



**Universidade Federal de Minas Gerais**

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Rodrigo César de O. Sanches**

***SCHISTOSOMA* COMO ATIVADORES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO**

**INFLAMASSOMA:**

**a identificação do sensor NLRP6 como novo participante da patologia hepática**

**induzida pela esquistossomose**

Belo Horizonte – 2021

**Universidade Federal de Minas Gerais**

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Rodrigo César de O. Sanches**

***SCHISTOSOMA* COMO ATIVADORES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO  
INFLAMASSOMA:**

**a identificação do sensor NLRP6 como novo participante da patologia hepática  
induzida pela esquistossomose**

**Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-  
graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do  
grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia**

**Orientador:** Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira

Belo Horizonte – 2021

043

Sanches, Rodrigo César de Oliveira.

Schistosoma como ativadores da via de sinalização do inflamassoma: a identificação do sensor NLRP6 como novo participante da patologia hepática induzida pela esquistossomose [manuscrito] / Rodrigo César de Oliveira Sanches. – 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Schistosoma mansoni. 3. Sistema Imunitário. 4. Inflamassomos. 5. Fibrose. 6. Proteínas NLR. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE RODRIGO CÉSAR DE OLIVEIRA SANCHES.** Aos vinte e dois dias do mês de novembro de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, de forma "on line" utilizando a plataforma "Zoom", a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Schistosoma como ativadores da via de sinalização do inflamassoma: a identificação do sensor NLRP6 como novo participante da patologia hepática induzida pela esquistossomose", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Lucas Pedreira de Carvalho (Universidade Federal da Bahia), aprovado; Dra. Cristina Toscano Fonseca (Centro de Pesquisas René Rachou), aprovado; Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO

REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de novembro de 2021.

Dr. Lucas Pedreira de Carvalho (Universidade Federal da Bahia)

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

Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)

## **AGRADECIMENTOS**

Conquistas não caem da árvore dos acontecimentos, embora ironicamente sejam frutos, de muita dedicação. Para celebrar essa iminente conquista gostaria de registrar minha enorme, e primária, gratidão à minha família; pais, irmãos e noiva. Incansavelmente presentes em todos momentos, são parte de tudo;

Ao professor Dr. Sergio Costa, pela oportunidade de compor seu, sempre excelente, grupo de pesquisa e também pela confiança nos meus esforços;

À Sandra Fernandes por administrar o laboratório de forma tão profissional e competente, contribuindo significativamente para a fluidez de todos os projetos;

Aos meus amigos e colegas do grupo “Schisto”; Cláudia Souza, Fábio Mambelli, Enrico Gimenez, Suellen Batistoni e Natan Assis. Em especial à Cláudia que não só facilitou a minha inserção no grupo do LIDI, como também esteve presente do primeiro ao último experimento desse manuscrito. Além disso, foi companhia incansável das inúmeras discussões sobre o tema deste estudo, contribuindo diretamente para minha evolução científica. Gostaria, ainda, de agradecer especialmente ao Fábio Mambelli, que a exemplo da Cláudia, se fez presente em vários momentos e ainda se faz.

Aos demais colegas do LIDI, que nunca hesitaram em me auxiliar nos meus diversos questionamentos, teóricos ou práticos, e proporcionaram um ambiente de trabalho salutar. Em especial agradeço ao Fábio Marinho, que com paciência e humildade transmitiu todo seu conhecimento e vivência.

Por fim, agradeço à instituição Universidade Federal de Minas Gerais;

Embora a conclusão dessa etapa seja momento de grande alegria pessoal, não poderia deixar de registrar que este estudo foi desenvolvido durante o momento mais obscuro de nossa história. Sob a égide de um negacionista científico, sofremos e lutamos. E, portanto, este manuscrito também representa um ato de resistência!

“O mundo é para quem nasce para o conquistar. E não para quem sonha que pode conquistá-lo, ainda que tenha razão”

*Álvaro de Campos*

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária debilitante que afeta mais de 200 milhões pessoas em todo o mundo e causa aproximadamente 280.000 mortes por ano. Dentro de hospedeiro definitivo, os ovos liberados pelo parasito *Schistosoma mansoni* se alojam no intestino e especialmente no fígado, onde induzem um processo inflamatório granulomatoso, que ocasionalmente leva à fibrose. Os mecanismos moleculares relacionados a formação do granuloma ainda não foram plenamente elucidados. A ativação da via de sinalização do inflamassoma tem sido relatada como um evento molecular crucial na indução da patologia hepática, especialmente por intermédio do sensor NLRP3. Recentemente, outros sensores da via do inflamassoma, como NLRP6, foram relacionados com doenças hepáticas e processos fibróticos. No entanto, a contribuição desta molécula na patologia hepática associada à esquistossomose ainda não foi avaliada. No presente estudo, usando células dendríticas derivadas de medula óssea, demonstramos que o sensor NLRP6 é importante para a produção de IL-1 $\beta$  e para a ativação da caspase-1, em resposta a antígenos solúveis dos ovos (SEA). Além disso, a ausência de NLRP6 culminou em redução significativa na inflamação periovular, na deposição de colágeno em granulomas hepáticos e nos níveis de mRNA de  $\alpha$ -SMA e IL-13. Os fígados de camundongos *Nlrp6*<sup>-/-</sup> apresentaram níveis reduzidos de CXCL1/KC, CCL2, CCL3, IL-5 e IL-10, bem como de atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO). Ademais, após 6 semanas de infecção, a frequência das populações de macrófagos e neutrófilos apresentaram-se diminuídas no fígado de camundongos *knockout* para NLRP6. Por fim, observou-se que a formação de granuloma hepático e a deposição de colágeno nessas estruturas também foi comprometida em camundongos *Caspase-1*<sup>-/-</sup>, *IL-1R*<sup>-/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup>. Nossos resultados sugerem que o inflamassoma NLRP6 desempenha papel chave na patologia hepática associada à esquistossomose.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*, imunopatologia, inflamassoma, NLRP6, fibrose

