan, Q., Long, Y., & Qian, W. (2009). Th17: A new participant in gut dysfunction in mice infected with trichinella spiralis. *Mediators of Inflammation*, 2009, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2009/517052>
- Ilic, N., Worthington, J. J., Gruden-Movsesijan, A., Travis, M. A., Sofronic-Milosavljevic, L., & Grecis, R. K. (2011). Trichinella spiralis antigens prime mixed Th1/Th2 response but do not induce de novo generation of Foxp3+ T cells in vitro. *Parasite Immunology*, 33(10), 572–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01322.x>
- Itami, D. M., Oshiro, T. M., Araujo, C. A., Perini, A., Martins, M. A., & Macedo, M. S. (2005). Modulation of murine experimental asthma by Ascaris suum components. 873–879. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02268.x>
- James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, Z., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Accrombessi, M. M. K., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)
- Jamieson, T., Cook, D. N., Nibbs, R. J. B., Rot, A., Nixon, C., Mclean, P., Alcami, A., Lira, S. A., Wiekowski, M., & Graham, G. J. (2005). The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1182>
- Jourdan, P. M., Lamberton, P. H. L., Fenwick, A., & Addiss, D. G. (2017). Soil-

- transmitted helminth infections. *The Lancet*, 391(10117), 252–265.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31930-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X)
- Kazura, J. W., & Grove, D. I. (1978). Stage-specific antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of *Trichinella spiralis*. *Nature*, 274(5671), 588–589.
<https://doi.org/10.1038/274588a0>
- Khuroo, M. S. (1996). *ASCARIASIS*. 25(3), 553–577.
- Knopp, S., Mgeni, A. F., Khamis, I. S., Steinmann, P., Stothard, J. R., Rollinson, D., Marti, H., & Utzinger, J. (2008). Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: Effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000331>
- Lechner, C. J., Komander, K., Hegewald, J., Huang, X., Gantin, R. G., Soboslay, P. T., Agossou, A., Banla, M., & Köhler, C. (2013). Cytokine and chemokine responses to helminth and protozoan parasites and to fungus and mite allergens in neonates, children, adults, and the elderly. *Immunity and Ageing*, 10(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-29>
- Lee, K. M., McKimmie, C. S., Gilchrist, D. S., Pallas, K. J., Nibbs, R. J., Garside, P., McDonald, V., Jenkins, C., Ransohoff, R., Liu, L., Milling, S., Cerovic, V., & Graham, G. J. (2011). D6 facilitates cellular migration and fluid flow to lymph nodes by suppressing lymphatic congestion. *Blood*, 118(23), 6220–6229.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-344044>
- Lee, K. M., Nibbs, R. J. B., & Graham, G. J. (2013). D6: The “crowd controller” at the immune gateway. *Trends in Immunology*, 34(1), 7–12.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2012.08.001>
- Lee, T.-H., Lin, G.-Y., Yang, M.-H., Tyan, Y.-C., & Lee, C.-H. (2021). Salmonella reduces tumor metastasis by downregulation C-X-C chemokine receptor type 4. *International Journal of Medical Sciences*, 18(13), 2835–2841.
<https://doi.org/10.7150/ijms.60439>
- Leles, D., Gardner, S. L., Reinhard, K., Íguez, A., & Araujo, A. (2012). Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? In *Parasites and Vectors*.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-42>
- Levina, V., Nolen, B. M., Marrangoni, A. M., Cheng, P., Marks, J. R., Szczepanski, M. J., Szajnik, M. E., Gorelik, E., & Lokshin, A. E. (2009). Role of eotaxin-1 signaling in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(8), 2647–2656.

- <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2024>
- Liberto, D. Di, Locati, M., Caccamo, N., Vecchi, A., Meraviglia, S., Salerno, A., Sireci, G., Nebuloni, M., Caceres, N., Cardona, P., Dieli, F., & Mantovani, A. (2008). *Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis infection*. *Journal of Experimental Medicine*, *205*(9), 2075–2084. <https://doi.org/10.1084/jem.20070608>
- Lin, K. L., Suzuki, Y., Nakano, H., Ramsburg, E., & Gunn, M. D. (2008). CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(4), 2562–2572. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2562>
- Liu, G., Wu, C., Song, H., Wei, S., Xu, M., Lin, R., Zhao, G., Huang, S., & Zhu, X. (2012). Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene*, *492*(1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.043>
- Liu, L., Graham, G. J., Damodaran, A., Hu, T., Lira, S. A., Sasse, M., Canastot-Chibuque, C., Cook, D. N., & Ransohoff, R. M. (2006). Cutting edge: the silent chemokine receptor D6 is required for generating T cell responses that mediate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *177*(1), 17–21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.17>
- Locati, M., Otero, K., & Schioppa, T. (2002). *The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses*. 972–982.
- Löffler, W. (1956). Transient lung infiltrations with blood eosinophilia. *International Archives of Allergy and Immunology*. <https://doi.org/10.1159/000228268>
- Louw, J. H. (1966). Abdominal complications of ascaris lumbricoides infestation in children. *British Journal of Surgery*. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800530606>
- Lu, B., Rutledge, B. J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., North, R., Gerard, C., & Rollins, B. J. (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, *187*(4), 601–608. <https://doi.org/10.1084/jem.187.4.601>
- Lukacs, N. W., Chensue, S. W., Karpus, W. J., Lincoln, P., Keefer, C., Strieter, R. M., & Kunkel, S. L. (1997). C-C chemokines differentially alter interleukin-4

- production from lymphocytes. *The American Journal of Pathology*, 150(5), 1861–1868.
- Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Warmington, K., & Chensue, S. W. (1993). The role of macrophage inflammatory protein 1 alpha in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(6), 1551–1559. <https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1551>
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 175–184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>
- Luster, A. D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*.
- Lustigman, S., Prichard, R. K., Gazzinelli, A., Grant, W. N., Boatman, B. A., McCarthy, J. S., & Basáñez, M. G. (2012). A research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001582>
- Maizels, R. M., Hewitson, J. P., & Smith, K. A. (2012). Susceptibility and immunity to helminth parasites. In *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.06.003>
- Makepeace, B. L., Martin, C., Turner, J. D., & Specht, S. (2012). Granulocytes in helminth infection -- who is calling the shots? *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1567–1586. <https://doi.org/10.2174/092986712799828337>
- Mantovani, A. (1999). The chemokine system: Redundancy for robust outputs. In *Immunology Today*. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01469-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01469-3)
- Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., & Allavena, P. (2001). Decoy receptors: A strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. In *Trends in Immunology*. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01941-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01941-X)
- Martin, J., Keymer, A., Isherwood, R. J., & Wainwright, S. M. (1983). The prevalence and intensity of *Ascaris lumbricoides* infections in Moslem children from northern Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90210-9)
- Massacand, J. C., Stettler, R. C., Meier, R., Humphreys, N. E., Grecis, R. K., Marsland, B. J., & Harris, N. L. (2009). Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906367106>
- Matsuba-Kitamura, S., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Taki, Y., Muto, T., Ikeda, T., Mimura, O., & Nakanishi, K. (2010). Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. *International Immunology*. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq035>
- Matt, S. M., Nickoloff-Bybel, E. A., Rong, Y., Runner, K., Johnson, H., O'Connor, M. H., Haddad, E. K., & Gaskill, P. J. (2021). Dopamine Levels Induced by Substance Abuse Alter Efficacy of Maraviroc and Expression of CCR5 Conformations on Myeloid Cells: Implications for NeuroHIV. *Frontiers in Immunology*, 12(May), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663061>
- Mattos, M. S., Ferrero, M. R., Kraemer, L., Lopes, G. A. O., Reis, D. C., Cassali, G. D., Oliveira, F. M. S., Brandolini, L., Allegretti, M., Garcia, C. C., Martins, M. A., Teixeira, M. M., & Russo, R. C. (2020). CXCR1 and CXCR2 Inhibition by Ladarixin Improves Neutrophil-Dependent Airway Inflammation in Mice. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566953>
- Mbow, M., Larkin, B. M., Meurs, L., Wammes, L. J., De Jong, S. E., Labuda, L. A., Camara, M., Smits, H. H., Polman, K., Dieye, T. N., Mboup, S., Stadecker, M. J., & Yazdanbakhsh, M. (2013). T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. *Journal of Infectious Diseases*, 207(1), 186–195. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis654>
- McSorley, H. J., & Maizels, R. M. (2012). Helminth infections and host immune regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 585–608. <https://doi.org/10.1128/CMR.05040-11>
- Meli, A. P., Fontés, G., Leung Soo, C., & King, I. L. (2017). T Follicular Helper Cell-Derived IL-4 Is Required for IgE Production during Intestinal Helminth Infection. *The Journal of Immunology*, 199(1), 244–252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700141>
- Motran, C. C., Silvane, L., Chiapello, L. S., Theumer, M. G., Ambrosio, L. F., Volpini, X., Celas, D. P., & Cervi, L. (2018). Helminth infections: Recognition and modulation of the immune response by innate immune cells. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00664>
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., & Power, C. A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. In *Pharmacological*

Reviews.

- Mwenda, A. S., & Ilkul, J. H. (2013). Obstructive ileal ascariasis. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMicm1205279>
- Nejsum, P., Betson, M., Bendall, R. P., Thamsborg, S. M., & Stothard, J. R. (2012). Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: Looking to the future from an analysis of the past. *Journal of Helminthology*. <https://doi.org/10.1017/S0022149X12000193>
- Nibbs, R. J. B., & Graham, G. J. (2013). Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nature Reviews Immunology*, 13(11), 815–829. <https://doi.org/10.1038/nri3544>
- Nibbs, R. J. B., Kriehuber, E., Ponath, P. D., Parent, D., Qin, S., Campbell, J. D. M., Henderson, A., Kerjaschki, D., Maurer, D., Graham, G. J., & Rot, A. (2001). The β -chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. *American Journal of Pathology*. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64035-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64035-7)
- Nibbs, R. J. B., Wylie, S. M., Pragnell, I. B., & Graham, G. J. (1997). Cloning and Characterization of a Novel Murine β Chemokine Receptor, D6. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12495–12504. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12495>
- Nogueira, D.S., Gazzinelli-Guimarães, P. H., Barbosa, F. S., Resende, N. M., Silva, C. C., de Oliveira, L. M., Amorim, C. C. O., Oliveira, F. M. S., Mattos, M. S., Kraemer, L. R., Caliari, M. V., Gaze, S., Bueno, L. L., Russo, R. C., & Fujiwara, R. T. (2016). Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004382>
- Nogueira, Denise Silva, de Oliveira, L. M., Amorim, C. C. O., Gazzinelli-Guimarães, A. C., Barbosa, F. S., Oliveira, F. M. S., Kraemer, L., Mattos, M., Cardoso, M. S., Resende, N. M., Clímaco, M. de C., Negrão-Corrêa, D. A., Faria, A. M. C., Caliari, M. V., Bueno, L. L., Gaze, S., Russo, R. C., Gazzinelli-Guimarães, P. H., & Fujiwara, R. T. (2021). Eosinophils mediate SIgA production triggered by TLR2 and TLR4 to control *Ascaris suum* infection in mice. *PLoS Pathogens*, 17(11), e1010067. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010067>
- Nogueira, Denise Silva, Gazzinelli-Guimarães, P. H., Barbosa, F. S., Resende, N. M., Silva, C. C., de Oliveira, L. M., Amorim, C. C. O., Oliveira, F. M. S., Mattos, M.

- S., Kraemer, L. R., Caliari, M. V., Gaze, S., Bueno, L. L., Russo, R. C., & Fujiwara, R. T. (2016). Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004382>
- O'Connell, A. E., Hess, J. A., Santiago, G. A., Nolan, T. J., Lok, J. B., Lee, J. J., & Abraham, D. (2011). Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infection and Immunity*, *79*(7), 2770–2778. <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-10>
- Oliveira, F. M. S., Matias, P. H. da P., Kraemer, L., Gazzinelli-Guimarães, A. C., Santos, F. V., Amorim, C. C. O., Nogueira, D. S., Freitas, C. S., Caliari, M. V., Bartholomeu, D. C., Bueno, L. L., Russo, R. C., & Fujiwara, R. T. (2019). Comorbidity associated to *ascaris suum* infection during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(11), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007896>
- Owyang, A. M., Zaph, C., Wilson, E. H., Guild, K. J., McClanahan, T., Miller, H. R. P., Cua, D. J., Goldschmidt, M., Hunter, C. A., Kastelein, R. A., & Artis, D. (2006). Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20051496>
- P., N., E.D., P. J., J., F., A., R., J., B., R., H., I., A., & J., P. (2005). Ascariasis is a zoonosis in Denmark. In *Journal of Clinical Microbiology*.
- Palucka, K., & Banchereau, J. (1999). Linking innate and adaptive immunity. In *Nature medicine* (Vol. 5, Issue 8, pp. 868–870). <https://doi.org/10.1038/11303>
- Pease, J. E. (2011). Targeting chemokine receptors in allergic disease. *Biochemical Journal*, *434*(1), 11–24. <https://doi.org/10.1042/BJ20101132>
- Phills, J. A., Harrold, A. J., Whiteman, G. V., & Perelmutter, L. (1972). Pulmonary Infiltrates, Asthma and Eosinophilia Due to *Ascaris suum* Infestation in Man. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM197205042861802>
- Pollenus, E., Pham, T. T., Vandermosten, L., Possemiers, H., Knoop, S., Opdenakker, G., & Van den Steen, P. E. (2021). CCR2 Is Dispensable for Disease Resolution but Required for the Restoration of Leukocyte Homeostasis

- Upon Experimental Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Frontiers in Immunology*, 11(February), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.628643>
- Prevention and control of intestinal parasitic infections. (1987). *World Health Organization - Technical Report Series*.
- Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. (2002). *World Health Organization Technical Report Series*.
- Price, A. E., Liang, H. E., Sullivan, B. M., Reinhardt, R. L., Eisle, C. J., Erle, D. J., & Locksley, R. M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003988107>
- Pullan, R. L., Smith, J. L., Jasrasaria, R., & Brooker, S. J. (2014). Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors*, 7(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-37>
- Ramsan, M., Montresor, A., Foun, A., Ameri, H., Di Matteo, L., Albonico, M., & Savioli, L. (1999). Independent evaluation of the Nigrosin-Eosin modification of the Kato- Katz technique. *Tropical Medicine and International Health*.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00356.x>
- Rotman, H. L., Yutanawiboonchai, W., Brigandi, R. A., Leon, O., Gleich, G. J., Nolan, T. J., Schad, G. A., & Abraham, D. (1996). Strongyloides stercoralis: Eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. *Experimental Parasitology*, 82(3), 267–278.
<https://doi.org/10.1006/expr.1996.0034>
- Russo, Remo C., Guabiraba, R., Garcia, C. C., Barcelos, L. S., Roffê, E., Souza, A. L. S., Amaral, F. A., Cisalpino, D., Cassali, G. D., Doni, A., Bertini, R., & Teixeira, M. M. (2009). Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(4), 410–421. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0364OC>
- Russo, Remo C., Savino, B., Mirolo, M., Buracchi, C., Germano, G., Anselmo, A., Zammataro, L., Pasqualini, F., Mantovani, A., Locati, M., & Teixeira, M. M. (2018). The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2+ and CCR5+ IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells in mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(6), L1010–L1025. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00233.2017>

- Russo, Remo C, Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(5), 593–619.
<https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886>
- Russo, Remo Castro, Garcia, C. C., & Teixeira, M. M. (2010). Anti-inflammatory drug development: Broad or specific chemokine receptor antagonists? *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 13(4), 414–427.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597027>
- Russo, X. R. C., Savino, B., Mirolo, M., Buracchi, C., Germano, G., Anselmo, A., Zammataro, L., Pasqualini, F., Mantovani, A., Locati, M., & Teixeira, M. M. (2019). The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2² and CCR5² IFN γ -producing T cells in mice. 15, 1010–1025. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00233.2017>
- Saboyá, M., Catalá, L., Ault, S., & Nicholls, R. (2011). Prevalence and intensity of infection of Soil-transmitted Helminths in Latin America and the Caribbean Countries: Mapping at second administrative level 2000-2010. In *Pan American Health Organization*.
- SASAKI, O., SUGAYA, H., ISHIDA, K., & YOSHIMURA, K. (1993). Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunology*, 15(6), 349–354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1993.tb00619.x>
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J. F., & Kastelein, R. A. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.015>
- Schwartz, C., Hams, E., & Fallon, P. G. (2018). Helminth Modulation of Lung Inflammation. *Trends in Parasitology*, xx, 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.12.007>
- Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S., & Cheever, A. W. (1990). Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(11), 3911–3916.
- Silveira-Lemos, D., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Souza-Soares, A. L.,

- Castro-Silva, P., Costa-Silva, M. F., Guimarães, P. H. G., Ferraz, H. B., Oliveira-Fraga, L. A., Teixeira, M. M., & Corrêa-Oliveira, R. (2010). Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis *mansoni*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *105*(4), 380–386.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000400006>
- Soderberg, B. L., Salem, R. O., Best, C. A., Cluette-Brown, J. E., & Laposata, M. (2003). Fatty acid ethyl esters. Ethanol metabolites that reflect ethanol intake. *American Journal of Clinical Pathology*, *119 Suppl*(JULY).
<https://doi.org/10.1309/6F39EAR2L4GYX5G6>
- Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2016). *The Chemokine System in Innate Immunity*. 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>
- Soria, G., & Ben-Baruch, A. (2008). The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters*, *267*(2), 271–285.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.018>
- Souza, A. L. S., Roffê, E., Pinho, V., Souza, D. G., Silva, A. F., Russo, R. C., Guabiraba, R., Pereira, C. A. J., Carvalho, F. M., Barsante, M. M., Correa-Oliveira, R., Fraga, L. A. O., Negrão-Correa, D., & Teixeira, M. M. (2005). Potential role of the chemokine macrophage inflammatory protein 1 α in human and experimental schistosomiasis. *Infection and Immunity*, *73*(4), 2515–2523.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2515-2523.2005>
- Souza, A. L. S., Souza, P. R. S., Pereira, C. A., Fernandes, A., Guabiraba, R., Russo, R. C., Vieira, L. Q., Correâ, A., Teixeira, M. M., & Negrão-Corrêa, D. (2011). Experimental infection with *Schistosoma mansoni* in CCR5-deficient mice is associated with increased disease severity, as CCR5 plays a role in controlling granulomatous inflammation. *Infection and Immunity*, *79*(4), 1741–1749. <https://doi.org/10.1128/IAI.00502-10>
- Sprent, J. F. A. (1952). Anatomical distinction between human and pig strains of *ascaris*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/170627b0>
- Swartz, J. M., Dyer, K. D., Cheever, A. W., Ramalingam, T., Pesnicak, L., Domachowske, J. B., Lee, J. J., Lee, N. A., Foster, P. S., Wynn, T. A., & Rosenberg, H. F. (2006). *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*, *108*(7), 2420–2427. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015933>
- TAKATA, I. (1951). Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig.

The Kitasato Archives of Experimental Medicine.

- Tarafder, M. R., Carabin, H., Joseph, L., Balolong, E., Olveda, R., & McGarvey, S. T. (2010). Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in humans in the absence of a “gold standard.” *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.09.003>
- Tavares, Luciana P., Garcia, C. C., Gonçalves, A. P. F., Kraemer, L. R., Melo, E. M., Oliveira, F. M. S., Freitas, C. S., Lopes, G. A. O., Reis, D. C., Cassali, G. D., Machado, A. M., Mantovani, A., Locati, M., Teixeira, M. M., & Russo, R. C. (2020). ACKR2 contributes to pulmonary dysfunction by shaping CCL5:CCR5-dependent recruitment of lymphocytes during influenza A infection in mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *318*(4), L655–L670. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00134.2019>
- Tavares, Luciana Padua, Garcia, C. C., Gonçalves, A. P. F., Kraemer, L. R., Melo, E. M., Oliveira, F. M. S., Freitas, C. S., Lopes, G. A. O., Reis, D. C., Cassali, G. D., Machado, A. M., Mantovani, A., Locati, M., Teixeira, M. M., & Russo, R. C. (2020). ACKR2 contributes to pulmonary dysfunction by shaping CCL5:CCR5-dependent recruitment of lymphocytes during Influenza A infection in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00134.2019>
- Terrazas, L. I., Cruz, M., Rodríguez-Sosa, M., Bojalil, R., García-Tamayo, F., & Larralde, C. (1999). Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research*, *85*(2), 135–141. <https://doi.org/10.1007/s004360050522>
- Thelen, M., & Stein, J. V. (2008). How chemokines invite leukocytes to dance. In *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.f.207>
- Turner, J. D., Pionnier, N., Furlong-Silva, J., Sjöberg, H., Cross, S., Halliday, A., Guimaraes, A. F., Cook, D. A. N., Steven, A., Van Rooijen, N., Allen, J. E., Jenkins, S. J., & Taylor, M. J. (2018). Interleukin-4 activated macrophages mediate immunity to filarial helminth infection by sustaining CCR3-dependent eosinophilia. *PLoS Pathogens*, *14*(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006949>
- Wang, S., Lin, C., Li, Y., Liu, Z., Wang, J., Zhang, Y., Yan, Z., Zhang, Y., Li, G., & Chen, J. (2021). Distinct chemokines selectively induce HIV-1 gp120-integrin

- $\alpha 4\beta 7$ binding via triggering conformer-specific activation of $\alpha 4\beta 7$. In *Signal transduction and targeted therapy* (Vol. 6, Issue 1, p. 265).
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00582-8>
- Warmington, K. S., Boring, L., Ruth, J. H., Sonstein, J., Hogaboam, C. M., Curtis, J. L., Kunkel, S. L., Charo, I. R., & Chensue, S. W. (1999). Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type-2 (Schistosomal antigen-elicited) pulmonary granuloma formation. Analysis of cellular recruitment and cytokine responses. *American Journal of Pathology*, 154(5), 1407–1416.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65394-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65394-1)
- Weatherhead, J. E., Gazzinelli-Guimaraes, P., Knight, J. M., Fujiwara, R., Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., & Corry, D. B. (2020). Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. *Frontiers in Immunology*, 11(October), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594520>
- Weatherhead, J. E., Porter, P., Coffey, A., Haydel, D., Versteeg, L., Zhan, B., Guimarães, A. C. G., Fujiwara, R., Jaramillo, A. M., Bottazzi, M. E., Hotez, P. J., Corry, D. B., & Beaumiera, C. M. (2018). Ascaris larval infection and lung invasion directly induce severe allergic airway disease in mice. *Infection and Immunity*, 86(12), 1–12. <https://doi.org/10.1128/IAI.00533-18>
- Weaver, C. T., Elson, C. O., Fouser, L. A., & Kolls, J. K. (2013). The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8(October 2012), 477–512.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130318>
- Whitehead, G. S., Wang, T., Degraff, L. M., Card, J. W., Lira, S. A., Graham, G. J., & Cook, D. N. (n.d.). *The Chemokine Receptor D6 Has Opposing Effects on Allergic Inflammation and Airway Reactivity*. 5(12).
<https://doi.org/10.1164/rccm.200606-839OC>
- Whitehead, G. S., Wang, T., DeGraff, L. M., Card, J. W., Lira, S. A., Graham, G. J., & Cook, D. N. (2007). The chemokine receptor D6 has opposing effects on allergic inflammation and airway reactivity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(3), 243–249. <https://doi.org/10.1164/rccm.200606-839OC>
- WHO_CDS_CPC_SIP_99.1.pdf*. (n.d.).
- Willms, K., & Zurabian, R. (2010). Taenia crassiceps: In vivo and in vitro models. *Parasitology*, 137(3), 335–346. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991442>
- World Health Organization. (2013). WHO methods and data sources for global

burdes and Information Systems WHO of disease estimates 2000-2011. *Global Health Estimates Technical Paper WHO/HIS/HSI/GHE/2013.4*, November, 81. http://www.who.int/healthinfo/statistics/GlobalDALYmethods_2000_2011.pdf?ua=1

Zaiss, M. M., Maslowski, K. M., Mosconi, I., Guenat, N., Marsland, B. J., & Harris, N. L. (2013). IL-1 β Suppresses Innate IL-25 and IL-33 Production and Maintains Helminth Chronicity. *PLoS Pathogens*.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003531>

Zheng, B., Zhang, J., Chen, H., Nie, H., Miller, H., Gong, Q., & Liu, C. (2020). T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 11(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00061>

Zhou, C., Chen, J., Niu, H., Ouyang, S., & Wu, X. (2020). Study on the population evolution of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* based on whole genome resequencing. *Veterinary Parasitology*, 279(February), 109062.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109062>

Zhou, C., Guo, T., Deng, Y., He, J., Ouyang, S., & Wu, X. (2020). Mitochondrial phylogenomics of human-type *Ascaris*, pig-type *Ascaris*, and hybrid *Ascaris* populations. *Veterinary Parasitology*, 287(September), 109256.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109256>

Zlotnik, A., & Yoshie, O. (2000). Chemokines: A new classification system and their role in immunity. In *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80165-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80165-X)

9 Anexos

9.1 Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 175/2020

Título do projeto: Estudo do papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 relacionado aos aspectos parasitológicos, fisiopatológicos e imunológicos da ascaridíase larval experimental

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Ricardo Toshio Fujiwara

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião "on line" do dia 14/09/2020. Validade: 14/09/2020 à 13/09/2025.

Belo Horizonte, 14/09/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

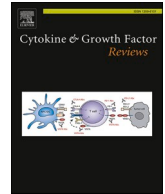
9.2 Anexo 2

Artigo de revisão produzido durante o período de doutoramento: Chemokines and chemokine receptors: insights from human disease and experimental models of helminthiasis



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine and Growth Factor Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytogfr

Chemokines and chemokine receptors: Insights from human disease and experimental models of helminthiasis

Lucas Kraemer^{a,1}, Derek M. McKay^{b,2}, Remo Castro Russo^{c,3,4}, Ricardo Toshio Fujiwara^{a,*,4,5}^a Laboratory of Immunology and Parasite Genomics, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil^b Gastrointestinal Research Group, Inflammation Research Network and Host-Parasite Interactions Group, Department of Physiology and Pharmacology, Calvin, Phoebe and Joan Snyder Institute for Chronic Diseases, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada^c Laboratory of Pulmonary Immunology and Mechanics, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Helminth infection
Chemokine
Chemokine receptor
Innate immune response
Adaptive immune response

ABSTRACT

Infection with helminth parasites affects more than 1.5 billion people and is concentrated in global areas of extreme poverty, having a significant impact on public health, social life and the economy. Upon entry into the host, helminth parasites often migrate through specific tissues triggering host immunity. The immune response triggered by helminth infections is complex and depends on parasite load, site of infection, acuteness/chronicity of the infection and is species-dependent. In general, susceptibility or resistance to the infection involves the participation of the innate immune response and then the balance between several effector CD4⁺ T cells subsets, such as Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh and Treg, coordinated by immune mediators such as cytokines and chemokines. Chemokines guide the recruitment and activation of leukocytes under inflammatory and homeostatic states. The chemokine system has been associated with several diseases and experimental models with a significant inflammatory component, including infection with helminth parasites. Therefore, this critical review will highlight the main findings concerning chemokine responses elicited by the interaction between helminth parasites and the hosts' immune system, hence contributing to the understanding of the relevance of chemokine synthesis and biology in the immunological response to infection by parasitic helminths.

1. Introduction

Parasitic helminths are divided into three main taxonomic groups: nematodes (roundworms), cestodes and trematodes, the latter two being flatworms (platyhelminths). Recent studies suggest that approximately 1.5 billion people are infected with helminth parasites, nearly 20% of the human population, and thus helminths pose a significant global public health problem [1]. Equally important, although not dealt with here, is the impact of helminths that infect companion animals and domestic livestock causing substantial loss of production [2]. Several risk factors are related to the high transmission of helminths, such as

climate, soil conditions, poverty, lack of basic sanitation and health education. Therefore, rural areas and low- and middle-income countries in Asia, the Caribbean, Latin America, and sub-Saharan Africa stand out among world regions most affected by parasitic helminths [3]. The current treatment for helminth infections is the administration of anthelmintic drugs [4]. Despite the effectiveness of anthelmintic therapy, the eradication of helminth infections has been unattainable, with the possible exception of *Dracunculus medinensis* [5], due to high rates of reinfection in endemic areas, the lack of effective vaccines and the rapid spread of anthelmintic resistance. Consequently, there is an urgent need to develop a precise and parasite-host understanding of the specific

* Correspondence to: Laboratory of Immunology and Parasite Genomics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, nº 6627, Belo Horizonte, Brazil.

E-mail address: fujiwara@icb.ufmg.br (R.T. Fujiwara).

¹ ORCID ID: 0000-0003-3562-5791.

² ORCID ID: 0000-0002-0557-8210.

³ ORCID ID: 0000-0002-1715-3834.

⁴ These two authors contributed equally to this manuscript.

⁵ 0000-0002-4713-575X.

<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.05.002>

Received 19 April 2022; Received in revised form 17 May 2022; Accepted 18 May 2022

Available online 21 May 2022

1359-6101/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

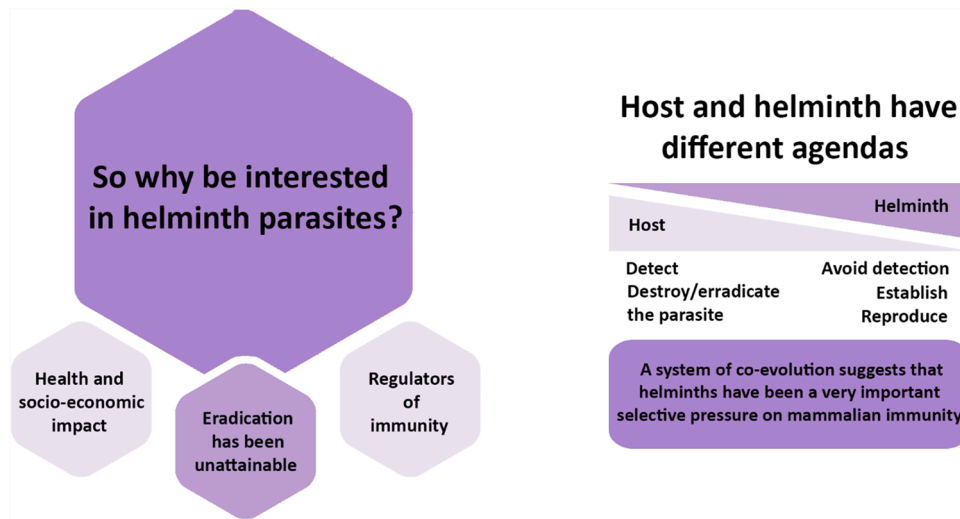


Fig. 1. . The importance of studying helminth parasites and their co-evolution with mammalian hosts.

mechanisms of the immune response in helminthic diseases to drive the development of more effective treatments.

Helminth parasites have co-evolved with the host as endoparasites with different forms of transmission and multi-stage life cycles. Upon entry into the host, the parasites exhibit organ tropism and some must migrate through specific tissues, responsible for triggering the host immune system. The host immune response has developed over eons, acting as an evolutionary pressure on the helminth. Therefore, a balanced defense mechanism between susceptibility, resistance, and pathogenesis, often controls ongoing infection rather than entirely eliminating the parasite, limiting its pathological effects [6]. In contrast, uncontrolled helminth infections can lead to immune dysregulation and consequent immunopathological processes. Thus, the infection with helminth parasites on the host can range from mild loss of nutrients to anemia, malnutrition, growth retardation, tissue damage, cognitive impairment, organ dysfunction, and ultimately death. Concomitant with helminth infection in humans is the reduction in work productivity in global areas that are often poverty-stricken, thus compounding the impact on region public health and the global economy [7] (Fig. 1).

The mammalian immune response following infection with parasitic helminths involves the innate immune response, including innate cells and coordinated epithelial release of alarmins (i.e., IL-25, IL33, TSLP) and chemokines, and differentiation of naive lymphocytes into several effector subsets. The cross-talk between innate and adaptive immune responses occurs via the participation of soluble mediators dominated by cytokines and chemokines, which are responsible for the recruitment

and activation of leukocytes, including neutrophils, macrophages, basophils to become mast cells, eosinophils, dendritic cells (DCs), natural killer (NK) cells, innate lymphoid cells (ILCs) and lymphocytes [8,9]. On the other hand, there is a significant gap in the literature on other important inflammatory molecules such as lipid-derived mediators, reactive oxygen species (ROS) and potential glycans in response to parasitic helminths. The balance between Th2, Th9, Th17, and, in some cases, Th1 immune responses, in addition to activation of regulatory T cells (Treg) and T follicular helper cells (Tfh), is critical for the control of the parasitic infection and immunopathology: the later can lead to an exacerbated inflammatory response, multi-organ involvement and failure, that can be fatal [10].

Helminth parasites are potent inducers of type 2 immunity, which is the dominant and mainstay protective immune response against these parasites, and is characterized by the production of IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13: cytokines that mediate antibody isotype switching to IgE and IgG₁ (mice) or IgG₄ (human) in B cells, hematopoiesis of eosinophils and basophils, expansion and activation of alternatively activated macrophages (AAMs) and mast cells, and goblet cell hyperplasia. CD4⁺ T helper (Th) 2 cells express the transcription factor Gata-3 and are important sources of these distinctive type 2 response cytokines, along with other leukocytes [6–9,14] (Fig. 2). Additional CD4⁺ T-cell effector subsets can participate in anthelmintic immunity. The Tfh cells that express the transcriptional factor BCL-6 are crucial for regulating the humoral response in type 2 immunity in the germinal center of secondary lymphoid organs [11].

A basic generalized paradigm

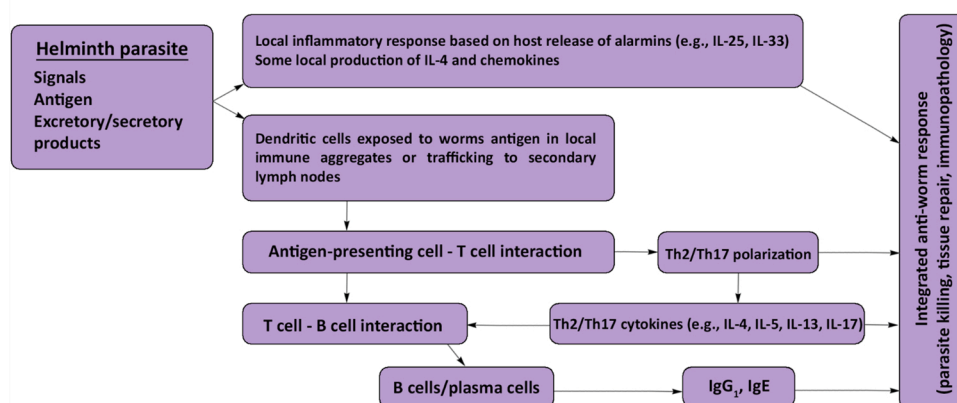


Fig. 2. . A basic generalized paradigm for immune reactivity after infection with a helminth parasite. Following infection, helminth parasites induce a local inflammatory response with the production of alarmins, chemokines and IL-4. In addition, dendritic cells exposed to worm antigens migrate into lymph nodes and present antigens to T cells. The activated Th2/Th17 immune responses, which involve the production of the Th2/Th17 cytokines and the production of IgE and IgG₁ result in an integrated anti-worm response (i.e., parasite elimination, tissue repair and immunopathology).

Th1 cells that express the transcriptional factor T-bet are generally associated with an anti-microbial response, but may play an essential role during the early stage and pathological inflammation of acute schistosomiasis and *Taenia crassiceps* infection. Th1 immune response is characterized by the production of IFN- γ and activation of innate immune cells, particularly macrophages [8,12]. Th9 cells were recently characterized via their production of IL-9 and the expression of the transcriptional factors PU.1 and IRF-4. The Th9 immune response has been associated with worm expulsion in *Trichuris muris*-infected mice and immunopathogenesis of murine schistosomiasis, despite no differences in the levels of the Th9 cytokines in the serum from acute and chronic schistosomiasis patients [13,14]. More studies are needed to clarify the role of the Th9 immune response in helminth infections in humans. The Th17 immune response is characterized by the production of pro-inflammatory cytokine IL-17A and the chemokine IL-8 (CXCL8). Th17 cells express the transcriptional factor ROR γ t and are involved in several neutrophilic inflammatory conditions at mucosal barrier tissues, including the acute stage of helminth infections [15–17]. Lastly, helminth infections can induce the expansion of Treg cells, characterized by the expression of the transcriptional factor Foxp3 and the production of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β , acting on protective immunity by suppressing the activity of other effector T cell subsets [8,9].