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a debilitating parasitic disease that affects more than 200 million people worldwide and causes approximately 280,000 deaths per year. Inside the definitive host, eggs released by *Schistosoma mansoni* lodge in the intestine and especially in the liver where they induce a granulomatous inflammatory process, which can lead to fibrosis. The molecular mechanisms initiating or promoting hepatic granuloma formation remain poorly understood. Inflammasome activation has been described as an important pathway to induce pathology mediated by NLRP3 receptor. Recently, other components of the inflammasome pathway, such as NLRP6, have been related to liver diseases and fibrotic processes. Nevertheless, the contribution of these components in schistosomiasis-associated pathology is still unknown. In the present study, using dendritic cells, we demonstrated that NLRP6 sensor is important for IL-1 $\beta$  production and caspase-1 activation in response to soluble egg antigens (SEA). Furthermore, the lack of NLRP6 has been shown to significantly reduce periovular inflammation, collagen deposition in hepatic granulomas and mRNA levels of  $\alpha$ -SMA and IL-13. Livers of *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mice showed reduced levels of CXCL1/KC, CCL2, CCL3, IL-5, and IL-10 as well as Myeloperoxidase (MPO) and Eosinophilic Peroxidase (EPO) enzymatic activity. Consistently, the frequency of macrophage and neutrophil populations were lower in the liver of NLRP6 knockout mice, after 6 weeks of infection. Finally, it was further demonstrated that the onset of hepatic granuloma and collagen deposition were also compromised in *Caspase-1*<sup>-/-</sup>, *IL-1R*<sup>-/-</sup> and *Gsdmd*<sup>-/-</sup> mice. Our findings suggest that the NLRP6 inflammasome is an important component for schistosomiasis-associated pathology.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*, immunopathology, inflammasome, NLRP6, fibrosis



## LISTA FIGURAS

Figura 1. Distribuição global da esquistossomose categorizada por espécie .....	13
Figura 2. Ciclo biológico de parasitos do gênero <i>Schistosoma</i> .....	15
Figura 3. Ativação da via do inflamassoma .....	27
Figura 4. Mecanismos moleculares dos processos de indução de piroptose canônica e não-canônica .....	30
Figura 5. Granulomas hepáticos característicos de infecções por <i>S. mansoni</i> e <i>S. japonicum</i> e suas constituições celulares .....	34
Figura 6. NLRP6 regula a produção de IL-1 $\beta$ e a ativação de caspase-1 induzida por SEA ...	47
Figura 7. NLRP6 não influencia o número de ovos no fígado e a carga parasitária .....	48
Figura 8. A patologia associada a infecção por <i>S. mansoni</i> é influenciada por NLRP6 .....	50
Figura 9. NLRP6 regula a produção de quimiocinas e a atividades enzimáticas no fígado.....	51
Figura 10. Estratégia de <i>gate</i> para citometria de fluxo de células não-parenquimais hepáticas de animais WT e <i>Nlrp6</i> <sup>-/-</sup> .....	52
Figura 11. NLRP6 regula o recrutamento de células para o fígado .....	53
Figura 12. Análise da polarização de macrófagos no fígado.....	53
Figura 13. Perfil de citocinas esplênicas induzidas por SEA/Ovos e SWAP .....	55
Figura 14. O sensor NLRP3 influencia a imunopatologia induzida por <i>S. mansoni</i> .....	56
Figura 15. A ativação do inflamassoma é requerida para a formação do granuloma e para deposição de colágeno .....	57
Figura 16. A via do inflamassoma não influencia o número de ovos no fígado e a carga parasitária.....	57

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ADCC:** Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo

**AIM-2:** Proteína Ausente no Melanoma

**ALD:** Doença Hepática Alcólica

**AP-1:** Proteína Ativadora 1

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**BMDC:** Célula Dendrítica Derivada de Medula Óssea

**BMDE:** Eosinófilo Derivado de Medula Óssea

**cGAS:** Guanosina (GMP)-Adenosina (AMP) Cíclico Sintase

**DC:** Célula Dendrítica

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**ECM:** Matrix Extracelular

**EPO:** Peroxidase Eosinofílica

**FcR $\gamma$ :** Receptor do Tipo Fc *gama*

**GSDMD:** Gasdermina-D

**GTP:** Guanosina Trifosfato

**HSC:** Célula Hepática Estrelada

**IFN- $\gamma$ :** Interferon *gama*

**IL:** Interleucina

**IL-12R:** Receptor de IL-12

**IRF3:** Fator Regulador de Interferon 3

**ISG:** Genes Inflamatórios induzidos por Interferon

**iTreg:** Treg induzível

**ITAM:** Imunoreceptor de Ativação baseado em Tirosina

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**MAC:** Complexo de Ataque a Membrana