It is important to highlight that the role of eosinophils in helminth infections has been widely discussed due to conflicting evidence, with equally convincing data presented in favor of eosinophil responses being anti-helminthic or protective for the parasite. Some studies showed the capacity of eosinophil through the release of eosinophil granule products, such as Major Basic Protein (MBP) and eosinophil peroxidase (EPO), to kill helminth larvae in vitro in the presence of antibodies and complement [13]. However, distinct in vivo findings make this scenario more complex. Despite the toxicity of eosinophil granule proteins on both schistosomula and parasite larvae, eosinophil depletion had no significant impact on traditional measures of helminth disease in mice infected with *Schistosoma mansoni* [18,19]: granuloma, worm burden and egg content. Indeed, eosinophil depletion resulted in prolonged survival of larval forms of *Strongyloides stercoralis* [20], *Angiostrongylus cantonensis* [21] and *Ascaris suum* [22] in mice. Thus, while eosinophilia is a characteristic, if not a cardinal feature of infection with parasitic helminths, their exact role in the immune response is unclear. We surmise that as sub-types of eosinophils are defined via single-cell analytics, the multifaceted nature of the 'eosinophil' will emerge in host protection from infection with helminths, immunopathology in atopic conditions, and in promoting tissue recovery after infection or acute inflammation. The controversy on the role of eosinophils following infection with helminth parasites awaits resolution and will almost undoubtedly be host-parasite specific.

It is worth noting that helminth parasites are metazoan macro-pathogens and cannot be phagocytosed. Therefore, the host immune system uses humoral response against worms through antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mechanisms to eliminate parasites. ADCC occurs when effector cells (e.g., eosinophils, neutrophils) recognize specific antibodies bound to the parasite, such as IgE and IgG₁, resulting in a cytotoxic attack that promotes the parasite killing [23].

1.1. Chemokines in the context of helminth infections

Chemokines are central regulators of the immune response and tissue pathology. The immune system depends on coordinated cell migration, activation and interaction between multiple leukocyte populations, which are essential for initiating, maintaining and resolving the host's response to infection. Chemokines are small molecules (8–12 kDa) initially described as chemotactic cytokines, which play crucial roles in leukocyte biology by controlling cell recruitment and activation, under homeostatic and inflammatory states [24–26]. The chemokine system is complex and consists of approximately 50 ligands in humans and mice, divided into 4 subfamilies and distinguished by the position of two

Table 1

. Twelve factors that influence the translation of data from rodent-helminth laboratory model system.

Infection Paradigm	
1	Mice are typically given a bolus infection; people are more likely to get low dose infection or trickle infection over time (acute or protracted).
2	Experiments typically assess infection with a single species of helminth, whereas individuals in areas of endemic helminth infection are likely to be (or have been (see #3)) infected with other parasites (protozoan or helminth) or microbial pathogens (viral, bacterial fungal).
3	Laboratory mice have no history of infection, whereas from birth humans experience viral and bacterial infections that educate the immune system.
Individual Parameters	
4	Genetics – comparison of inbred strains of mice with 'identical' genomes with genetic heterogeneity in human populations.
5	Differences in the microbiome.
6	Age and Sex: while not exclusive, studies in mice have predominantly used males in an 8–16-week-old age range.
7	Host Health-specific pathogen-free (SPF) healthy mice are used in model studies whereas helminth-infected individuals may have a range of comorbidities (e.g., diabetes, obesity) that will affect immunity.
8	Medication – individuals can be on a range of medications (see #7) that can modulate the immune response to infection with helminth parasites.
The Immune System	
9	Putative differences in immune cell subtypes and immune receptor expression (innate immunity receptors, cytokine receptors, chemokine receptors).
The Environment	
10	Mice are housed in a 12 h:12 h light:dark cycle in a temperature-controlled sanitized environment; helminths are endemic in poor world regions often with poor sanitation and perhaps limited access to clean water (see #s 2 & 3).
11	Mice have free access to a standardized balanced chow diet, whereas humans range from obese to malnourished with variable intake of essential vitamins and minerals that affect immune development and activity.
12	Stress and the release of hormones and steroids vary widely in humans whereas animal housing facilities aim to reduce/eliminate stress in housed rodents.

cysteine residues adjacent to the amino-terminal region of the protein: C, CC, CXC and CX3C. Chemokines are generally promiscuous, with some capable of binding to as many as 20 signaling receptors (G protein-coupled receptors (GPCR)) on the cell surface, activating signal transduction pathways important for cell migration and other biological functions. For example, CCR2 can bind several CC family chemokines, such as CCL2, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13, CCL16, whereas CCR4 binds only to CCL17 and CCL22, while, to date the only known ligand for CXCR4 is CXCL12 [24–27]. In addition, a group of four atypical chemokine receptors also contribute to the chemokine system: ACKR1 (DARC), ACKR2 (D6), ACKR3 (CXCR7) and ACKR4 (CCX-CKR). These atypical receptors are structurally related to conventional receptors but use an alternative and non-canonical signal pathways triggered by GPCR activation that controls the chemokine gradient by decreasing chemokine levels through intracellular internalization and degradation, consequently down-regulating the inflammation [28].

Much of our knowledge about the immune system has been facilitated by studies in animal models, particularly in mice. Studies in mice have been carried out to investigate all aspects of the immune response, including cell-mediated immunity, the humoral response, innate and adaptive immunity, the traffic and the role of effector cells, the role of inflammatory mediators (e.g., cytokines and chemokines), the protective immune response against infectious agents and vaccine development. Animals are also used to model and mimic various inflammatory conditions in humans, such as acute and chronic infections, chronic and autoimmune disorders, in addition to the testing of drugs and vaccines to treat and prevent several diseases. The role of chemokines and their receptors is evaluated mainly by using experimental models, which allow the use of tools such as genetic knockout, neutralizing antibodies and chemokine receptor antagonists [27]. Although murine models have

been critical in investigating mechanisms of the immune response, as well as the role of chemokines in helminth infections, some relevant inherent factors that influence the translation of data from rodent-helminth laboratory model system to clinical application should be taken into account for better interpretation and comprehension of human infection (see Table 1). In contrast, most human studies involve measuring chemokines in plasma and serum to evaluate their participation in a range of pathological conditions. This approach suffers from being associative and not strictly identifying cause-effect relationships.

The participation of chemokines has been associated with several diseases and experimental models with a significant inflammatory component such as cancer [29], pulmonary fibrosis [30], arthritis [31], sepsis [32], obesity [33], asthma [34], and microbial and pathogenic infections [35–37]. Below, we discuss the main findings concerning relevant aspects of the role of chemokines in helminth infections, highlighting data from infected humans and results obtained through the use of experimental models of helminthiasis.

2. CC chemokines

2.1. CCL1 (I-309)

CCL1 binds with high affinity to the CCR8 receptor. CCR8 is expressed in steady states in humans and mice by monocytes/macrophages, thymocytes and Treg cells [26]. Moreover, studies have demonstrated that CCR8 is selectively expressed upon *in vitro* Th2 polarized cells [38,39]. Higher numbers of CCR8⁺ Th2 cells [40] and CCR8⁺ T cells [41] were found in the airway of asthmatic patients compared to control subjects. Therefore, the role of the CCL1-CCR8 axis has been investigated in several Th2 inflammatory diseases such as asthma [41], atopic dermatitis [42] and some helminth infections [43–45]. However, conflicting data from experimental models of asthma and human diseases make CCL1-CCR8's role controversial and uncertain. Some studies have demonstrated undetectable or low levels of CCR8-expressing cells in human peripheral blood lymphocytes [46], peripheral blood monocytes [47] and asthmatic sub-mucosa [48]. In contrast, other studies showed high CCR8 expression in asthmatic airway subjects [49]. Regarding murine models, some results suggest that CCR8 is not essential for the development of allergic airway inflammation [50,51]. In contrast, other studies have demonstrated the importance of CCR8 in the production of Th2 cytokines and mucus [45, 52]. Possible explanations for these discordant results about the subtypes of leukocytes expressing CCR8 and their role in Th2 inflammatory diseases include: limited availability of highly selective CCR8 monoclonal antibodies and inherent differences in allergic airway diseases models (e.g., OVA-*in vivo* allergic airway inflammation, chronic fungal asthma, bleomycin-induced inflammation).

Few studies have demonstrated the role of the CCL1-CCR8 axis in helminth infections. Chensue et al. demonstrated that CCR8-deficient mice exhibited impaired Th2 cytokine production and eosinophil recruitment after *S. mansoni* soluble egg antigen administration. These mice had reduced IL-5 and IL-13 (transcripts and protein) and increased levels of IFN- γ mRNA in their lungs and draining lymph nodes cultures. Moreover, increased levels of IFN- γ protein were also detected in draining lymph nodes. In contrast, transcripts and protein levels of IL-4 in the lungs and draining lymph nodes cultures were unchanged [45]. The same investigators performed the same experimental model of *S. mansoni* infection in CCR8-deficient mice and showed decreased levels of IL-10 and transcripts for CCR8 in IL-10-producing T cells. Adoptive transfer of sensitized CD4⁺ T cells from wild-type (WT) into CCR8-deficient mice to re-established the typical Th2 immune response after administration of *S. mansoni* eggs [43].

Recently, Knipfer et al. studied the role of the CCR8 receptor in the biological functions of ILC2s. In summary, the production of CCL1 protein was detected in supernatants of *in vitro*-expanded murine WT ILC2s upon stimulation with IL-2, IL-7 and IL-33. However, in transwell

chemotaxis assays, CCL1 showed no chemotactic activity for ILC2s. CCL1 did not cause ILC2 migration, but it was essential to support their expansion and maintenance *in vitro* after alarmin-mediated activation, suggesting an important ILC2 function in an auto-/paracrine manner. Furthermore, they infected C57BL/6 and CCR8-deficient mice with the parasitic nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*, to analyze the functional role of the CCL1-CCR8 axis *in vivo*. WT mice had increased serum levels of CCL1 and high expression of CCR8 in isolated ILC2s. On the other hand, CCR8-deficient mice exhibited increased egg production and worm numbers in the small intestines. In addition, these animals had no strong mRNA expression of CCL1 and decreased levels of ILC2s and eosinophils in the lungs. The impaired Th2 immune response in CCR8-deficient mice infected with *N. brasiliensis* was accompanied by decreased IL-5, IL-13 and IL-9 transcripts in the lungs and small intestines [44].

Taken together, these results indicate that the CCL1-CCR8 axis is important for the development of an efficient Th2 immune response during helminth infections. Unlike the controversial and uncertain data from human asthmatic patients and experimental models of asthma, results from experimental models of helminthiasis seem to be more consistent and more straightforward. However, few studies in this context make a deeper investigation of both the parasites already studied and of several other relevant infections necessary. As we mentioned before, these conflicting data may also be related to the different experimental conditions. Helminth infections and administration of parasite antigens likely induce a much stronger Th2 response than the induction of allergic airway inflammation by OVA. While the induction of the experimental model of asthma often requires susceptible mouse strains, the use of adjuvants, and even multiple challenges with OVA, the induction of a robust immune response triggered by helminth infections often occur with just a single infection or antigen administration.

2.2. CCL2 (MCP-1)

CCL2 interaction with the CCR2 receptor is essential for monocyte migration into peripheral tissues in several inflammatory conditions [53], as well as recruiting lymphocytes [54], NK cells [55], and other leukocytes [56]. Analyses have shown that CCL2 also influences adaptive immunity through T helper cell polarization [57]. An important study demonstrated that CCL2-deficient mice immunized with trinitrophenol-derivatized ovalbumin in incomplete Freund's adjuvant could not mount Th2 responses. Lymph node cells from the CCL2-deficient mice produced low IL-4, IL-5, and IL-10 cytokine levels. Consequently, these mice had decreased serum levels of IgG₁ and did not perform immunoglobulin subclass switching typical of Th2 responses [58].

Participation of CCL2 in human and experimental models of schistosomiasis has been repeatedly demonstrated [59–61]. CCL2 levels can be elevated in the plasma of *S. mansoni*-infected patients [59], where it has been considered a potential early biomarker for schistosome-related nephropathy and renal damage [62,63]. Murine studies indicate the importance of CCL2 in the synchronous formation of pulmonary granuloma in response to *S. mansoni* eggs. *S. mansoni*-infected mice produce elevated levels of CCL2 during secondary egg granuloma formation associated with increased CCL2 mRNA transcripts. In addition, the administration of neutralizing anti-CCL2 antibodies reduced the secondary granuloma size, and T cell depletion indicated that CCL2 production in the secondary granuloma was regulated by T cells [64]. Similarly, CCL2-deficient mice exhibited a 40% reduction in secondary granuloma compared to WT mice after administration of *S. mansoni* eggs [65]. Warmington et al. demonstrated that the CCL2-CCR2 axis contributes to type-2 granuloma formation during *S. mansoni* infection in mice. The infected CCR2-deficient mice were characterized by impaired monocyte and macrophage recruitment, decreased expression of IL-4 mRNA and delayed onset of procollagens I and III (gene transcripts),

indicative of an essential role for CCL2 in the healing or resolution phase of granuloma formation [66].

Several studies have shown the importance of CCL2 in echinococcosis. Early studies demonstrated that *Echinococcus granulosus*-infected mice produced elevated levels of CCL2 in a time-dependent manner [67, 68]. Furthermore, CCL2 gene expression was up-regulated in sheep intestine four hours after infection with *E. granulosus* [69]. In addition, Dreweck et al. presented an in vitro model for *E. multilocularis* to model chemokine responses in alveolar echinococcosis patients. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultivated in vitro with viable proliferating *E. granulosus* metacystode vesicles (*Em*-vesicles) and autologous sera, followed by cytokine and chemokine production detection. The results showed that early developmental stages of *E. multilocularis* infection could stimulate alveolar echinococcosis patients to produce CCL2 in response to *Em*-vesicles [70]. CCL2 production has also been reported in other cestode infections. In an experimental model of murine neurocysticercosis, CCL2 positive cells increased in the brain extra-parenchymal infiltrate (subarachnoid spaces, meninges, and ventricles) after *Mesocestoides corti*-mice infection [71]. Uddin et al. documented that cysticerci antigens of the pig tapeworm, *Taenia solium*, can drive CCL2 production by human monocytes [72]. Recently, increased levels of CCL2 in the brains of humans [73] and swine [74] have been reported during neurocysticercosis.

The involvement of CCL2 has also been associated with a strong Th2 immune response provoked by nematode infections in murine models, such as *T. muris* [75], *Trichinella spiralis* [76], *A. suum* [10], *N. brasiliensis* [77] and *A. cantonensis* [78,79], all resulting in increased levels of CCL2. Intestinal epithelial cells were important sources of CCL2 in mice infected with *N. brasiliensis* [77] and *T. muris* [75]. Interestingly, mice naturally resistant to *T. muris* (BALB/c mouse strain) produce elevated serum levels of CCL2 following infection. In contrast, mice naturally susceptible to *T. muris* (i.e., AKR mouse strain) have a delayed and lower serum production of CCL2 than BALB/c mouse. In addition, CCL2-deficient mice are unable to expel the parasite, and this correlated with reduced Th2 responses and increased Th1 immunity, characterized by low levels of IL-4 and high levels of IFN- γ and IL-12 [80]; again, supporting the postulate that CCL2 is an essential chemokine involved in promoting Th2 immune responses triggered by infection with helminth parasites.

Collectively, these data suggest that the ability to regulate CCL2 production (either provoking or suppressing its production), enhancing or neutralizing its activity could be used to promote anti-worm defenses and limit immunopathology, such as hepatic and splenic granuloma formation following infection with *S. mansoni*. However, there is a practical limitation to this theoretical position, that applies equally to extrinsic/medical modulation of any chemokine/chemotactic signal: timing is likely critical. An exact (and perhaps individualized) data on the kinetics of CCL2 synthesis during the acute and chronic stages of infection of humans with specific helminth parasites is needed to develop a rational CCL2-based treatment strategy.

2.3. CCL3 (MIP-1 α) and CCL5 (RANTES)

CCL3 and CCL5 are considered promiscuous inflammatory/inducible CC chemokines that bind with high affinity to the CCR1 and CCR5 receptors expressed in various cell types, including monocytes and macrophages, T and B lymphocytes, neutrophils, NK cells, DCs and Tregs [24–26]. Consequently, mobilization of the CCL3/CCL5-CCR1/CCR5 signaling axis has been explored during helminth infections, especially in schistosomiasis. An early study revealed that CCL3 was released after embolization of schistosome eggs into the lungs of immunized mice. Immunohistochemical localization of CCL3 identified the macrophage as the primary source of CCL3 in granuloma development. In addition, antibody-mediated neutralization of CCL3 decreased granuloma size in the mouse lung [81]. In accordance, Gao et al. using CCR1-deficient mice, showed that the size of a pulmonary granuloma was 40%

smaller than those in wild-type mice after *S. mansoni* eggs administration [82]. A significant reduction in granuloma area and cell recruitment were found in *S. mansoni*-infected CCL3-deficient mice, along with lower parasite burden and egg content [83]. These data from experimental models of schistosomiasis indicate that the CCL3/CCR1 axis contributes to the severity of pathology during *S. mansoni* infection. Studies in humans reinforce this position, showing increased amounts of CCL3 in plasma from individuals chronically infected with *S. mansoni* [83].

On the other hand, signaling through the CCR5 receptor may oppose the role to CCL3/CCR1 activity. Souza et al. demonstrated that in the absence of CCR5, *S. mansoni* infection could become highly severe in mice, as shown by a liver pathology, larger granulomas and reduced number of FoxP3⁺ Treg cells and increased mortality rate [84]. The regulatory effect of CCR5 during schistosomiasis was related to the CCL5/CCR5 axis due to the inhibitory effects on granuloma and fibrosis [85].

Some studies have reported the participation of CCL3 and CCL5 in cestode infections. For instance, increased production of CCL3 and CCL5 by PBMCs in human alveolar echinococcosis has been reported [86]. Cysticerci antigens of *T. solium* applied to human monocytes in vitro can elicit CCL3 production [72], and following these data elevated CCL3 levels were detected in cerebrospinal fluid samples from neurocysticercosis patients [73]. The expression of both CCL3 and CCL5 were also observed in swine neurocysticercosis [74] and murine experimental neurocysticercosis [71]. Furthermore, elevated levels of CCR5 on the cell surface in F4/80⁺ murine peritoneal cells (macrophages) were also found following chronic infection with *T. crassiceps*. Macrophages recruited following infection in STAT-6-deficient mice express levels very similar to those in uninfected mice [87]. Since that STAT-6 is a central transcription factor involved in the IL-4 signaling cascade that promotes expression of the Th2 master regulator GATA-3 [88], the CCR5 receptor expression in macrophages during *T. crassiceps*-infection could indicate a possible role in Th2 immune response triggered by helminths. The mechanisms involving the macrophages and this chemotactic pathway need to be better explored.

The participation of CCL3 and CCL5 chemokines has, not unexpectedly, been demonstrated with nematode infections. Elevated serum levels of CCL5 were found in rats infected with *T. spiralis* (mRNA expression) [89] and *T. zimbabwensis* (protein) [90]. Similarly, CCL5 production was increased in the lungs of *A. suum*-infected mice [10], in the bronchoalveolar lavage (BAL), plasma and brain of *Toxocara canis*-infected mice, and in the brain of *A. cantonensis*-infected mice [78]. Mice and rats infected with *A. cantonensis* showed increased levels of CCL3 and CCL5 in the brain and blood, associated with increased eosinophilia. However, the kinetics of chemokine production and eosinophil recruitment differs between rats and mice. Only milder eosinophilic inflammation and a late rise of CCL3 and CCL5 (after 21 days post-infection (dpi)) were found in rat brains. In contrast, early eosinophilia and chemokine production was observed in mouse brains (after 7 dpi) [79]. In addition, increased levels of CCR5 mRNA expression were found in the muscle [91] and lungs [92] of mice infected with *T. spiralis*, whereas the expression of CCR5 in the intestine of infected mice did not change over time [91].

Moreover, mice immunized intraperitoneally with the allergenic protein derived from an extract of adult *A. suum* worms (designated APAS-3) developed a Th2 immune response, characterized by eosinophilic airway inflammation, increased levels of plasma IgE antibody and increased levels of CCL5, IL-4 and IL-5 in broncho-alveolar lavage (BAL) fluid [93]. Another study showed increased CCL5 production by human DCs exposed to the intravascular *Brugia malayi* microfilaria parasite stage [47]. In contrast, individuals infected with *S. stercoralis* had significantly lower blood levels of CCL3 and CCL5 compared with healthy control subjects [94].

CCL3 and CCL5 are promiscuous chemokines that bind to the CCR1/CCR5 receptors and are involved in host immunity against parasitic helminths. However, the exact role of CCL3 and CCL5 is challenging to

access and remains unclear. It depends on which receptor they bind to, stage of infection, parasitized tissue, and species of parasite. Therefore, the regulation of CCL3 and CCL5 needs significantly more research to provide a fuller understanding of their specific roles in this chemokine axis in the context of human strongyloidiasis, and indeed helminth infections in humans in general.

2.4. CCL11 (Eotaxin-1), CCL24 (Eotaxin-2) and CCL26 (Eotaxin-3)

The eotaxins CCL11, CCL24 and CCL26 are the main eosinophil-specific chemoattractants. These chemokines are the most potent and selective CCR3 receptor agonists, identified initially as eosinophil chemoattractant [26], which is also expressed in basophils and mastocytes and involved in the Th2 immune responses [95]. The role of eosinophils has been most explored in the context of asthma, atopic disease and helminthic diseases, and the cells migrate in response to gradients of CCL11/CCL24/CCL26, the ligands for CCR3. As discussed earlier, eosinophilia is a hallmark featured during helminth infections, but how important is the role of eosinophils in worm expulsion remains unclear. These eosinophilic chemoattractants are released by direct stimulation of innate immune cells and are produced by exposure to Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13 [24]. Moreover, IL-5 produced by ILC2 and Th2 cells is an essential factor that triggers eosinophilia and plays a central role in eosinophil development, activation and survival [96].

The CCL11/CCL24/CCL26-CCR3 axis has been highlighted in several nematode infections. While the absence of CCR3 did not affect the capacity of mice to induce peripheral blood eosinophilia in response to *T. spiralis* infection, a CCL11-CCR3 interaction was critical at the vascular endothelium to facilitate adhesion, trans-endothelial migration and accumulation of eosinophils in the jejunal submucosa during experimental trichinosis. In addition, CCR3-deficient mice had an increased *T. spiralis* larval burden in skeletal muscle associated with a lack of eosinophil accumulation [97]. Dixon et al. identified a role for CCL11 in murine gastrointestinal eosinophilia in response to infection with *T. spiralis* and *T. muris*. They noted redundancy in the system, where CCL24 could compensate for the absence of the CCL11 to recruit eosinophils [98].

Regarding ascariasis, increased levels of CCL11 were found in the caecal mucosa of pigs [99] and the serum of mice [10] infected with *A. suum*. In addition, the expression of CCL11 and CCL26 was highly upregulated in the lungs of *A. suum*-infected pigs [100]. Corroborating these findings, Itami et al. demonstrated that mice immunized intraperitoneally with the *A. suum* allergenic protein, APAS-3, produced elevated levels of CCL11, IL-4 and IL-5 in BAL, which underlies airway hyper-responsiveness and eosinophilia [93]. In addition, PBMCs from individuals infected with *A. lumbricoides* were challenged in vitro with worm antigens and produced CCL24. Intriguingly this chemokine response was only observed in PBMCs for adults and the elderly and not in neonates or children, highlighting the gradual expansion of the anti-parasite-specific immune response repertoire [101]. A recent study revealed that CCL24 was the most upregulated gene in macrophages exposed to serum from *A. suum*-infected pigs or *A. lumbricoides*-infected patients [102]. Taken together, these data suggest that macrophages are an important source of CCL24, which assists the subsequent recruitment of eosinophils in ascariasis.

A recent investigation using *B. malayi*-infected mice showed that macrophages are essential to mediate immunity against this filarial helminth via amplifying and sustaining CCR3-dependent tissue eosinophilia [103]. Other studies have shown the participation of the CCL11/CCL24/CCL26-CCR3 axis in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus* [104], *S. stercoralis* [105], *T. canis* [106] or *A. cantonensis* [79] underlying eosinophilia. Furthermore, both CCL11 and CCL24 chemokines were significantly elevated in mouse brains at the late phase of *A. cantonensis* infection [78]. In contrast, the recruitment of eosinophils to the brain and spinal cord in eosinophilic meningitis in patients with angiostrongyliasis may have been the outcome of elevated CCL24 levels

[107]. Following treatment with the anthelmintic ivermectin, the increase in CCL24 in patients with onchocerciasis (river blindness caused by *Onchocerca volvulus*) was correlated with parasite elimination and eosinophil activity [108].

Concerning human trematode infection, increased CCL11 levels were reported in pleural effusion samples from individuals infected with the trematode *Paragonimus westermani* [109]. Moreover, increased serum levels of CCL11 and CCL24 were found in patients with schistosomal myeloradiculopathy (SMR), the most common neurological manifestation of *S. mansoni* infection. In the context of SMR, the expression of the CCL11/CCL24/CCL26-CCR3 axis may be further evidence for the role of Th2 lymphocytes in the pathogenesis of schistosomiasis [110]. Others have corroborated elevated serum levels of CCL11 [111] and CCL24 [59] during human *S. mansoni* infection. Using experimental infection in mice with *S. mansoni* egg-antigen-induced granuloma formation, it was shown that CCL11 levels and the number of eosinophils were highly up-regulated in the lungs [112]. In addition, CCL11 and CCL24 were up-regulated in the liver of mice infected with *S. japonicum*, with the accumulation of eosinophils in the organ [113,114]. However, the levels of CCL11 and CCL24 were unchanged or undetectable in the spleen of *S. japonicum*-infected mice [114], suggesting that the production of CCL11 and CCL24 during the experimental model of schistosomiasis is tissue-specific and species-dependent.

Regarding cestodes, elevated concentrations of CCL11 and IL-5 have been found during human neurocysticercosis [115]. Moreover, higher CCL11 expression was associated with the cyst's response after albendazole therapy in swine neurocysticercosis. This study hypothesized that the destruction of cysticerci by anthelmintic treatment exposed larval antigens, which induced a pro-inflammatory immune response with subsequent pathology [74]. Regarding *E. granulosus* human infection, in vitro production of CCL11, CCL24 and CCL26 by PBMCs was higher in patients with progressive alveolar echinococcosis [116]. Of importance, the cysteine protease contained in metacystode antigens of *E. multilocularis* inhibited the chemoattractant activity of CCL11 in mice, suggesting that CCL11 inactivation may contribute to the absence of eosinophils in the peritoneal cavity of infected mice [117]. Thus, although the role of eosinophils in killing parasites remains uncertain, it is clear that helminth infection in humans and mice elicits strong activation of the CCL11/CCL24/CCL26-CCR3 axis as a component of Th2 immunity with the potential to serve as an orchestrator or effector in the elimination of the parasite.

2.5. CCL17 (TARC) and CCL22 (MDC)

CCL17 and CCL22 are recognized by CCR4, which is upregulated by IL-4 and is expressed on Th2 cells, Treg cells, and Th17 cells, among others (CCR4 is also expressed on platelets and mediates their activation) [26,118]. Considering the predominance of CCR4 expression on Th2 cells, the role of the CCL17/CCL22-CCR4 axis has been demonstrated in the context of allergic diseases such as asthma [119], dermatitis [120], eosinophilic pneumonia [121] and following infection with helminth parasites.

Regarding the role of the CCL17/CCL22-CCR4 axis in schistosomiasis, Jakubzick et al. showed that both CCL17 and CCL22 are critical for developing the aggressive Th2 pulmonary granulomatous response in mice infected with *S. mansoni*. In this study, CCL22 expression was increased after pulmonary embolization by schistosome eggs. Immunoneutralization with anti-CCL22 antibodies decreased the number of CCR4-positive cells in the lungs by reducing the granuloma size. Moreover, neutralization of both CCL22 and CCL17 reduced collagen deposition, as quantified by lung hydroxyproline content, and attenuated the eosinophilia in the lung [122]. Burke et al. reported elevated CCL17 expression in the lungs of *S. japonicum*-infected mice [123]. In human schistosomiasis, some studies have also shown increased CCL17 levels in serum, particularly in patients with severe *S. mansoni*-infection [111,124]. Increased CCL17 levels have also been noted in pleural

effusion samples from individuals infected with the trematode, *P. westermani* [109].

Other studies have shown the participation of CCL17 and CCL22 during cestode infections [125,126]. The role of the CCL17/CCL22-CCR4 axis in human alveolar echinococcosis (AE) is controversial and remains uncertain. Studies showed that *E. multilocularis* antigen-stimulated PBMCs from AE patients and healthy individuals had increased production of CCL17 and CCL22 [86,125]. However, Hübner et al. found that antigen-stimulated PBMCs from healthy individuals produced higher CCL17 levels and lowered CCL22 levels compared to antigen-stimulated PBMCs from AE patients [125], Kocherscheidt et al. pointed out the opposite, i.e., antigen-stimulated PBMCs from healthy individuals produced higher CCL22 levels and lowered CCL17 levels when compared to antigen-stimulated PBMCs from AE patients [86]. In contrast, Wang et al. demonstrated an increased liver CCL17 and IL-4 expression during the middle stage of *E. multilocularis* in mice [126].

Concerning nematode infections, up-regulation of CCL17 and CCL22 in the liver of *A. suum* infected pigs treated with low doses of all-trans retinoic acid (ATRA) has been shown. Furthermore, alveolar macrophages from the infected pigs treated with ATRA in vitro increased the production of both CCR4 ligands [100]. Skalleup et al. showed significant upregulation of CCL17 and IL-13 in the *A. suum* resistant pig genotype but not in the susceptible pig genotype [127]. In human filarial infection, elevated levels of CCL17 and CCL22 have been found in the serum of *O. volvulus*-infected patients. Also, CCL17 and CCL22 were increased transiently shortly after ivermectin treatment, contributing to the rapid parasite elimination [128]. In addition, microfilariae of *B. malayi* induced CCL17 and CCL22 expression in vitro by human macrophages, similar to those phenotypes induced by IL-4 [129]. In murine filariasis, caused by *Litomosoides sigmodontii*, genetic depletion or neutralization of CCL17 resulted in higher worm load and more skin mast cells, associated with increased vascular permeability. This suggests that CCL17 exerts an essential role during innate immunity influencing mast cell regulation of vascular permeability and consequent filarial worm migration [130]. Therefore, the CCL17/CCL22-CCR4 axis triggered in response to parasitic helminths may be necessary for promoting Th2 immune responses, parasite elimination and the manifestation of chronic inflammation with fibrosis and pulmonary granuloma formation.

2.6. CCL19 (MIP-3 β /ELC) and CCL21 (6Ckine/SLC)

CCL19 and CCL21 are considered homeostatic CC-chemokines, constitutively expressed within secondary lymphoid tissues, regulating the trafficking of T and B lymphocytes and DCs. CCL19 and CCL21 are the only CCR7 ligands. In addition, CCR7 is critical for developing lymphoid organs and efficient adaptive immune responses. CCR7 expression is dynamically regulated in DCs: upon antigen exposure and maturation, DCs down-regulate the expression of inflammatory chemokine receptors and up-regulate CCR7. In contrast, CCR7 expression is down-regulated upon T-cell polarization into Th1 or Th2 effector subsets [26,131]. However, despite the importance of homeostatic chemokines in lymphocyte and DCs trafficking, little is known about the role of the CCL19/CCL2-CCR7 axis during helminth infections.

Burke et al. showed B and T cell accumulation along with an increase of the CCL19 and CCL21 in the liver of *S. japonicum*-infected mice [113]. Further, it was demonstrated that a loss of B and T cells was associated with decreased levels of CCL19 and CCL21 in the spleen of the infected mice. These findings suggest a role of these homeostatic chemokines in the cellular migration of B and T cells from the spleen to the liver in schistosomiasis [114]. Moreover, another study demonstrated that hepatic stellate cells contributed to CCL21 production during the inflammatory and fibrotic stages of murine schistosomiasis [132]. In addition, splenic T cells of *S. mansoni*-infected mice had decreased responsiveness to CCL21 than T cells from control mice, despite CCR7 being expressed

at similar levels in both groups [133].

Several studies have demonstrated the immunosuppressive mechanisms related to the impairment of DC function during infection by *T. spiralis* [134], *S. mansoni* [135], *T. suis* [136], *A. suum* [137] and *A. lumbricoideis* [138]. Indicative of the importance of CCR7 in DC homing to lymph nodes upon antigen exposure, Napoletano et al. showed that the nematode *Anisakis pegreffii* was able to impair the maturation, differentiation and migration of human DC. The results showed down-regulation in markers of differentiation lineage (CD83), costimulatory molecules (HLAII- DR and CD86) and CCR7 expression in the presence of live larvae and crude extracts co-cultured with monocyte-derived DCs [139]. These results may indicate the importance of the CCL19/CCL21-CCR7 axis in the immunomodulatory effects of *A. pegreffii* infection, suggesting an immobilization of DCs in the tissue after antigen exposure, which could impair the activation and differentiation of B and T cells in lymph nodes and the development of an effective type 2 immune response against the parasite.

3. CXC chemokines

3.1. CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2) and CXCL8 (IL-8)

CXCL8 (human IL-8) is a member of the CXC chemokine family that binds to the CXCR1 and CXCR2 receptors, primarily associated with neutrophil trafficking and angiogenesis. In addition, other leukocytes including monocytes, lymphocytes, mast cells, NK cells, basophils and non-leukocyte cells such as endothelial cells express CXCR1 and CXCR2. However, mice lack a direct homolog of CXCL8. CXCL1 and CXCL2 are the best-characterized CXCL8-related mouse CXC chemokines; both bind only to CXCR2 [26,140].

The Th17 immune response plays an essential role during helminth infections such as ascariasis [141], trichuriasis [142] and schistosomiasis [17], which is characterized by the production of IL-17 and consequent recruitment of neutrophils through the interaction of CXCL8/CXCL1/CXCL2 chemokines [143]. Even though typically related to bacterial and viral resistance, neutrophils have also been linked with helminth infections due to their capacity to act as effector cells, even killing larvae [13,144]. Several studies have been conducted to explore the role of CXCL8-CXCR1/CXCR2 in humans and the CXCL1/CXCL2-CXCR2 axis in mice during helminth infections.

Studies have shown that neutrophils are required for larval killing during the innate immune response against parasites, at least in part via a myeloperoxidase-dependent mechanism [144]. A significant neutrophil deficit and increased larval survival were observed in CXCR2-deficient mice infected with *S. stercoralis* [145]. Interestingly, *S. stercoralis* soluble extract induced neutrophil migration through CXCR2 using a similar pathway of the host chemokines. These molecules extracted from the parasite also induced neutrophils to produce CXCL1 and CXCL2, further enhancing the neutrophilic response [146]. Moreover, *S. stercoralis* soluble extract also induced eosinophil migration that was inhibited in a dose-dependently manner by the CXCR2 antagonist SB225002 [105]. In contrast, a proteoglycan in a somatic extract of the tapeworm *Hymenolepis diminuta* inhibited murine neutrophil migrations towards CXCL1 in vitro, which was p38 MAP-kinase dependent [147].

Studies have also reported the involvement of CXCL2 and CXCL8 in nematode and cestode infections. For example, murine DCs partially matured by *A. lumbricoideis* pseudocoelomic body fluid produced CXCL2, IL-6 and IL-12p40 [138]. In human filariasis, DCs produced CXCL8 after exposure to live *B. malayi* intravascular microfilariae [148]. Also, increased CXCL2 levels in mice 10 days after *T. spiralis* infection [67,76] and four hours and 100 days after *E. granulosus* infection have been reported [69]. Participation of CXCL8 has also been reported in human echinococcosis [70].