**MEF:** Fibroblasto Embrionário de Camundongo

**MHC classe II:** Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II

**MMP9:** Metaloproteinase 9

**Myd88:** Fator de Diferenciação Mieloide 88

**MPO:** Mieloperoxidase

**mRNA:** RNA mensageiro

**MR:** Receptor de Manose

**NASH:** Esteatose Hepática Não Alcoólica

**NF- $\kappa$ B:** Fator Nuclear *kappa* B

**NFLD:** Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

**NK:** Célula Assassina Natural

**NLR:** Receptores do tipo NOD

**nTreg:** Treg natural

**PAMP:** Padrão Molecular Associados a Patógeno

**PBMC:** Célula Mononuclear Periférica

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina 2

**PRR:** Receptor de Reconhecimento de Padrão

**Rag-1:** Recombinase-1

**ROS:** Espécies Reativas de Oxigênio

**RNA:** Ácidos ribonucleicos

**SEA:** Antígenos Solúveis de Ovos

**Syk:** Cinase Esplênica

**STING:** Estimulador de Genes de Interferon

**SWAP:** Antígenos Solúveis de Verme Adulto

**TCR $\alpha\beta$ :** Receptor de Células T

**Th1:** Células T auxiliares do tipo 1

**TIMP-1:** Inibidor de Metaloproteinase 1

**TLR:** Receptores do tipo Toll

**TNF:** Fator de Necrose Tumoral

**Treg:** Célula T reguladora

**TRIF:** Indutor de Interferon- $\beta$  contendo domínio TIR

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Esquistossomose .....	12
1.2 Patologia e aspectos clínicos.....	16
1.2.1 Esquistossomose aguda .....	16
1.2.2 Estágio de infecção ativamente estabelecido .....	17
1.2.3 Esquistossomose crônica.....	18
1.3 A relação imunológica parasito-hospedeiro na infecção por <i>Schistosoma</i> .....	19
1.3.1 A esquistossomose e o sistema imune inato.....	19
1.3.1.1 A ativação de Receptores do tipo Toll (TLRs) por antígenos do <i>Schistosoma</i> .....	20
1.3.1.2 Receptores de Lectina tipo C (CLRs) e suas funções chave na esquistossomose.....	22
1.3.1.3 A participação do adaptador STING e do Interferon do tipo I (IFN-I) na esquistossomose .....	24
1.3.1.4 O relevante papel do inflamassoma nas infecções por <i>Schistosoma</i> .....	26
1.3.2 Aspectos fundamentais da resposta imune adaptativa durante a esquistossomose..	31
1.3.3 O granuloma hepático .....	32
2. JUSTIFICATIVA .....	37
3.1 Objetivos geral .....	38
3.2 Objetivos específicos .....	38
4. MÉTODOS .....	39
4.1 Animais e parasitos .....	39
4.2 Preparo de antígenos (Ovos, SEA e SWAP) .....	39
4.3 Diferenciação e estímulo de BMDCs .....	40
4.4 Western Blotting .....	41
4.5 Cultura de esplenócitos .....	41
4.6 Processamento hepático .....	42
4.7 Citocinas e quimiocinas .....	42

4.8 Ensaio de atividade MPO e EPO.....	43
4.9 Citometria de fluxo .....	43
4.10 PCR em tempo real .....	44
4.11 Infecção e carga parasitária.....	45
4.12 Parâmetros patológicos .....	45
4.13 Análises estatísticas .....	46
5. RESULTADOS .....	46
5.1 A produção de IL-1 $\beta$ e a ativação de caspase-1 em células dendríticas estimuladas com Ovos/SEA são parcialmente dependentes de NLRP6.....	46
5.2 O NLRP6 influencia a formação do granuloma e a deposição de colágeno no fígado ..	48
5.3 O sensor NLRP6 medeia o recrutamento de células imunes inatas para o fígado de animais infectados por <i>S. mansoni</i> .....	49
5.4 A produção de IL-10 e IFN- $\gamma$ por esplenócitos ativados com SEA/Ovos é influenciada por NLRP6.....	54
5.5 A via de sinalização do inflamassoma é amplamente relevante na formação do granuloma hepático.....	54
6. DISCUSSÃO .....	58
7. CONCLUSÃO.....	65
8. REFERÊNCIAS .....	66
9. ANEXO .....	81
9.1 Estudos publicados durante o período do doutorado .....	81
9.2 Estudos principais gerados a partir da tese de doutorado .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

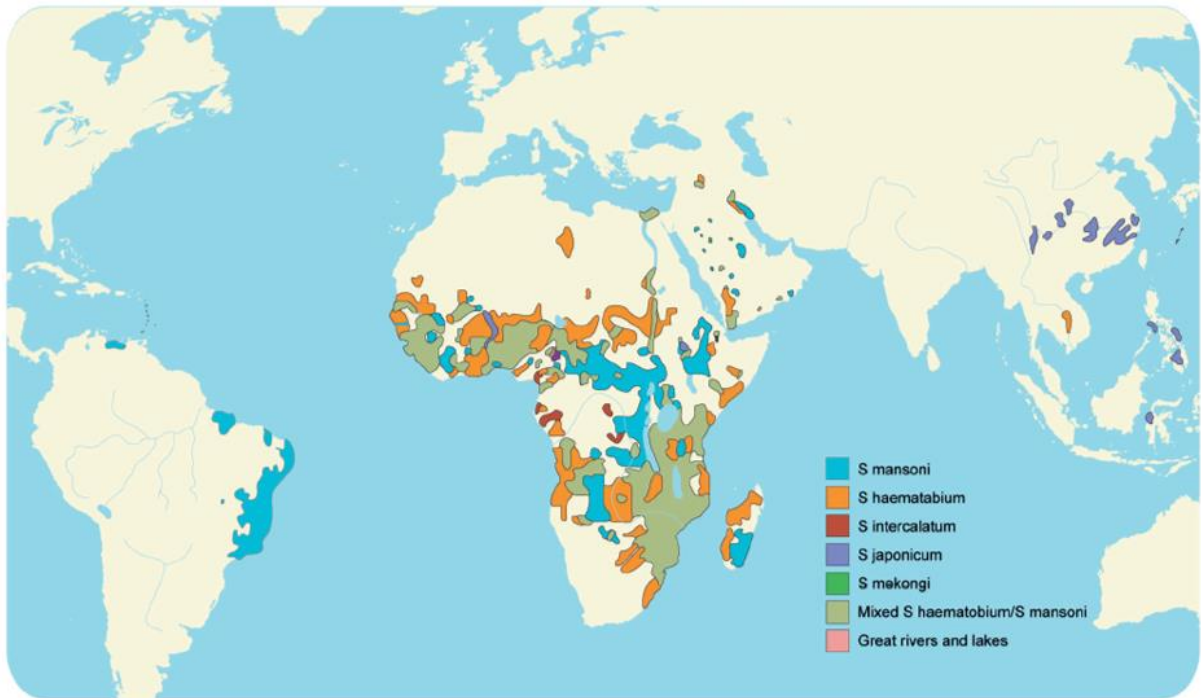
### 1.1 Esquistossomose

Inicialmente descrita em 1851, pelo médico alemão Theodor Bilharz (Farley, 2003), a esquistossomose é uma doença parasitária humana resultante da infecção por parasitos trematódeos do gênero *Schistosoma* (Sturrock, 2001). A doença se apresenta como uma enfermidade de caráter crônico, gradualmente debilitante. Dados da Organização Mundial de Saúde a classificam como a segunda doença de importância socioeconômica no mundo, atrás apenas da malária, e como a terceira doença parasitária de maior relevância no que diz respeito à saúde pública (WHO, 2004).

A distribuição global da esquistossomose abrange 78 países, localizados em diferentes continentes como África, Ásia e América do Sul (Figura 1). Estima-se que, mundialmente, haja 779 milhões de pessoas sob risco de infecção e que mais de 250 milhões encontram-se infectadas. Dentre as regiões acometidas, o continente africano é, notavelmente, o mais prevalente, abrigando a grande maioria dos casos globais (Chitsulo et al., 2000; Engels et al., 2002; Steinmann et al., 2006). Na América do Sul, o Brasil é o país com maior prevalência de esquistossomose, com aproximadamente 25 milhões de pessoas morando em áreas endêmicas e 3 milhões de indivíduos infectados (Katz, Peixoto, 2000) .

Embora existam dentro do gênero *Schistosoma* cerca de 21 espécies, três são consideradas como mais relevantes à saúde humana: o *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e o *Schistosoma haematobium*. As demais espécies como o *Schistosoma guineensis*, *Schistosoma intercalatum* e o *Schistosoma mekongi* apresentam prevalência global pouco expressiva (LoVerde, 2019). O ciclo de vida desses parasitos requer, obrigatoriamente, a participação de um hospedeiro intermediário invertebrado (caramujo), onde ocorre um processo de divisão assexuada. Cada espécie de *Schistosoma* infecta seletivamente uma gênero de

caramujo (*S. mansoni* - *Biomphalaria* / *S. haematobium* - *Bulinus* / *S. japonicum* - *Oncomelania* (Sturrock, 2001), por esta razão a distribuição geográfica da doença está intimamente relacionada à prevalência e disponibilidade do hospedeiro invertebrado ao redor do planeta.



**Figura 1. Distribuição global da esquistossomose categorizada por espécie.** Fonte: (Shaker et al., 2014).

As espécies de *Schistosoma* que comumente infectam os seres humanos apresentam ciclos de vida semelhantes (Figura 2). O ciclo de vida desses parasitos se inicia quando seus ovos alcançam a água, através de urina ou fezes de indivíduos infectados. Após o contato com a água, os ovos liberam larvas ciliadas de vida livre, denominadas miracídios, que infectam o hospedeiro intermediário. Posteriormente à infecção, os miracídios se desenvolvem em um estágio conhecido como esporocisto. Os esporocistos, por sua vez, se reproduzem assexuadamente dando origem a centenas de milhares de larvas, denominadas cercárias (Basch, 1991). Esse número expressivo de cercárias (Tucker et al., 2014), produzidas a partir de apenas um miracídio, demonstra como poucos caramujos infectados são capazes de criar um foco ativo de transmissão.