Regarding trematode infections, the granulomas induced by *S. japonicum* eggs in mice consist of numerous neutrophils in the core of hepatic granulomas. The neutrophils are associated with pro-

inflammatory cytokines and chemokines, including CXCL1 and CXCL2, that contribute to a local inflammatory response [149]. Furthermore the *S. japonicum* egg-specific protein SjE16.7 promoted neutrophil chemotaxis in vivo, which was essential to induce hepatic granuloma formation in mice [150]. In addition, *S. mansoni* egg embolization induced significant expression of CXCL1 and CXCL2 in mouse lungs [112]. In human schistosomiasis, higher levels of CXCL1 were found in the serum of *S. mansoni*-egg-positive Sudanese compared to uninfected individuals [151]. Interestingly, *S. mansoni* eggs can secrete a chemokine-binding protein termed SmCKBP. This protein binds specifically to CXCL8 and blocks its interaction with CXCR1 and CXCR2, consequently limiting pro-inflammatory effects and neutrophil recruitment, as an immune evasion strategy [152]. Two excretory-secretory products from the trematode *Fasciola hepatica*, cathepsin L and sigma class GST, partially activate DCs to secrete CXCL2, IL-6 and IL-12p40 [153]. Lastly, elevated levels of CXCL8 were associated with neutrophilia and found in pleural effusion samples from *P. westermani*-infected patients with emphyema [109].

It is indisputable that, upon activation, neutrophils are central players in host immunity during helminth infections, both in early-stage acute inflammation and in chronic infection. Neutrophils are rapidly recruited after the worm invades tissue and can directly contribute to parasite killing through the release of cytotoxic MPO granules. Apoptotic neutrophils together with IL-4 and IL-13 are also crucial for developing a tissue repair environment associated with the differentiation of alternatively activated macrophages (AAMs) in later stages of infection [154]. Another critical point to highlight is that the recruitment of neutrophils via CXCL8-CXCR1/CXCR2 signaling in humans and CXCL1/CXCL2-CXCR2 in mice is a hallmark of the Th17 immune response. Recently, the participation of Th17 and Th2 cells has suggested a mixed response profile during helminth infections. While neutrophils play a protective role, they are also responsible for pathogenic outcomes (e.g., tissue damage, granuloma formation). However, how the participation of the CXCL1/CXCL2-CXCR2 and CXCL8-CXCR1/CXCR2 axes in the protective and pathological mechanisms during Th17 immune responses triggered by parasitic helminths is not well understood, and rather than be overlooked, is deserving of more significant research efforts.

3.2. CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) and CXCL11 (I-TAC)

CXCL9, CXCL10 and CXCL11 are inflammatory chemokines induced by IFN- γ and therefore intimately involved in Th1 type immunity. These chemokines are recognized by CXCR3, which is principally expressed by activated T lymphocytes, NK cells, plasmacytoid DCs and B cells subsets [26]. Several studies have shown an essential role of the CXCL9/CXCL10/CXCL11-CXCR3 axis in the pathophysiology of Th1 predominant diseases such as viral infection [155], protozoan infection [156], inflammatory bowel disease [157] and autoimmune disease [158]. However, CXCR3 ligands act as natural antagonists of the CCR3 receptor, which can down-regulate CCR3-mediated cell responses that can be mobilized in response to infection with parasitic helminths [159]. Despite its important function in the antagonism of CCR3 signaling, the role of the CXCL9/CXCL10/CXCL11-CXCR3 axis has been poorly explored in the context of helminth diseases.

Some studies have shown no significant production of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in human or experimental schistosomiasis [124], while another report showed the expression of all three chemokines in *S. japonicum*-infected mice. In the latter study, hepatic stellate cells (HSCs) up-regulated CXCR3 expression and the respective ligands at three weeks post-infection. In contrast, six weeks post-infection both receptor and chemokine expressions were down-regulated. The down-regulated pattern during the peak of egg granulomas was associated with inhibitory effects of *S. japonicum* soluble egg antigen. In addition, CXCL9 and CXCL10, but not CXCL11, inhibited the expression of fibrosis-associated genes Col1 α 1, α -SMA and Col3 α 1, in

non-parenchymal cells and HSCs, suggesting their potential antifibrotic role in murine experimental schistosomiasis [132]. Interestingly, eosinophils from the peritoneal exudate of *S. japonicum*-infected mice favor the expression of CXCR3 over CCR3, suggesting the importance of CXCR3 and its ligands in the context of *S. japonicum* egg-induced liver granuloma in mice [160]. Moreover, the *Schistosoma* spp. rSm29 or rSh-TSP-2 proteins reduced CXCL9 production by PBMCs from patients infected with the HTLV-1 virus [161].

Concerning nematode infections, Klaver et al. suggested an important role of parasite antigens in modulating the expression of inflammatory chemokines. They showed that soluble products from *T. suis* suppress the production of CXCL9 and CXCL10 by human DCs [136]. Additionally, NK cells expressed higher levels of CXCR3 only in male IL-4-deficient mice infected with *T. muris* as a result of enhanced IFN- γ levels and Th1 cell-dependent interactions [162]. Moreover, it has been shown that CD4⁺ CD62L^{low} T-cells can migrate into the large intestine. However, this migration occurs even after neutralizing CCR6 and CXCR3 during *T. muris*-infection in mice, suggesting that other chemokine receptors expressed by CD4⁺ T cells compensate and induce cell migration [163]. Finally, in ascariasis, Gazzinelli-Guimaraes et al. showed increased CXCL10 levels in the lungs of mice during primary exposure to *A. suum* [10]. Assessment of human ascariasis, revealed increased CXCL9 and CXCL11 serum levels with a typical range in patients infected with *A. lumbricoides*. Indeed, humans coinfecting with *A. lumbricoides* and hookworms displayed higher levels of CXCL9 than patients with either single infection [164].

Some parasitic helminths such as *Schistosoma* spp. [165], *T. crassiceps* [12], *T. muris* [166] induce a Th1 immune response, mainly in the early phase of the infection, which is characterized by an intense local inflammatory response with an increase in IFN- γ , IL-12, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, resulting in recruitment and activation of macrophages, DCs, NK cells and Th1 lymphocytes. However, few studies have investigated the role of these chemokines in the context of helminthiasis. Some results have shown no production of these chemokines, while others report an increase after infection by parasitic helminths. Therefore, further studies that explore determinant variables such as chemokine production kinetics and specific parasite species are needed to fully explore the role of the CXCL9/CXCL10/CXCL11-CXCR3 axis, since Th1 immune responses occur in a species- and time-dependent manner.

3.3. CXCL13 (BLC)

CXCL13, like many CXC-chemokines, is constitutively expressed in secondary lymphoid tissues, regulating the trafficking of T and B lymphocytes, and DCs. CXCL13 is the only CXCR5 ligand and has similar functions to CCL17 and CCL19 previously discussed [26]. However, little is known about the role of the CXCL13-CXCR5 axis in helminth infections.

Increased CXCL13 production can be coincident with consequent B and T cell accumulation in the liver of *S. japonicum*-infected mice [113]. Loss of B and T cells from the spleen of infected mice was associated with decreased levels of CXCL13 [114]. These results support the role of the CXCL13-CXCR5 axis in the migration of B and T cells from the spleen to the liver in schistosomiasis. However, unequivocal statements on this possibility await in vivo tracker studies. Murine DCs can display up-regulation of CXCR5 expression following infection with the nematode *H. polygyrus*. In this study, mice treated with CXCL13 neutralizing antibodies or CXCR5 depletion had impaired Th2 and Tfh cell responses in the lymph nodes and peripheral tissues [167]. Thus, the activation of this chemokine axis was deemed necessary to develop the Tfh and Th2 immune responses in response to infection with *H. polygyrus*.

The CXCL13-CXCR5 axis is involved in the recirculation of CXCR5⁺ expressing lymphocytes and mobilization of DCs following antigen presentation, which could suggest several roles during helminth infections, such as the development of an efficient specific Th2 immune response, associated with T cell and B cells interaction and subsequent

production of IgG₁ and IgE. Nevertheless, the role of this chemokine signaling pathway is barely explored in this context. It needs to be thoroughly investigated in several experimental models of relevant parasite species and human diseases, directed towards the investigation of the kinetics of production of chemokines and cytokines, as well as the kinetics of CCR5 expression in lymphocytes and DCs following helminth infections.

4. Future directions

The chemokine system is complex and redundant, with various ligands that bind promiscuously to several chemokine receptors. As illustrated in this review, several studies have reported the participation of chemokines in a plethora of immune pathologies, including infection with parasitic helminths. The presence and levels of key chemokines in the blood or tissue of the infected host may reflect pathogenic outcomes. They may be used as alternative markers of disease severity: for example, CCL2 in schistosome-related nephropathy and renal damage. The correlation of some chemokines and their receptors, such as CCR3 and CCR4, with developing a Th2 immune response is clear. However, there are still many contradictory findings for chemokine response during parasitic infection. For instance, although the chemokine CCL1 seems to have an important role in the biology of ILC2s cells and the development of the Th2 response activated by helminth parasites, it is still an embryonic area with only a few studies. Also, robust information is lacking on the mechanisms involved in the regulation of lymphocytes and DCs homing in response to the homeostatic chemokines CCL19, CCL21 and CXCL13, as well as the involvement of the typical chemokines of the Th1 response (i.e., CXCL9, CXCL10 and CXCL11) in the context of helminthiasis. Given the host's need to develop a multicellular immune response to combat infection with helminth parasites, it is intuitive to accept a prominent role for chemokines in the recruitment and activation of effector cells. Nevertheless, based on host-parasite specificity, and methodological differences with the laboratory-based rodent-helminth models, it is challenging to form blanket general statements in this area of immunoregulation. For each 'rule' many exceptions will exist and as we have illustrated the temporal kinetics of chemokine mobilization following infection is critically important.

Despite the great difficulty of translating the results from experimental research to humans, it is noteworthy that therapeutic approaches using neutralizing antibodies and chemokine receptor antagonists are very promising and have shown good results in vivo and clinical trials in inflammatory diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, idiopathic pulmonary fibrosis and HIV infection [27]. However, there is a paucity of studies in the field of immunotherapy related to helminthic diseases. Drugs that act on the chemokine system can be an attractive alternative treatment for helminthiasis, since an increase in resistance to current drugs and reinfection in endemic areas has been reported. Despite extensive efforts, anti-helminth vaccines have yet to be successfully developed and deployed. We are cognizant of the fact that immunotherapies (i.e., cytokine/chemokine neutralizing antibodies) are extremely expensive drugs that require multiple administration; both these facts stand as impediments to their use in areas where helminth parasites are endemic.

In addition to the canonical chemokine receptors, members of the atypical chemokine receptor family are responsible for chemokine scavenging and play an essential role in regulating their availability in homeostatic states and several inflammatory conditions [26,28]. Nevertheless, little is known about the role of atypical chemokine receptors in the context of helminth diseases and further studies using mice deficient in these receptors are needed to understand their regulatory effects better. The challenges of studying the chemokine system in host-parasite interaction do not negate the imperative of developing precise knowledge of how helminth parasites of importance in human and livestock health affect chemokine biology as a novel approach to treat specific nematode, cestode or trematode infections in an

Table 2

Main findings concerning the chemokine system in helminth infections. Ba, basophil; DCs, dendritic cells; Eo, eosinophil; Mo, monocyte; MΦ, macrophage; NK, natural killer; Neu, neutrophil.

Chemokine axis	Key target	Main findings in helminth infections	References
CCL1-CCR8	Mo, MΦ, thymocyte. Th2 cells, T cells, NK	↑ CCL1	[44]
		↑CCR8 expression in ILC2 and T cells	[43,44]
		ILC2 expansion and maintenance	[44]
		Th2 immune response Expansion and maintenance of ILC2 Parasite elimination	[43–45] [44] [44]
CCL2-CCR2	Mo, MΦ, T cells, NK	↑ CCL2	[10,80,59–79]
		Macrophage infiltration Granuloma formation Fibrosis	[64–67,68,71] [64–66] [66]
		Th2 immune response <i>T. muris</i> elimination	[64,80] [80]
		↑CCL3 ↑CCL5 (most helminthiasis)	[10,71,72, 74–84,86,89, 90,93,106] [94]
CCL3/CCL5-CCR1/CCR5	Mo, MΦ, T cells, NK, DCs	↓CCL3 ↓CCL5 (strongyloidiasis)	[81–83]
		CCR1: ↑morbidity ↑granuloma ↑parasite burden	[84]
		CCR5: ↓mortality rate ↓liver pathology ↓granuloma ↑Treg	[84]
		↑CCL11 ↑CCL24 ↑CCL26	[10,59,77,78, 93,98–107, 109,110–117] [100,110] [97,98,103, 112–114,117] [103,108,137] [107]
CCL11/CCL24/CCL26-CCR3	Eo, Ba, Mast	Th2 immune response Eosinophil infiltration	[107]
		Parasite elimination ↑CCL24: eosinophilic meningitis	[107]
		↑CCL11 ↑CCL24: schistosomal myeloradiculopathy	[107]
		↑CCL11: pulmonary granuloma formation	[107]
CCL17/CCL22-CCR4	Th2 cells, Treg cells, Th17 cells	↑CCL22 ↑CCL17	[97,100,109, 111,114, 124–129] [112,126,127, 129] [112] [112]
		Th2 immune response	[112]
		↑CCR4 expression Aggressive Th2 pulmonary granulomatous response Fibrosis	[112] [112]
		Eosinophilia Parasite elimination	[127,128,130] [113,132]
CCL19/CCL21-CCR7	T cells, B cells, DCs	↑CCL19 ↑CCL21: B and T cells accumulation liver	[114,133]
		↓CCL19 ↓CCL21: B and T cells loss in the spleen	[139]
		↑CCR7 expression	[67–70,76, 112,145,146, 148,151,153]
		↑CXCL1 ↑CXCL2 ↑CXCL8	[109,112,146, 149,151] [146] [112,150] [145] [10,164]
CXCL8-CXCR1/CXCR2 CXCL1/CXCL2-CXCR2	Neu, Mo,NK, Ba, Mast cells	Neutrophil infiltration	[109,112,146, 149,151]
		Th17 immune response Granuloma formation Parasite elimination	[146] [112,150] [145] [10,164]

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Chemokine axis	Key target	Main findings in helminth infections	References
CXCL9/ CXCL10/ CXCL11- CXCR3	Th1 cells, NK, DCs, B cells	↑CXCL9 ↑CXCL10 (ascariasis)	
		↓CXCL9 ↓CXCL10 (trichuriasis)	[136]
		Dynamic expression or no production (schistosomiasis)	[124,132]
		↑CXCL9 ↑CXCL10: antifibrotic role (schistosomiasis)	[104]
CXCL13-CXCR5	T cells, B cells, DCs	↑CXCR5 expression	[167]
		Tfh cell response	[167]
		Th2 immune response	[167]
		↑CXCL13: B and T cells accumulation liver	[113]
		↓CXCL13: B and T cells loss in the spleen	[114]

individualized manner.

5. Concluding remarks

Helminth parasites are diverse and complex metazoans that represent a critical global problem, being endemic in the world’s poorest regions. Over the last few decades, as we highlighted in this review, a body of evidence has amassed in support of an essential role of chemokines in host immunity during helminth infections (Table 2). The

level of chemokines produced in the course of infection directly influences the accumulation of activated leukocytes in tissue and, consequently, characterizes the profile of the immune response. Chemokines are essential to guide innate effector immune cells in response to infection and inflammation and initiate and orchestrate adaptive immune responses, thereby linking the innate and adaptive immune responses in the proper context. Overall, inflammatory chemokines activated during helminth infections such as CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL24, CCL26, CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10 and CXCL11, can contribute to the development of an effective immune response against the parasite and can increase the pathophysiological parameters of the disease: this is the critical balance in the host’s response to infection. The CCL17/CCL22-CCR4 chemokine axis plays an important role in driving a Th2 immune response, the primary adaptive immune response in most helminthiasis, and the Th17 immune response. Furthermore, homeostatic chemokines such as CCL19, CCL21 and CXCL13 are critical for establishing efficient adaptive immune responses through the regulation of lymphocytes and DCs homing (Fig. 3). Therefore, precise knowledge of the chemokine system and the immunological basis of the host-parasite interaction is essential to improve our comprehension of helminth diseases and develop new therapeutic strategies to minimize their harmful effects worldwide.