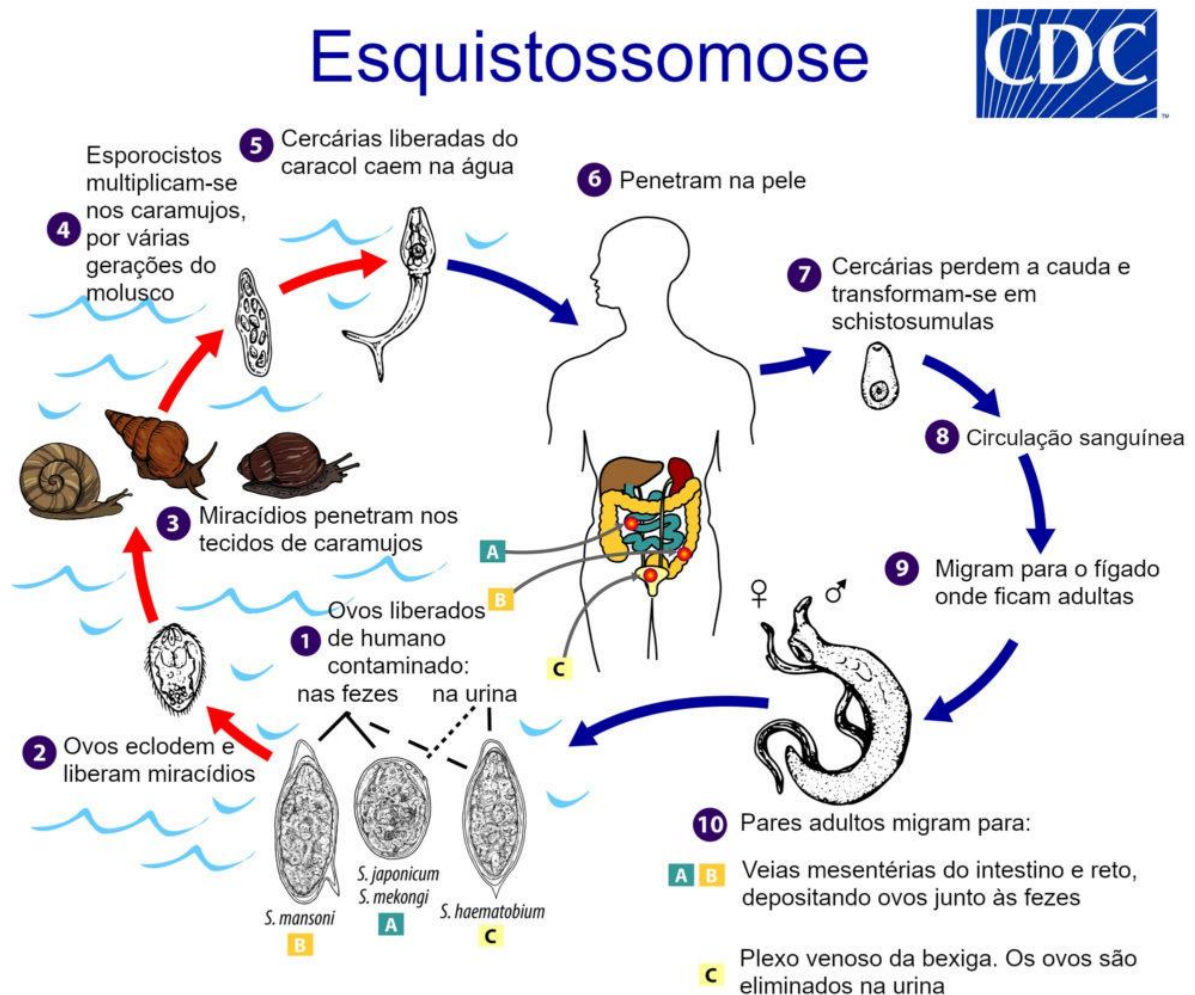
Do ponto de vista morfológico as cercárias são divididas em dois segmentos, uma cauda bifurcada associada a uma região denominada corpo. Extremamente muscular, a cauda propicia a movimentação do parasito na água e auxilia, ainda, no processo de entrada do mesmo no hospedeiro definitivo. O corpo, por sua vez, possui boa parte de seu volume constituído por glândulas acetabulares, que secretam enzimas indispensáveis para a penetração do parasito na pele (Collins III et al., 2011; Dorsey et al., 2002). Sob estímulo da luz solar, em condições naturais, as cercárias são liberadas na água onde permanecem até encontrarem um hospedeiro definitivo. Contudo, o tempo de meia-vida para esses parasitos no ambiente varia entre de 24 a 48 horas (Lawson, Wilson, 1980; LoVerde, 2019).

Após localizar o hospedeiro definitivo, as cercárias o penetram, perdem sua cauda e se transformam em esquistossômulos. Parte desses parasitos morrem na pele (Clegg, Smithers, 1968), enquanto os demais continuam o processo de infecção. Estudos demonstram que a grande maioria dos esquistossômulos de *S. mansoni* e *S. haematobium* se encontram na epiderme nas primeiras 24 horas de infecção. Em seguida, esses parasitos vão para a derme e, posteriormente, atingem os vasos dérmicos com aproximadamente 72 horas de infecção. Uma vez nos capilares sanguíneos, os esquistossômulos são transportados à porção direita do coração e, em seguida, aos pulmões (Stirewalt, 1974; Stirewalt et al., 1983; Stirewalt, Hackey, 1956). Os esquistossômulos permanecem dentro dos capilares pulmonares entre 3-16 dias. Nesse nicho, esses parasitos se transformam em organismos mais longos e delgados, essa morfologia lhes permite atravessar os finos capilares pulmonares em direção à porção esquerda do coração e, através da circulação sistêmica, conseguem alcançar o fígado (Georgi et al., 1987). Os parasitos permanecem alojados no fígado entre 4-6 semanas após a infecção (Gryseels et al., 2006). Nesse último tecido, os mesmos se desenvolvem até atingirem a maturidade sexual (LoVerde et al., 2004), se acasalam e migram para as veias mesentéricas superiores (*S.*



*mansoni*), para as veias mesentéricas inferiores (*S. japonicum*) ou para veias drenantes do ureter (*S. haematobium*), dando início a ovoposição (Papamatheakis et al., 2014).

Após a ovoposição, os ovos atravessam a parede dos vasos sanguíneos até o lúmen do intestino, ou da bexiga, e são liberados do hospedeiro através das fezes ou urina. Em contato com a água os ovos liberam os miracídios e o ciclo de vida do parasito é iniciado novamente (Ross et al., 2002). Entretanto, mais da metade desses ovos ficam aprisionados no hospedeiro, provocando reações inflamatórias, que são a grande causa de morbidade e mortalidade associada à doença (Cheever, Andrade, 1967).



**Figura 2. Ciclo biológico de parasitos do gênero *Schistosoma*.** Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>>. Acesso em: abril. 2021.

## **1.2 Patologia e aspectos clínicos**

A progressão do parasito dentro hospedeiro definitivo desencadeia diferentes manifestações clínicas que estão intimamente relacionados às formas evolutivas encontradas no curso da doença (Barsoum et al., 2013). Durante esse processo três estágios, que se sobrepõem, são identificados: o estágio agudo, um estágio intermediário definido como ativamente estabelecido e o estágio crônico/tardio (McManus, 2018).

### **1.2.1 Esquistossomose aguda**

Após penetrar na pele intacta, as cercárias se transformam em esquistossômulos. Entre outras modificações, os esquistossômulos desenvolvem uma membrana lipídica interna e externa com a finalidade de proteger o parasito, contudo, durante esse processo o mesmo se torna vulnerável ao ataque do sistema imunológico (Butterworth et al., 1975). Os esquistossômulos, mortos ou em processo de morte, desencadeiam uma reação de hipersensibilidade imediata, que se apresenta clinicamente como um exantema maculopapular pruriginoso, designado como dermatite cercariana (Appleton, Lethbridge, 1979; Kolářová et al., 2013). Em seguida, os esquistossômulos sobreviventes entram na circulação venosa sistêmica visando alcançar a circulação arterial pulmonar para, posteriormente, se alojar em sua vasculatura. Esse processo migratório induz um conjunto de sinais característico do estágio agudo da doença, denominado como síndrome ou febre de Katayama. Tal sintoma decorre de uma reação de hipersensibilidade sistêmica e da geração de imunocomplexos, formados a partir dos antígenos liberados pelos esquistossômulos (e, a posteriori, pelos ovos). Outras manifestações clínicas dessa síndrome podem incluir dores de cabeça, mialgias e sintomas respiratórios como tosse e dispneia (Kapoor, 2014; Ross et al., 2007).

É importante salientar que as manifestações clínicas supracitadas são usualmente observadas em indivíduos não residentes de área endêmicas, que encontram o parasito pela

primeira vez. Essa observação tem sido associada ao processo de dessensibilização no útero, que resulta em recém-nascidos com menor responsividade a antígenos do parasito, quando mães (de áreas endêmicas) infectadas dão a luz (King et al., 1998). Além disso, a exposição repetida à cercárias também se correlaciona a redução de responsividade, uma vez que essas podem induzir a produção de Interleucina-10 (IL-10) por células T CD4<sup>+</sup> presentes na pele (Sanin et al., 2015).

### **1.2.2 Estágio de infecção ativamente estabelecido**

A presença dos vermes adultos nas veias mesentéricas e o início da ovoposição caracterizam o estágio de infecção ativamente estabelecido (McManus, 2018). Durante esse período, os vermes não induzem inflamação local e, assim, também não provocam sintomas de maneira direta. Isso se deve, principalmente, à capacidade das células-tronco somáticas do parasito em revestir sua superfície com uma camada celular capaz de se ligar a antígenos próprios, reduzindo assim o reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro (Collins III et al., 2013; Goldring et al., 1976).

Os ovos, por sua vez, passam ser detectados nas fezes (*S. mansoni*; *S. japonicum*) e na urina (*S. haematobium*) e serão responsáveis pelos sintomas típicos do estágio em questão. Durante o processo de liberação, quantidades expressivas dos ovos são aprisionadas em órgão próximos àqueles onde os vermes realizam a ovoposição, como o intestino, o fígado e bexiga. A resposta inflamatória ao redor dos ovos encontrados nos tecidos leva a formação de granulomas (Wilson et al., 2007). Essa coleção de células imunes circundando os ovos é responsável pelos sintomas clínicos, órgão-específico, observados no estágio de infecção ativamente estabelecido.

### 1.2.3 Esquistossomose crônica

À medida que a infecção se estende, cronologicamente, indivíduos jovens provenientes de áreas endêmicas tendem a desenvolver imunidade parcial contra novas infecções. Esse fato, associado à morte natural dos vermes, reduz a carga parasitária nesses indivíduos. Um reflexo desse evento é a redução da deposição e aprisionamento de ovos (Clarke, 1966; Wilkins et al., 1984). A cronicidade na esquistossomose é definida a partir da décima segunda semana de infecção, onde os granulomas tendem a ser resolvidos gradualmente à medida que os ovos em seu interior morrem (Pearce, MacDonald, 2002).