Funding

This work did not receive direct financial support. RCR and RTF are research fellows supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

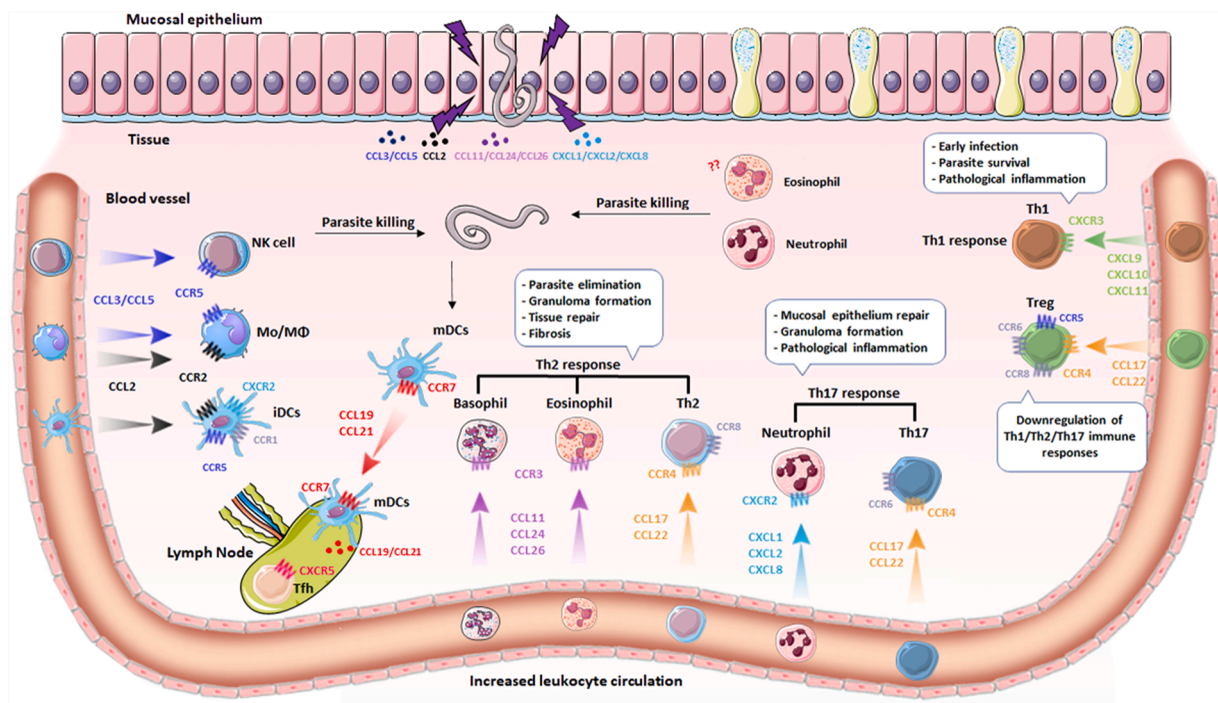


Fig. 3. . Main chemokine axes activated during helminthiasis. Overall, helminth infections induce an early release of the inflammatory chemokines CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL24, CCL26, CXCL8, CXCL1 and CXCL2 that are responsible for the activation and recruitment of innate immune cells, including monocytes/macrophages (Mo/MΦ), neutrophils, eosinophils, immature dendritic cells (iDCs), NK cells, basophils, among others. Neutrophils, NK cells and, occasionally, eosinophils can directly kill the parasite, as soon as the beginning of infection. In addition to the activation of characteristic chemokines axes of the Th2 immune response, such as CCL17/CCL22-CCR4 and CCL1-CCR8, the presence of the parasite in tissue and its excreted antigens induce a subsequent CCR7 expression in maturing dendritic cells (mDCs) that migrate into lymph nodes toward CCL19/CCL21, which are crucial for the development of different and efficient adaptive immune responses. The balance between Th1/Th2/Th17/Treg cell responses increases leukocyte recruitment and amplifies inflammatory response in tissue, resulting in both parasite clearance and pathological inflammation. This figure used images from Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

Declarations of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] S.L. James, D. Abate, K.H. Abate, S.M. Abay, C. Abbafati, N. Abbasi, H. Abbastabar, F. Abd-Allah, J. Abdela, A. Abdelalim, et al., Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017, *Lancet* 392 (2018) 1789–1858, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7).
- [2] J. Charlier, L. Rinaldi, V. Musella, H.W. Ploeger, C. Chartier, H.R. Vineer, B. Hinney, G. von Samson-Himmelstjerna, B. Băcescu, M. Mickiewicz, et al., Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe, *Prev. Vet. Med.* 182 (2020), 105103, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105103>.
- [3] P.J. Hotez, M. Alvarado, M.G. Basáñez, I. Bolliger, R. Bourne, M. Boussinesq, S. J. Brooker, A.S. Brown, G. Buckle, C.M. Budke, et al., The Global Burden of Disease Study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>.
- [4] P.J. Hotez, Comment Global deworming: moving past albendazole and mebendazole, *Lancet Infect. Dis.* 3099 (2017) 10–11, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30484-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30484-X).
- [5] D.R. Hopkins, A.J. Weiss, S.L. Roy, S. Yerian, S.G.H. Sapp, Progress toward global eradication of dracunculiasis, January 2019–June 2020, *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 69 (2020) 1563–1568, <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6943a2>.
- [6] J.E. Allen, R.M. Maizels, Diversity and dialogue in immunity to helminths, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 375–388, <https://doi.org/10.1038/nri2992>.
- [7] K.J. Else, J. Keiser, C.V. Holland, R.K. Grensis, D.B. Sattelle, R.T. Fujiwara, L. L. Bueno, S.O. Asaolu, O.A. Sowemimo, P.J. Cooper, Whipworm and roundworm infections, *Nat. Rev. Dis. Prim.* (2020) 6, <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0171-3>.
- [8] R.M. Anthony, L.I. Rutitzky, J.F. Urban Jr., M.J. Stadecker, W.C. Gause, J. F. Urban, M.J. Stadecker, W.C. Gause, J.F. Urban Jr, M.J. Stadecker, et al., Protective immune mechanisms in helminth infection, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 975–987, <https://doi.org/10.1038/nri2199>.
- [9] H.J. McSorley, R.M. Maizels, Helminth infections and host immune regulation, *Clin. Microbiol Rev.* 25 (2012) 585–608, <https://doi.org/10.1128/CMR.05040-11>.
- [10] P.H. Gazzinelli-Guimaraes, R. De Queiroz Prado, A. Ricciardi, S. Bonne-Année, J. Sciarba, E.P. Karmele, P.T. Fujiwara, T.B. Nutman, Allergen presensitization drives an eosinophil-dependent arrest in lung-specific helminth development, *J. Clin. Investig.* 129 (2019) 3686–3701, <https://doi.org/10.1172/JCI127963>.
- [11] A.P. Meli, G. Fontés, C. Leung Soo, L.L. King, T follicular helper cell-derived IL-4 is required for IgE production during intestinal helminth infection, *J. Immunol.* 199 (2017) 244–252, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700141>.
- [12] K. Willms, R. Zurabian, Taenia crassiceps: in vivo and in vitro models, *Parasitology* 137 (2010) 335–346, <https://doi.org/10.1017/S0031182009991442>.
- [13] J.E. Weatherhead, P. Gazzinelli-Guimaraes, J.M. Knight, R. Fujiwara, P.J. Hotez, M.E. Bottazzi, D.B. Corry, Host immunity and inflammation to pulmonary helminth infections, *Front Immunol.* 11 (2020) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594520>.
- [14] B. Zheng, J. Zhang, H. Chen, H. Nie, H. Miller, Q. Gong, C. Liu, T lymphocyte-mediated liver immunopathology of schistosomiasis, *Front Immunol.* 11 (2020) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00061>.
- [15] J. Ajendra, A.L. Chenery, J.E. Parkinson, B.H.K. Chan, S. Pearson, S.A. P. Colombo, L. Boon, R.K. Grensis, T.E. Sutherland, J.E. Allen, IL-17A both initiates, via IFN γ suppression, and limits the pulmonary type-2 immune response to nematode infection, *Mucosal Immunol.* 13 (2020) 958–968, <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0318-2>.
- [16] D.S. Nogueira, P.H. Gazzinelli-Guimaraes, F.S. Barbosa, N.M. Resende, C.C. Silva, L.M. de Oliveira, C.C.O. Amorim, F.M.S. Oliveira, M.S. Mattos, L.R. Kraemer, et al., Multiple exposures to ascaris suum induce tissue injury and mixed Th2/Th17 immune response in mice, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2016) 10, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004382>.
- [17] M. Mbaw, B.M. Larkin, L. Meurs, L.J. Wammes, S.E. De Jong, L.A. Labuda, M. Camara, H.H. Smits, K. Polman, T.N. Dieye, et al., T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis, *J. Infect. Dis.* 207 (2013) 186–195, <https://doi.org/10.1093/infdis/jis654>.
- [18] A. Sher, R.L. Coffman, S. Hiency, A.W. Cheever, Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse, *J. Immunol.* 145 (1990) 3911–3916.
- [19] J.M. Swartz, K.D. Dyer, A.W. Cheever, T. Ramalingam, L. Plesnick, J. B. Domachowski, J.J. Lee, N.A. Lee, P.S. Foster, T.A. Wynn, et al., Schistosoma mansoni infection in eosinophil lineage-ablated mice, *Blood* 108 (2006) 2420–2427, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015933>.
- [20] H.L. Rotman, W. Yutanawiboonchai, R.A. Brigandi, O. Leon, G.J. Gleich, T. J. Nolan, G.A. Schad, D. Abraham, Strongyloides stercoralis: Eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice, *Exp. Parasitol.* 82 (1996) 267–278, <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0034>.
- [21] O. Sasaki, H. Sugaya, K. Ishida, K. Yoshimura, Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse, *Parasite Immunol.* 15 (1993) 349–354, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1993.tb00619.x>.
- [22] D.S. Nogueira, L.M. de Oliveira, C.C.O. Amorim, A.C. Gazzinelli-Guimaraes, F. S. Barbosa, F.M.S. Oliveira, L. Kraemer, M. Mattos, M.S. Cardoso, N.M. Resende, et al., Eosinophils mediate SIgA production triggered by TLR2 and TLR4 to control *Ascaris suum* infection in mice, *PLoS Pathog.* 17 (2021), e1010067, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010067>.
- [23] C.C. Motran, L. Silvane, L.S. Chiapello, M.G. Theumer, L.F. Ambrosio, X. Volpini, D.P. Celas, L. Cervi, Helminth infections: recognition and modulation of the immune response by innate immune cells, *Front Immunol.* 9 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00664>.
- [24] C.L. Sokol, A.D. Luster, The chemokine system in innate immunity, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2016) 11–20, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>.
- [25] J.W. Griffith, C.L. Sokol, A.D. Luster, Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity, *Annu Rev. Immunol.* (2014), <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>.
- [26] F. Bachelier, A. Ben-baruch, A.M. Burkhardt, C. Combadiere, J.M. Farber, G.J. Graham, R. Horuk, A.H. Sparre-ullrich, M. Locati, A.D. Luster, et al., International Union of Pharmacology . LXXXIX . Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors, (2014) 1–79.
- [27] R.C. Russo, C.C. Garcia, M.M. Teixeira, Anti-inflammatory drug development: Broad or specific chemokine receptor antagonists? *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 13 (2010) 414–427.
- [28] R.J.B. Nibbs, G.J. Graham, Immune regulation by atypical chemokine receptors, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 815–829, <https://doi.org/10.1038/nri3544>.
- [29] J.M. da Silva, T.P.M. dos Santos, L.M. Sobral, C.M. Queiroz-Junior, M.A. Rachid, A.E.I. Proudfoot, G.P. Garlet, A.C. Batista, M.M. Teixeira, A.M. Leopoldino, et al., Relevance of CCL3/CCR5 axis in oral carcinogenesis, *Oncotarget* 8 (2017) 51024–51036, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16882>.
- [30] R.C. Russo, B. Savino, M. Mirolo, C. Buracchi, G. Germano, A. Anselmo, L. Zammataro, F. Pasqualini, A. Mantovani, M. Locati, et al., The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2+ and CCR5+ IFN γ -producing γ 8T cells in mice, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 314 (2018) L1010–L1025, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00233.2017>.
- [31] F.M. Coelho, V. Pinho, F.A. Amaral, D. Sachs, V.V. Costa, D.H. Rodrigues, A. T. Vieira, T.A. Silva, D.G. Souza, R. Bertini, et al., The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature, *Arthritis Rheumatol.* 58 (2008) 2329–2337, <https://doi.org/10.1002/art.23622>.
- [32] Borges V. Castanheira FVES, F. Sonego, Kanashiro A. Donate PB, P.H. Melo, K. Pallas, R.C. Russo, F.A. Amaral, M.M. Teixeira, et al., The atypical chemokine receptor ACKR2 is protective against sepsis, *Shock* 49 (2018) 682–689, <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000969>.
- [33] C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, *J. Clin. Investig.* 117 (2007) 175–184, <https://doi.org/10.1172/JCI29881>.
- [34] M.S. Mattos, M.R. Ferrero, L. Kraemer, G.A.O. Lopes, D.C. Reis, G.D. Cassali, F.M. S. Oliveira, L. Brandolini, M. Allegretti, C.C. Garcia, et al., CXCR1 and CXCR2 inhibition by ladarixin improves neutrophil-dependent airway inflammation in mice, *Front Immunol.* (2020) 11, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566953>.
- [35] L.P. Tavares, C.C. Garcia, A.P.F. Gonçalves, L.R. Kraemer, E.M. Melo, F.M. S. Oliveira, C.S. Freitas, G.A.O. Lopes, D.C. Reis, G.D. Cassali, et al., ACKR2 contributes to pulmonary dysfunction by shaping CCL5:CCR5-dependent recruitment of lymphocytes during Influenza A infection in mice, *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* (2020), <https://doi.org/10.1152/ajplung.00134.2019>.
- [36] M.E. Hamed, A. Naeem, H. Alkadi, A.A. Alamri, A.S. Alyami, A. Aljuriyan, Elevated expression levels of lung complement anaphylatoxin, neutrophil chemoattractant chemokine IL - 8, and RANTES in MERS - CoV - infected patients: predictive biomarkers for disease severity and mortality, *J. Clin. Immunol.* (2021), <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01061-z>.
- [37] T.-H. Lee, G.-Y. Lin, M.-H. Yang, Y.-C. Tyan, C.-H. Lee, Salmonella reduces tumor metastasis by downregulation C-X-C chemokine receptor type 4, *Int. J. Med. Sci.* 18 (2021) 2835–2841, <https://doi.org/10.7150/ijms.60439>.
- [38] A. Zingoni, H. Soto, J.A. Hedrick, A. Stoppacciaro, C.T. Storzazzi, F. Sinigaglia, D. D'Ambrosio, A. O'Garra, D. Robinson, M. Rocchi, et al., The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells, *J. Immunol.* 161 (1998) 547–551.
- [39] D. D'Ambrosio, A. Jellem, R. Bonocchi, D. Mazzeo, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Sinigaglia, Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells, *J. Immunol.* 161 (1998) 5111–5115.
- [40] P. Panina-Bordignon, A. Papi, M. Mariani, P. Di Lucia, G. Casoni, C. Bellettato, C. Buonsanti, D. Miotto, C. Mapp, A. Villa, et al., The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics, *J. Clin. Investig.* 107 (2001) 1357–1364, <https://doi.org/10.1172/JCI12655>.
- [41] K. Mitalithas, C. Guillen, C. Raport, R. Kolbeck, D. Soler, C.E. Brightling, I. D. Pavord, A.J. Wardlaw, Expression of CCR8 is increased in asthma, *Clin. Exp. Allergy* 40 (2010) 1175–1185, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03504.x>.
- [42] S.A. Islam, D.S. Chang, R.A. Colvin, M.H. Byrne, M.L. McCully, B. Moser, S. A. Lira, I.F. Charo, A.D. Mouse C.C.L.8 Luster, a CCR8 agonist, promotes atopic

- dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 167–177, <https://doi.org/10.1038/ni.1984>.
- [43] C.M. Freeman, B.-C. Chiu, V.R. Stolberg, J. Hu, K. Zeibecoglou, N.W. Lukacs, S. A. Lira, S.L. Kunkel, S.W. Chensue, CCR8 is expressed by antigen-elicited, IL-10-producing CD4 + CD25 + T cells, which regulate Th2-mediated granuloma formation in mice, *J. Immunol.* 174 (2005) 1962–1970, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.1962>.
- [44] L. Knipfer, A. Schulz-Kuhnt, M. Kindermann, V. Greif, C. Symowski, D. Voehringer, M.F. Neurath, I. Atraya, S. Wirtz, A CCL1/CCR8-dependent feed-forward mechanism drives IL2 functions in type 2-mediated inflammation, *J. Exp. Med.* 216 (2019) 2763–2777, <https://doi.org/10.1084/jem.20182111>.
- [45] S.W. Chensue, N.W. Lukacs, T.Y. Yang, X. Shang, K.A. Frait, S.L. Kunkel, T. Kung, M.T. Wiekowski, J.A. Hedrick, D.N. Cook, et al., Aberrant *in vivo* T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice, *J. Exp. Med.* 193 (2001) 573–584, <https://doi.org/10.1084/jem.193.5.573>.
- [46] M. Napolitano, A. Zingoni, G. Bernardini, G. Spinetti, A. Nista, C.T. Storlazzi, M. Rocchi, A. Santoni, Molecular cloning of TER1, a chemokine receptor-like gene expressed by lymphoid tissues, *J. Immunol.* 157 (1996) 2759–2763.
- [47] D. Soler, T.R. Chapman, L.R. Poisson, L. Wang, J. Cote-Sierra, M. Ryan, A. McDonald, S. Badola, E. Fedyk, A.J. Coyle, et al., CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3 + regulatory and Th2 effector lymphocytes, *J. Immunol.* 177 (2006) 6940–6951, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6940>.
- [48] S. Ying, B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, C. Fang, D. Cousins, G. Zhang, S. Gu, Z. Gao, B. Shamji, et al., Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *J. Immunol.* 181 (2008) 2790–2798, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2790>.
- [49] J.-A. Gonzalo, Y. Qiu, J.M. Lora, A. Al-Garawi, J.-L. Villeval, J.A. Boyce, C. Martinez-A, G. Marquez, I. Goya, Q. Hamid, et al., Coordinated involvement of mast cells and T cells in allergic mucosal inflammation: critical role of the CC chemokine ligand 1:CCR8 axis, *J. Immunol.* 179 (2007) 1740–1750, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1740>.
- [50] C.D. Chung, F. Kuo, J. Kumer, A.S. Motani, C.E. Lawrence, W.R.J. Henderson, C. Venkataraman, CCR8 is not essential for the development of inflammation in a mouse model of allergic airway disease, *J. Immunol.* 170 (2003) 581–587, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.581>.
- [51] I. Goya, R. Villares, A. Zaballos, J. Gutiérrez, L. Kremer, J.-A. Gonzalo, R. Varona, L. Carramolino, A. Serrano, P. Pallarés, et al., Absence of CCR8 does not impair the response to ovalbumin-induced allergic airway disease, *J. Immunol.* 170 (2003) 2138–2146, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2138>.
- [52] K.F. Buckland, E.C. O'Connor, E.M. Coleman, S.A. Lira, N.W. Lukacs, C. M. Hogaboam, Remission of chronic fungal asthma in the absence of CCR8, *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 (2007) 997–1004, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.660>.
- [53] C. Shi, T. Jia, S. Mendez-ferrer, T.M. Hohl, N.V. Serbina, L. Lipuma, I. Leiner, M. O. Li, P.S. Frenette, E.G. Pamer, Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating Toll-like receptor ligands, *Immunity* 34 (2012) 590–601, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.016>.
- [54] J.M. Frade, M. Mellado, G. del Real, J.C. Gutierrez-Ramos, P. Lind, C. Martinez-A, Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells, *J. Immunol.* 159 (1997) 5576–5584.
- [55] P. Allavena, G. Bianchi, D. Zhou, J. van Damme, P. Jilek, S. Sozzani, A. Mantovani, Induction of natural killer cell migration by monocyte chemoattractant protein-1, -2 and -3, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 3233–3236, <https://doi.org/10.1002/eji.1830241249>.
- [56] K. Zhu, Q. Shen, M. Ulrich, M. Zheng, Human monocyte-derived dendritic cells expressing both chemotactic cytokines IL-8, MCP-1, RANTES and their receptors, and their selective migration to these chemokines, *Chin. Med. J.* 113 (2000) 1124–1128.
- [57] W.J. Karpus, N.W. Lukacs, K.J. Kennedy, W.S. Smith, S.D. Hurst, T.A. Barrett, Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production, *J. Immunol.* 158 (1997) 4129–4136.
- [58] L. Gu, S. Tseng, R.M. Horner, C. Tam, M. Loda, B.J. Rollins, Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1, *Nature* 404 (2000) 407–411, <https://doi.org/10.1038/35006097>.
- [59] D. Silveira-Lemos, A. Teixeira-Carvalho, O.A. Martins-Filho, A.L. Souza-Soares, P. Castro-Silva, M.F. Costa-Silva, P.H.G. Guimarães, H.B. Ferraz, L.A. Oliveira-Fraga, M.M. Teixeira, et al., Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105 (2010) 380–386, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000400006>.
- [60] J.H. Ruth, K.S. Warmington, X. Shang, P. Lincoln, H. Evanoff, S.L. Kunkel, S. W. Chensue, Interleukin 4 and 13 participation in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation: Multiparameter analysis of cellular recruitment, chemokine expression and cytokine networks, *Cytokine* 12 (2000) 432–444, <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0595>.
- [61] C.R. Perry, M.L. Burke, D.J. Stenzel, D.P. McManus, G.A. Ramm, G.N. Gobert, Differential expression of chemokine and matrix re-modelling genes is associated with contrasting schistosome-induced hepatopathology in murine models, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2011) 5, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001178>.
- [62] A.L.P. Hanemann, A.B. Libório, E.F. Daher, A.M.C. Martins, M.C.C. Pinheiro, M. S. Sousa, F.S.M. Bezerra, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in patients with chronic schistosomiasis mansoni: Evidences of subclinical renal inflammation, *PLoS One* 8 (2013) 8–12, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080421>.
- [63] D.B. Duarte, L.A. Vanderlei, R.K. De Azevêdo Bispo, M.E. Pinheiro, G.B. Da Silva, A.M.C. Martins, G.C. Meneses, E. De Francesco Daher, Renal function in hepatosplenic schistosomiasis - an assessment of renal tubular disorders, *PLoS One* 9 (2014) 1–15, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115197>.
- [64] S.W. Chensue, K.S. Warmington, N.W. Lukacs, P.M. Lincoln, M.D. Burdick, R. M. Strieter, S.L. Kunkel, Monocyte chemoattractant protein expression during schistosome egg granuloma formation: Sequence of production, localization, contribution, and regulation, *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 130–138.
- [65] B. Lu, B.J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N.W. Lukacs, S.L. Kunkel, R. North, C. Gerard, B.J. Rollins, Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 601–608, <https://doi.org/10.1084/jem.187.4.601>.
- [66] K.S. Warmington, L. Boring, J.H. Ruth, J. Sonstein, C.M. Hogaboam, J.L. Curtis, S. L. Kunkel, I.R. Charo, S.W. Chensue, Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type-2 (Schistosomal antigen-elicited) pulmonary granuloma formation. Analysis of cellular recruitment and cytokine responses, *Am. J. Pathol.* 154 (1999) 1407–1416, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65394-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65394-1).
- [67] S. Frydas, T. Rallis, I. Theodorides, M.N. Patsikas, C. Trakatellis, M. Di Giocchino, M. Felaco, *Trichinella spiralis* infection is mediated by MCP-1 and MIP-2, while echinococcus granulosis is strongly mediated by MCP-1, but not MIP-2, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 13 (2000) 21–26, <https://doi.org/10.1177/039463200001300103>.
- [68] Y. Theodorides, S. Frydas, T. Rallis, K. Adamama-Moraitou, R. Papazahariadou, C. Batzios, P.M.C.P.-I Conti, and MIP-2 levels during echinococcus granulosis infections in mice, *J. Helminthol.* 75 (2001) 205–208, <https://doi.org/10.1079/JOH200139>.
- [69] W. Hui, S. Jiang, J. Tang, H. Hou, S. Chen, B. Jia, Q. Ban, An immediate innate immune response occurred in the early stage of e. granulosis eggs infection in sheep: evidence from microarray analysis, *PLoS One* 10 (2015) 1–13, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135096>.
- [70] C.M. Dreweck, P.T. Soboslay, H. Schulz-Key, B. Gottstein, P. Kern, Cytokine and chemokine secretion by human peripheral blood cells in response to viable *Echinococcus multilocularis* is metacystode vesicles, *Parasite Immunol.* 21 (1999) 433–438, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00243.x>.
- [71] A.E. Cardona, P.A. Gonzalez, J.M. Teale, CC chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: Role of $\gamma\delta$ T cells in amplification of the host immune response, *Infect. Immun.* 71 (2003) 2634–2642, <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2634-2642.2003>.
- [72] J. Uddin, A.E. Gonzalez, R.H. Gilman, H.H. Garcia, M. Verastegui, L.J. Moore, C. A.W. Evans, R.C. Read, J.S. Friedland, Neurocysticercal antigens stimulate chemokine secretion from human monocytes via an NF- κ B-dependent pathway, *Microbes Infect.* 8 (2006) 1732–1740, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.009>.
- [73] S. Harrison, L. Thumm, T.E. Nash, T.B. Nutman, E.M. O'Connell, The local inflammatory profile and predictors of treatment success in subarachnoid neurocysticercosis, *Clin. Infect. Dis.* 20892 (2020) 1–8, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1128>.
- [74] S.K. Singh, K.N. Prasad, A.K. Singh, K.K. Gupta, A. Singh, M. Tripathi, R.K. Gupta, Adhesion molecules, chemokines and matrix metallo-proteinases response after albendazole and albendazole plus steroid therapy in swine neurocysticercosis, *Exp. Parasitol.* 182 (2017) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.08.009>.
- [75] M.L. DeSchoolmeester, H. Manku, K.J. Else, The innate immune responses of colonic epithelial cells to *Trichuris muris* are similar in mouse strains that develop a type 1 or type 2 adaptive immune response, *Infect. Immun.* 74 (2006) 6280–6286, <https://doi.org/10.1128/IAI.01609-05>.
- [76] S. Frydas, N. Papaioannou, M. Reale, R.C. Barbacane, Conti P. MCP-1 and MIP-2 response in *Trichinella spiralis* infected mice treated with 4-deoxyoxipridone (4-DPD), *Immunol. Lett.* 83 (2002) 31–37, [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00045-7).
- [77] A. Rosbottom, P.A. Knight, G.M. Lachlan, E.M. Thornton, S.W. Wright, H.R. P. Miller, C.L. Scudamore, Chemokine and cytokine expression in murine intestinal epithelium following *Nippostrongylus brasiliensis* infection, *Parasite Immunol.* (2002) 67–75.
- [78] L. Yu, X. Wu, J. Wei, Q. Liao, L. Xu, S. Luo, X. Zeng, Y. Zhao, Z. Lv, Z. Wu, Preliminary expression profile of cytokines in brain tissue of BALB/c mice with *Angiostrongylus cantonensis* infection, *Parasites Vectors* 8 (2015) 1–10, <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0939-6>.
- [79] S. Li, F. Yang, P. Ji, X. Zeng, X. Wu, J. Wei, L. Ouyang, J. Liang, H. Zheng, Z. Wu, et al., Eosinophil chemotactic chemokine profilings of the brain from permissive and non-permissive hosts infected with *Angiostrongylus cantonensis*, *Parasitol. Res.* 113 (2014) 517–525, <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3683-x>.
- [80] M.L. DeSchoolmeester, M.C. Little, B.J. Rollins, K.J. Else, Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *Trichuris muris* infection, *J. Immunol.* 170 (2003) 4693–4700, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4693>.
- [81] N.W. Lukacs, S.L. Kunkel, R.M. Strieter, K. Warmington, S.W. Chensue, The role of macrophage inflammatory protein 1 alpha in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 1551–1559, <https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1551>.
- [82] J.L. Gao, T.A. Wynn, Y. Chang, E.J. Lee, H.E. Broxmeyer, S. Cooper, H.L. Tiffany, H. Westphal, J. Kwon-Chung, P.M. Murphy, Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance

- in mice lacking CC chemokine receptor 1, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1959–1968, <https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1959>.
- [83] A.L.S. Souza, E. Roffé, V. Pinho, D.G. Souza, A.F. Silva, R.C. Russo, R. Guabiraba, C.A.J. Pereira, F.M. Carvalho, M.M. Barsante, et al., Potential role of the chemokine macrophage inflammatory protein 1 α in human and experimental schistosomiasis, *Infect. Immun.* 73 (2005) 2515–2523, <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2515-2523.2005>.
- [84] A.L.S. Souza, P.R.S. Souza, C.A. Pereira, A. Fernandes, R. Guabiraba, R.C. Russo, L.Q. Vieira, A. Corréa, M.M. Teixeira, D. Negrão-Corrêa, Experimental infection with *Schistosoma mansoni* in CCR5-deficient mice is associated with increased disease severity, as CCR5 plays a role in controlling granulomatous inflammation, *Infect. Immun.* 79 (2011) 1741–1749, <https://doi.org/10.1128/IAI.00502-10>.
- [85] M. Booth, J.K. Mwatha, S. Joseph, F.M. Jones, H. Kadzo, E. Ireri, F. Kazibwe, J. Kemijumbi, C. Kariuki, G. Kimani, et al., Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- γ , high TNF- α , or low RANTES, depending on age and gender, *J. Immunol.* 172 (2004) 1295–1303, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1295>.
- [86] L. Kocherscheidt, A.K. Flakowski, B. Grüner, D.M. Hamm, K. Dietz, P. Kern, P. T. Soboslay, *Echinococcus multilocularis*: Inflammatory and regulatory chemokine responses in patients with progressive, stable and cured alveolar echinococcosis, *Exp. Parasitol.* 119 (2008) 467–474, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.006>.
- [87] M. Rodríguez-Sosa, A.R. Satoskar, R. Calderón, L. Gomez-Garcia, R. Saavedra, R. Bojalil, L.I. Terrazas, Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability, *Infect. Immun.* 70 (2002) 3656–3664, <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3656-3664.2002>.
- [88] E. Maier, A. Duschl, J.O. Horejs-Hoecck, STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization, *Eur. J. Immunol.* 42 (2012) 2827–2833, <https://doi.org/10.1002/eji.201242433>.
- [89] E.K. Moon, S.H. Lee, Y. Soh, Y.R. Guo, Y. Piao, F.S. Quan, Correlates of immune response in *Trichinella spiralis* infection, *Immunol. Investig.* 47 (2018) 605–614, <https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1470189>.
- [90] P. Murambiwa, E. Silas, Y. Mdleleni, S. Mukaratirwa, Chemokine, cytokine and haematological profiles in Sprague-Dawley rats co-infected with *Plasmodium berghei* ANKA and *Trichinella zimbabwensis*-a laboratory animal model for malaria and tissue-dwelling nematodes co-infection, *Heliyon* 6 (2020), e03475, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03475>.
- [91] J.-B. Ahn, S.A. Kang, D.-H. Kim, H.S. Yu, Activation and recruitment of regulatory T cells via chemokine receptor activation in *Trichinella spiralis*-infected mice, *Korean J. Parasitol.* 54 (2016) 163–171, <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.2.163>.
- [92] S.A. Kang, M.K. Park, M.K. Cho, S.K. Park, M.S. Jang, B.G. Yang, M.H. Jang, D. H. Kim, H.S. Yu, Parasitic nematode-induced CD4⁺Foxp3⁺T cells can ameliorate allergic airway inflammation, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2014) 8, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003410>.
- [93] D.M. Itami, T.M. Oshiro, C.A. Araujo, A. Perini, M.A. Martins, M.S. Macedo, Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components, *Clin. Exp. Allergy* (2005) 873–879, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02268.x>.
- [94] N. Tiberti, D. Buonfrate, C. Carbone, G. Piro, Z. Bisoffi, C. Piubelli, Systemic profile of immune factors in an elderly Italian population affected by chronic strongyloidiasis, *Parasites Vectors* 13 (2020) 1–14, <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04391-w>.
- [95] J.E. Pease, Targeting chemokine receptors in allergic disease, *Biochem. J.* 434 (2011) 11–24, <https://doi.org/10.1042/BJ20101132>.
- [96] H.F. Rosenberg, K.D. Dyer, P.S. Foster, Eosinophils: changing perspectives in health and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 9–22, <https://doi.org/10.1038/nri3341>.
- [97] M.F. Gurish, A. Humbles, H. Tao, S. Finkelstein, J.A. Boyce, C. Gerard, D. S. Friend, K.F. Austen, CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*, *J. Immunol.* 168 (2002) 5730–5736, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5730>.
- [98] H. Dixon, C. Blanchard, M.L. deSchoolmeester, N.C. Yuill, J.W. Christie, M. E. Rothenberg, K.J. Else, The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophil recruitment to the gastrointestinal mucosa during helminth infection, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 1753–1763, <https://doi.org/10.1002/eji.200535492>.
- [99] D. Masure, J. Vlaminck, T. Wang, K. Chiers, W. Van den Broeck, J. Vercruyssen, P. Geldhof, A role for eosinophils in the intestinal immunity against infective *Ascaris suum* larvae, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) 1–7, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002138>.
- [100] H. Dawson, G. Solano-Aguilar, M. Beal, E. Beshah, V. Vangimalla, E. Jones, S. Botero, J.F. Urban, Localized Th1-, Th2-, T regulatory cell-, and inflammation-associated hepatic and pulmonary immune responses in *Ascaris suum*-infected swine are increased by retinoic acid, *Infect. Immun.* 77 (2009) 2576–2587, <https://doi.org/10.1128/IAI.00827-07>.
- [101] C.J. Lechner, K. Komander, J. Hegewald, X. Huang, R.G. Gantlin, P.T. Soboslay, A. Agossou, M. Banla, C. Köhler, Cytokine and chemokine responses to helminth and protozoan parasites and to fungus and mite allergens in neonates, children, adults, and the elderly, *Immun. Ageing* 10 (2013) 1–10, <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-29>.
- [102] G. Coakley, B. Volpe, T. Bouchery, K. Shah, A. Butler, P. Geldhof, M. Hatherill, W. G.C. Horsnell, J. Esser-von Bieren, N.L. Harris, Immune serum-activated human macrophages coordinate with eosinophils to immobilize *Ascaris suum* larvae, *Parasite Immunol.* 42 (2020), e12728, <https://doi.org/10.1111/pim.12728>.
- [103] J.D. Turner, N. Pionnier, J. Furlong-Silva, H. Sjöberg, S. Cross, A. Halliday, A. F. Guimaraes, D.A.N. Cook, A. Steven, N. Van Rooijen, et al., Interleukin-4 activated macrophages mediate immunity to filarial helminth infection by sustaining CCR3-dependent eosinophilia, *PLoS Pathog.* 14 (2018) 1–20, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006949>.
- [104] Y. Kannan, L.J. Entwistle, V.S. Pelly, J. Perez-Lloret, A.W. Walker, S.C. Ley, M. S. Wilson, TPL-2 restricts Ccl24-dependent immunity to *Heligmosomoides polygyrus*, *PLoS Pathog.* 13 (2017), e1006536, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006536>.
- [105] L.H. Stein, K.M. Redding, J.J. Lee, T.J. Nolan, G.A. Schad, J.B. Lok, D. Abraham, Eosinophils utilize multiple chemokine receptors for chemotaxis to the parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*, *J. Innate Immun.* 1 (2009) 618–630, <https://doi.org/10.1159/000233235>.
- [106] P. Waindok, C. Strube, Neuroinvasion of *Toxocara canis*-A nd T. cati-larvae mediates dynamic changes in brain cytokine and chemokine profile, *J. Neuroinflamm.* 16 (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1537-x>.
- [107] P.M. Intapan, K. Niwattayakul, K. Sawanyawisuth, V. Chotmongkol, W. Maleewong, Cerebrospinal fluid eotaxin and eotaxin-2 levels in human eosinophilic meningitis associated with angiostrongyliasis, *Cytokine* 39 (2007) 138–141, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.06.007>.
- [108] C.J. Lechner, R.G. Gantlin, T. Seeger, A. Sarnecka, J. Portillo, H. Schulz-Key, P. K. Karabou, G. Helling-Giese, C. Heuschkel, M. Banla, et al., Chemokines and cytokines in patients with an occult *Onchocerca volvulus* infection, *Microbes Infect.* 14 (2012) 438–446, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.12.002>.
- [109] N. Matsumoto, H. Mukae, F. Nakamura-Uchiyama, J.I. Ashitani, K. Abe, S. Katoh, S. Kohno, Y. Nawa, S. Matsukura, Elevated levels of thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in pleural effusion samples from patients infested with *Paragonimus westermani*, *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002) 314–318, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01985.x>.
- [110] S.R. Sousa-Pereira, A.L. Teixeira, L.C.S. Silva, A.L.S. Souza, C.M. Antunes, M. M. Teixeira, J.R. Lambertucci, Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy, *Parasite Immunol.* 28 (2006) 473–478, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00896.x>.
- [111] S.M. Geiger, A. Jardim-Botelho, W. Williams, N. Alexander, D.J. Diemert, J. M. Bethony, Serum CCL11 (eotaxin-1) and CCL17 (TARC) are serological indicators of multiple helminth infections and are driven by *Schistosoma mansoni* infection in humans, *Trop. Med. Int. Health* 18 (2013) 750–760, <https://doi.org/10.1111/tmi.12095>.
- [112] B. Qiu, K.A. Frait, F. Reich, E. Komuniecki, S.W. Chensue, Chemokine expression dynamics in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation, *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 1503–1515, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64101-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64101-6).
- [113] M.L. Burke, D.P. McManus, G.A. Ramm, M. Duke, Y. Li, M.K. Jones, G.N. Gobert, Temporal expression of chemokines dictates the hepatic inflammatory infiltrate in a murine model of schistosomiasis, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2010) 4, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000598>.
- [114] M.L. Burke, D.P. McManus, G.A. Ramm, M. Duke, Y. Li, M.K. Jones, G.N. Gobert, Co-ordinated gene expression in the liver and spleen during schistosoma japonicum infection regulates cell migration, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2010) 4, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000686>.
- [115] C.A.W. Evans, H.H. Garcia, A. Hartnell, R.H. Gilman, P.J. Jose, M. Martinez, D. G. Remick, T.J. Williams, J.S. Friedland, Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis, *Infect. Immun.* 66 (1998) 4522–4525, <https://doi.org/10.1128/66.9.4522-4525.1998>.
- [116] X. Huang, B. Grüner, C.J. Lechner, P. Kern, P.T. Soboslay, Distinctive cytokine, chemokine, and antibody responses in *Echinococcus multilocularis*-infected patients with cured, stable, or progressive disease, *Med. Microbiol. Immunol.* 203 (2014) 185–193, <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0331-8>.
- [117] N. Mejri, B. Gottstein, *Echinococcus multilocularis* metacystode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine, *Parasitol. Res.* 105 (2009) 1253–1260, <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1549-z>.
- [118] O. Yoshie, K. Matsushima, CCR4 and its ligands: from bench to bedside, *Int. Immunol.* 27 (2015) 11–20, <https://doi.org/10.1093/intimm/ixu079>.
- [119] C. Pilette, J.N. Francis, S.J. Till, S.R. Durham, CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge, *Eur. Respir. J.* 23 (2004) 876–884, <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00102504>.
- [120] S. Sebastiani, C. Albanesi, F. Nasorri, G. Girolomoni, A. Cavani, Nickel-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells display distinct migratory responses to chemokines produced during allergic contact dermatitis, *J. Invest. Dermatol.* 118 (2002) 1052–1058, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01771.x>.
- [121] S. Katoh, K. Fukushima, N. Matsumoto, K. Matsumoto, K. Abe, N. Onai, K. Matsushima, S. Matsukura, Accumulation of CCR4-expressing CD4⁺ T cells and high concentration of its ligands (TARC and MDC) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with eosinophilic pneumonia, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 58 (2003) 518–523, <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00149.x>.
- [122] C. Jakubzick, H. Wen, A. Matsukawa, M. Keller, S.L. Kunkel, C.M. Hogaboam, Role of CCR4 ligands, CCL17 and CCL22, during *Schistosoma mansoni* egg-induced pulmonary granuloma formation in mice, *Am. J. Pathol.* 165 (2004) 1211–1221, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63381-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63381-0).
- [123] M.L. Burke, L. McGarvey, H.J. McSorley, H. Bielefeldt-Ohmann, D.P. McManus, G. N. Gobert, Migrating *Schistosoma japonicum* schistosomula induce an innate immune response and wound healing in the murine lung, *Mol. Immunol.* 49 (2011) 191–200, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.08.014>.