Entretanto, as reações inflamatórias ao redor dos ovos trazem, eventualmente, graves consequências aos indivíduos infectados, o que caracteriza os sintomas clínicos da fase crônica. A esquistossomose urinária, causada pelo parasito *S. haematobium*, caracteriza-se pela deposição de ovos na parede da bexiga e dos ureteres. As manifestações iniciais são marcadas pela disúria, hematúria, proteinúria e leucocitúria. Os rins, bexiga e genitálias são seriamente afetados após a instalação da infecção crônica e, em casos graves, podem levar a carcinogênese e insuficiência renal crônica (Barsoum, 2013; D Almeida et al., 2007). Na esquistossomose intestinal, os ovos alojados na mucosa ou na submucosa do intestino causam lesões teciduais, que podem se estender no lúmen intestinal como pseudopapilomas, polipose, ulceração e formação de abscessos (Shaker et al., 2014; Weerakoon et al., 2015). Por sua vez, na forma hepatoesplênica da esquistossomose, os ovos que residem no fígado levam, eventualmente, a formação de fibrose contínua do tecido periportal. Tal evento pode progredir e gerar obstrução dos vasos portais, danificando assim, o parênquima hepático. Esses danos levam a hipertensão portal, esplenomegalia, ascite e varizes gastroesofágicas. A exsanguinação pelo sangramento varicoso esofágico é a principal causa de morte pelo *Schistosoma mansoni* (Shaker et al., 2014; Song et al., 2016).

### **1.3 A relação imunológica parasito-hospedeiro na infecção por *Schistosoma***

A interação entre o *Schistosoma* e o hospedeiro vertebrado é certamente complexa, do ponto de vista imunológico. O parasito vive, em média, cinco anos dentro do hospedeiro e esse tempo pode se estender a décadas (Markel et al., 1978). Para tanto, o *Schistosoma* exerce notável capacidade de manipulação do sistema imunológico, que se evidencia também quando seus antígenos são empregados em contextos patológicos alheios à própria infecção (Bafica et al., 2012). A composição antigênica de cada forma evolutiva do parasito varia e cada uma delas induz respostas específicas e essenciais para que o curso da doença aconteça de forma favorável ao parasito (McWilliam et al., 2013; Simpson, 1990).

#### **1.3.1 A esquistossomose e o sistema imune inato**

O principal processo patológico decorrente da infecção pelo *Schistosoma* - a formação do granuloma - é governado pela resposta imune adaptativa em seus diferentes mecanismos efetores (discutido adiante). No entanto, o papel da resposta imune inata e de seus receptores é fundamental para o estabelecimento de uma resposta imune adaptativa efetiva (Iwasaki, Medzhitov, 2015), e por conseguinte, têm relevância no curso da doença. Os antígenos liberados pelas diferentes formas evolutivas do parasito têm notável capacidade de ativação de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs), como visto a seguir.

A sinalização via PRRs é sabidamente fundamental para traçar o destino que células imunes, especialmente inatas, terão após o encontro com um microrganismo, seja ele patogênico ou comensal. Além disso, esses receptores podem reconhecer sinais de dano do próprio organismo, o que também influencia no fenótipo que devem assumir e quais ações realizarão (Franz, Kagan, 2017). Esses receptores podem ser categorizados em diferentes classes e estão distribuídos em compartimentos distintos na célula, como membrana plasmática,

membranas endossomais, associados a organelas ou dispersos no citosol (Iwasaki, Medzhitov, 2015).

### **1.3.1.1 A ativação de Receptores do tipo Toll (TLRs) por antígenos do *Schistosoma***

Os TLRs representam uma das classes de receptores imunes mais bem estudada, com ativação e funções elucidadas em diferentes contextos. Em humanos são encontrados dez tipos de TLRs, ao passo que em camundongos são relatados doze (Kawai, Akira, 2010). Uma grande diversidade de células expressa esses receptores, como células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório, miofibroblastos, astrócitos, linfócitos T e B, macrófagos e Células Dendríticas (DCs) (Bsibsi et al., 2002; Cario et al., 2000; Hart et al., 2005; Otte et al., 2003; Takeda, Akira, 2005). Os TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 10 são expressos na membrana plasmática e estão envolvidos com o reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), como lipídeos, proteínas e glicoconjugados lipídicos ou proteicos. Os TLRs 3, 7, 8 e 9 são receptores encontrados em compartimentos celulares como endossomos, lisossomos e retículo endoplasmático. Esses últimos, por sua vez, reconhecem outra classe de PAMPs, como os ácidos nucleicos (Ashour, 2015). Resumidamente, a sinalização intracelular desencadeada pela ativação de TLRs envolve a participação de moléculas adaptadoras denominadas Fator de Diferenciação Mieloide 88 (Myd88) e o Indutor de Interferon- $\beta$  contendo domínio TIR (TRIF), que levam a ativação de fatores de transcrição denominados como Fator Nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), Proteína Ativadora 1 (AP-1) e Fator Regulador de Interferon 3 (IRF3). Toda essa sinalização culmina na transcrição e expressão de genes inflamatórios (Kawasaki, Kawai, 2014).