- [124] V.N. Castro, J.L. Rodrigues, D.T. Cardoso, S.D. Resende, F.C. Magalhães, D. C. Souza, M.H. Requeijo, D. Negrão-Corrêa, S.M. Geiger, Systemic cytokine and chemokine profiles in individuals with *Schistosoma mansoni* infection and low parasite burden, *Front. Immunol.* 9 (2018) 2975, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02975>.
- [125] M.P. Hübner, B.J. Manfrás, M.C. Margos, D. Efffler, W.H. Hoffmann, H. Schulz-Key, P. Kern, P.T. Soboslay, *Echinococcus multilocularis* metacystodes modulate cellular cytokine and chemokine release by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis patients, *Clin. Exp. Immunol.* 145 (2006) 243–251, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03142.x>.
- [126] J. Wang, R. Lin, W. Zhang, L. Li, B. Gottstein, O. Blagosklonov, G. Lu, C. Zhang, X. Lu, D.A. Vuitton, et al., Transcriptional profiles of cytokine/chemokine factors of immune cell-homing to the parasitic lesions: a comprehensive one-year course study in the liver of *E. multilocularis*-infected mice, *PLoS One* (2014) 9, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091638>.
- [127] P. Skallerup, P. Nejsum, S. Cirera, C. Sirogvaard, C.B. Pipper, M. Fredholm, C. B. Jørgensen, S.M. Thamsborg, Transcriptional immune response in mesenteric lymph nodes in pigs with different levels of resistance to *Ascaris suum*, *Acta Parasitol.* 62 (2017) 141–153, <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0017>.
- [128] J. Fendt, D.M. Hamm, M. Banla, H. Schulz-Key, H. Wolf, G. Helling-Giese, C. Heuschkel, P.T. Soboslay, Chemokines in onchocerciasis patients after a single dose of ivermectin, *Clin. Exp. Immunol.* 142 (2005) 318–326, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02910.x>.
- [129] R.T. Semnani, L. Mahapatra, V. Moore, V. Sanprasert, T.B. Nutman, Functional and phenotypic characteristics of alternative activation induced in human monocytes by interleukin-4 or the Parasitic nematode *Brugia malayi*, *Infect. Immun.* 79 (2011) 3957–3965, <https://doi.org/10.1128/IAI.05191-11>.
- [130] S. Specht, J.K. Frank, J. Alferink, B. Dubben, L.E. Layland, G. Denece, O. Bain, I. Förster, C.J. Kirschning, C. Martin, et al., CCL17 controls mast cells for the defense against filarial larval entry, *J. Immunol.* 186 (2011) 4845–4852, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000612>.
- [131] C.E. Hughes, R.J.B. Nibbs, A guide to chemokines and their receptors, *FEBS J.* 285 (2018) 2944–2971, <https://doi.org/10.1111/febs.14466>.
- [132] Y. Liang, Luo Jin, J. Lu, Q. Zhou, Y. Wu, H. Wei, D. Zheng, Y. Ren, Sun Ya, K. Yi, Y. Wang, Z. Zhang, Song, Gene profile of Chemokines on hepatic stellate cells of schistosoma-infected mice and antifibrotic roles of CXCL9/10 on liver non-parenchymal cells, *PLoS One* (2012) 7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042490>.
- [133] R.A. Kurt, M.S. Brault, B. Fried, Evidence of altered secondary lymphoid-tissue chemokine responsiveness in Balb/c mice infected with *Schistosoma mansoni*, *J. Parasitol.* 89 (2003) 721–725, <https://doi.org/10.1645/GE-92R>.
- [134] A. Gruden-Movsesijan, N. Ilic, M. Colic, I. Majstorovic, S. Vasilev, I. Radovic, L. J. Sofronic-Milosavljevic, The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (2011) 429–439, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.08.004>.
- [135] L.M. Kuijk, E.J. Klaver, G. Kooij, S.M.A. van der Pol, P. Heijnen, S.C.M. Bruijns, H. Kringsel, E. Pinelli, G. Kraal, H.E. de Vries, et al., Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation, *Mol. Immunol.* 51 (2012) 210–218, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.03.020>.
- [136] E.J. Klaver, L.M. Kuijk, L.C. Laan, H. Kringsel, S.J. van Vliet, G. Bouma, R. D. Cummings, G. Kraal, I. Van Die, *Trichuris suis*-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated, *Int. J. Parasitol.* 43 (2013) 191–200, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.021>.
- [137] S.R. Silva, J.F. Jacysyn, M.S. Macedo, E.L. Faquin-Mauro, Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 3227–3237, <https://doi.org/10.1002/eji.200636110>.
- [138] D.J. Dowling, C.M. Noone, P.N. Adams, K.V. Vukman, S.F. Molloy, J. Forde, S. Asaolu, S.M. O'Neill, *Ascaris lumbricoides* pseudocoelomic body fluid induces a partially activated dendritic cell phenotype with Th2 promoting ability in vivo, *Int. J. Parasitol.* 41 (2011) 255–261, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.09.007>.
- [139] C. Napolitano, S. Mattiucci, A. Colantoni, F. Battisti, I.G. Zizzari, H. Rahimi, M. Nuti, A. Rughetti, Anisakis pegreffii impacts differentiation and function of human dendritic cells, *Parasite Immunol.* 40 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1111/pim.12527>.
- [140] R.C. Russo, C.C. Garcia, M.M. Teixeira, F.A. Amaral, The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases, *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10 (2014) 593–619, <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886>.
- [141] D.S. Nogueira, P.H. Gazzinelli-Guimarães, F.S. Barbosa, N.M. Resende, C.C. Silva, L.M. de Oliveira, C.C.O. Amorim, F.M.S. Oliveira, M.S. Mattos, L.R. Kraemer, et al., Multiple exposures to *Ascaris suum* induce tissue injury and mixed Th2/Th1 immune response in mice, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) 1–19, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004382>.
- [142] X. Hou, Y. Fu, W. Wang, J. Tong, Q. Pan, Y. Long, W. Qian, Th17: a new participant in gut dysfunction in mice infected with trichinella spiralis, *Mediat. Inflamm.* 2009 (2009) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2009/517052>.
- [143] M. Pelletier, L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani, et al., Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells, *Blood* 115 (2010) 335–343, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-216085>.
- [144] J.M. Inclan-Rico, M.C. Siracusa, First responders: innate immunity to helminths, *Trends Parasitol.* 34 (2018) 861–880, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.08.007>.
- [145] A.E. O'Connell, J.A. Hess, G.A. Santiago, T.J. Nolan, J.B. Lok, J.J. Lee, D. Abraham, Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice, *Infect. Immun.* 79 (2011) 2770–2778, <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-10>.
- [146] Posner Jonathan, S. Bradley, J.A.R. Peterson, Soluble extract from the nematode *Strongyloides stercoralis* induces CXCR2 dependent/IL-17 independent neutrophil recruitment, *Bone* 23 (2008) 1–7, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001605.Expanded>.
- [147] N. Graves, V.P. Venu, B.G. Yipp, B. Petri, S. Hirota, J. Gilleard, D.M. McKay, F. Lopes, A trypsin-sensitive proteoglycan from the tapeworm *Hymenolepis diminuta* inhibits murine neutrophil chemotaxis in vitro by suppressing p38 MAP kinase activation, *J. Innate Immun.* 11 (2019) 136–149, <https://doi.org/10.1159/000492303>.
- [148] R.T. Semnani, A.Y. Liu, H. Sabzevari, J. Kubofcik, J. Zhou, J.K. Gilden, T. B. Nutman, *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4+ T cells, *J. Immunol.* 171 (2003) 1950–1960, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1950>.
- [149] C. Chuah, M.K. Jones, M.L. Burke, D.P. Mcmanus, H.C. Owen, G.N. Gobert, Defining a pro-inflammatory neutrophil phenotype in response to schistosome eggs, *Cell Microbiol.* 16 (2014) 1666–1677, <https://doi.org/10.1111/cmi.12316>.
- [150] C. Wu, Q. Chen, Y. Fang, J. Wu, Y. Han, Y. Wang, Y. Yang, M. Chu, Y. Feng, L. Tan, et al., *Schistosoma japonicum* egg specific protein SJE16.7 recruits neutrophils and induces inflammatory hepatic granuloma initiation, *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2014) 8, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002703>.
- [151] K. Arndts, T.E.M. Elfaki, N. Jelden, M. Ritter, A. Wiszniewsky, G. Katawa, I. A. Goresch, El Mekki MEYAA, M.J. Doenhoff, A. Hoerauf, et al., *Schistosoma mansoni* PCR+ infected individuals in the Sudan present elevated systemic levels of chemokines when compared to uninfected and egg+ cohorts, *Clin. Exp. Immunol.* (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1111/cei.13270>.
- [152] P. Smith, R.E. Fallon, N.E. Mangan, C.M. Walsh, M. Saraiva, J.R. Sayers, A.N. J. McKenzie, A. Alami, P.G. Fallon, *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1319–1325, <https://doi.org/10.1084/jem.20050955>.
- [153] D.J. Dowling, C.M. Hamilton, S. Donnelly, J. La Course, P.M. Brophy, J. Dalton, S.M. O'Neill, Major secretory antigens of the Helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses, *Infect. Immun.* 78 (2010) 793–801, <https://doi.org/10.1128/IAI.00573-09>.
- [154] L. Bosurgi, Y.G. Cao, M. Cabeza-Cabrerizo, A. Tucci, L.D. Hughes, Y. Kong, J. S. Weinstein, P. Licona-Limon, E.T. Schmid, F. Pelorosso, et al., Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells, *Science* 356 (2017) 1072–1076, <https://doi.org/10.1126/science.aai8132>.
- [155] Y. Nakanishi, B. Lu, C. Gerard, A. Iwasaki, CTL mobilization to virus-infected tissue requires CD4+ T cell help. *Hwas public access*, *Nature* 462 (2009) 510–513, <https://doi.org/10.1038/nature08511.CTL>.
- [156] G.S.V. Campanella, A.M. Tager, J.K. El Khoury, S.Y. Thomas, T.A. Abraszinski, L. A. Manice, R.A. Colvin, A.D. Luster, Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 4814–4819, <https://doi.org/10.1073/pnas.0801544105>.
- [157] U.P. Singh, S. Singh, R. Singh, Y. Cong, D.D. Taub, J.W.J. Lillard, CXCL10-producing mucosal CD4+ T cells, NK cells, and NKT cells are associated with chronic colitis in IL-10(-/-) mice, which can be abrogated by anti-CXCL10 antibody inhibition, *J. Interf. Cytokine Res.* 28 (31–43) (2008), <https://doi.org/10.1089/jir.2007.0059>.
- [158] J. Menke, G.C. Zeller, E. Kikawada, T.K. Means, X.R. Huang, H.Y. Lan, B. Lu, J. Farber, A.D. Luster, V.R. Kelley, CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 1177–1189, <https://doi.org/10.1681/ASN.2007111179>.
- [159] G. Xanthou, C.E. Duchesnes, T.J. Williams, J.E. Pease, CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 2241–2250, <https://doi.org/10.1002/eji.200323787>.
- [160] H. Li, H. Chunsong, C. Guobin, Z. Qiuping, L. Qun, Z. Xiaolian, H. Baojun, Z. Linjie, L. Junyan, J. Mingshen, et al., Highly up-regulated CXCR3 expression on eosinophils in mice infected with *Schistosoma japonicum*, *Immunology* 111 (2004) 107–117, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01771.x>.
- [161] L.M. Lima, L.S. Cardoso, S.B. Santos, R.R. Oliveira, S.C. Oliveira, A.M. Góes, A. Loukas, M.I. Araujo, *Schistosoma* antigens downregulate CXCL9 production by PBMC of HTLV-1-infected individuals, *Acta Trop.* 167 (2017) 157–162, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.030>.
- [162] M.R. Hepworth, R.K. Grencis, Disruption of Th2 immunity results in a gender-specific expansion of IL-13 producing accessory NK cells during helminth infection, *J. Immunol.* 183 (2009) 3906–3914, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900577>.
- [163] M. Svensson, K. Russell, M. MacK, K.J. Else, CD4+ T-cell localization to the large intestinal mucosa during *Trichuris muris* infection is mediated by Gαi-coupled receptors but is CCR6- and CXCR3-independent, *Immunology* 129 (2010) 257–267, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03178.x>.
- [164] O.O. Asemota, O.P.G. Nmorsi, C. Isaac, E.M. Odoya, J. Akinseye, O. Isaac, Chemokines responses to *Ascaris lumbricoides* sole infection and co-infection with hookworm among Nigerians, *N. Am. J. Med. Sci.* 6 (2014) 84–88, <https://doi.org/10.4103/1947-2714.127750>.

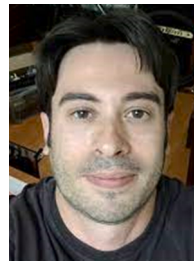
- [165] M.J. Stadecker, H. Asahi, E. Finger, H.J. Hernandez, L.I. Rutitzky, J. Sun, The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis, *Immunol. Rev.* 201 (2004) 168–179, <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00197.x>.
- [166] L.J. Cliffe, R.K. Grencis, The *Trichuris muris* system: a paradigm of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection, *Adv. Parasitol.* 57 (2004) 255–307, [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57004-5).
- [167] B. León, A. Ballesteros-Tato, J.L. Browning, R. Dunn, T.D. Randall, F.E. Lund, Regulation of T H2 development by CXCR5 + dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 681–690, <https://doi.org/10.1038/ni.2309>.



Dr. Lucas Kraemer is graduated in Biological Sciences from UFMG (2015), MSc in Physiology and Pharmacology (2017) from UFMG and Ph.D. in Parasitology (2022) from UFMG, concentration area in Immunoparasitology. As an undergraduate student at the Laboratory of Immunology and Pulmonary Mechanics (UFMG), headed by Prof. Dr. Remo Castro Russo, he began his studies in immunology and inflammation of lung diseases. During his MSc, he studied the role of the CCR2 chemokine receptor in the experimental model of lung injury associated with acute pancreatitis. During the Ph.D., now under the supervision of Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, head of the Laboratory of Immunology and Genomics of Parasites, and under the co-supervision of Prof. Dr. Remo Castro Russo, he studied the role of the atypical chemokine receptor ACKR2 in the immunoparasitological and pathophysiological aspects of experimental larval ascariasis.



Dr. Derek M. McKay is a Professor in the Department of Physiology and Pharmacology and director of the Calvin, Joan and Phoebe Snyder Institute for Chronic Diseases at the Cumming School of Medicine, University of Calgary. Dr. McKay is Chair of the Gastrointestinal Research Group (GIRG) at the University of Calgary and Past-President Canadian Association of Gastroenterology (2016–2018). Dr. McKay was recruited to the University of Calgary on a Canada Research Chair in Intestinal Immunophysiology and was concurrently awarded an Alberta Heritage Foundation for Medical Research (AHFMR) Scientist Award. He has wide-ranging interests in intestinal physiology and pathophysiology, particularly related to inflammatory disease. Current projects in his laboratory include: analysis of the impact of infection with helminth parasites on mucosal immunity and concurrent inflammatory disease, cytokine regulation of intestinal epithelial barrier function, the role of epithelial mitochondria in the control of epithelial permeability and inflammatory disease, and characterization of helminth-derived immunomodulatory molecules.



allergy, cancer and reproduction).

Dr. Remo Castro Russo is Associate Professor of the Physiology and Biophysics Department from UFMG and head of the Laboratory of Pulmonary Immunology and Mechanics at the Institute of Biological Sciences/UFMG. With a Ph.D. in Immunology, he has a wide-ranging research interest related to pulmonary physiology, immunology, and pharmacology in acute and chronic lung diseases, particularly with a vast experience regarding the cytokine and chemokine systems. Current projects in his laboratory include: Role of lung mucosal immunology during pulmonary fibrosis, pulmonary pharmacology, and the role of cytokines and chemokines in physiology and disease (lung inflammation and infection, fibrosis and



Dr. Ricardo Toshio Fujiwara is Associate Professor in the Department of Parasitology from UFMG and head of the Laboratory of Immunology and Parasite Genomics at the Institute of Biological Sciences/UFMG. He is affiliated member of the Brazilian Academy of Sciences (2012–2016) and Vice president of the Brazilian Society of Parasitology. Dr. Fujiwara has extensive experience in the field of Parasitology and Tropical Medicine, with emphasis on helminth immunology and the development of tools (diagnosis, vaccines and drugs) for the control of neglected diseases.