A resposta a helmintos mediada por TLRs pode ocorrer tanto de maneira direta (via interação com antígenos do parasito) como de maneira indireta (resultado dos danos causados pela atividade parasitária). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a relevância de TLRs tanto

em respostas iniciais a esquistossômulos, recém-penetrados na pele do hospedeiro, como na fase tardia onde a patologia hepática é pronunciada. Os produtos secretados por esquistossômulos (*S. mansoni*), cultivados por 3h, são capazes de alterar a produção de citocinas (IL-6 -, IL-12p40, e IL-10) em macrófagos primados por tioglicolato, de maneira dependente e independente de TLR 4 (Jenkins et al., 2005). A alteração na produção de citocinas pró-inflamatórias nesse contexto específico ocorre essencialmente por intermédio de carboidratos secretados ativamente pelo parasito. Investigações *in vivo* também demonstram que na pele (auricular) de camundongos deficientes para TLR 4, a produção de IL-12, Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-10 é reduzida, após quatro dias de infecção. Em animais deficientes para TLR 2 o fenótipo dessa mesma abordagem é o oposto (Zhang et al., 2011). Isso demonstra que TLR 4 e TLR 2 podem estar relacionados à ativação e modulação, respectivamente, da resposta imune local frente a esquistossômulos (*S. japonicum*).

O papel de TLR 2 no curso da doença parece ser ainda mais relevante quando se analisa outros parâmetros. A deficiência de TLR 2, em camundongos infectados com *S. mansoni*, cursa com aumento da resposta de células T auxiliares tipo 1 (Th1) e comprometimento na expansão de células T reguladoras (Tregs) (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). Como consequência, constata-se nesses animais redução na carga de ovos, mas aumento no granuloma hepático (Layland et al., 2007). Além disso, a presença de TLR 2 em DCs é fundamental para mediar a indução de células T regs produtoras de IL-10, quando as DCs são estimuladas com liso-fosfatidilserina advinda de ovos do parasito (van der Kleij et al., 2002).

Diferentemente do que se observa para patógenos como vírus, a ativação de TLRs mediada por material genético não era esperada para ocorrer em infecções por *Schistosoma*. Contudo, o estímulo de DCs com ovos do parasito resulta, entre outras respostas, na expressão de Genes Inflamatórios induzidos por Interferon (ISG), característicos de ativação por ácidos nucleicos (Trottein et al., 2004). A partir disso, constatou-se que, especificamente, Ácidos

Ribonucleicos (RNA) dupla fita (dsRNA) advindo de ovos do parasito tem o potencial de ativar TLR 3 em DCs (Aksoy et al., 2005).

Embora se observe a competência dos antígenos de *Schistosoma* em ativar receptores TLRs, estudos relatam também notável capacidade dos mesmos em regular negativamente a sinalização desencadeada por esses receptores, especificamente mediante ação dos Antígenos Solúveis de Ovos (SEA) (Correale, Farez, 2009; Kane et al., 2004). Em uma dessas observações, DCs co-estimuladas com Lipopolissacarídeo (LPS) e SEA têm a expressão de moléculas co-estimulatórias e a produção de IL-12, IL-6 e do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) moduladas (van Liempt et al., 2007). Tais mecanismos representam umas das formas pelas quais os ovos podem promover a transição da resposta sistêmica (Th1 para Th2) que ocorre durante a esquistossomose.

### **1.3.1.2 Receptores de Lectina tipo C (CLRs) e suas funções chave na esquistossomose**

Constituindo uma família de mais de 1000 membros, classificados em 17 grupos, os CLRs representam uma classe de receptores de grande relevância na esquistossomose (Vázquez-Mendoza et al., 2013). Tais receptores/lectinas tem afinidade seletiva por carboidratos e são proteínas amplamente distribuídas em plantas, animais e microrganismos. Em animais, as lectinas desempenham papéis tanto em contextos fisiológicos como patológicos que incluem; o desenvolvimento embrionário, tráfego intracelular, reconhecimento célula-célula e/ou célula-matrix, endocitose, fagocitose, entre outros (Duverger et al., 2010).

Os fungos são organismos que comumente ativam CLRs, devido à composição de sua parede celular, rica em polímeros de carboidratos (van de Veerdonk et al., 2008). Por essa razão, também, são organismos nos quais as vias de sinalização desencadeadas por esses receptores estão bem elucidadas. Os CLRs necessitam inicialmente de motivos intracelulares (Imunoreceptor de Ativação Baseado em Tirosina - ITAM) para desencadear suas vias. Esses



últimos podem ser encontrados nos próprios CLRs ou em receptores acessórios, como o Receptor Fc $\gamma$  (FcR $\gamma$ ), que se associa ao CLR para iniciar a cascata de sinalização. A ativação da enzima Cinase Esplênica (Syk) é parte fundamental da sinalização via CLR. Entre outras ações, Syk promove a formação de complexos intracelulares que induzem a ativação de NF- $\kappa$ B (CARD9-Bcl10-MALT1) e clivagem (CARD9-Bcl10-MALT1-ASC-Caspase 8) de pró-citocinas inflamatórias (Gross et al., 2006; LeibundGut-Landmann et al., 2008; Rogers et al., 2005; Tang et al., 2018). Além disso, a ativação de Syk induz a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), o que de maneira indireta ativa a via de sinalização do inflamassoma (Mócsai et al., 2010).

Os CLRs estão envolvidos, amplamente, em infecções parasitárias, desde protozoários como *Leishmania* até trematódeos como *Schistosoma*, passando por nematódeos (*Trichuris*) e cestódeos (*Taenia*) (Vázquez-Mendoza et al., 2013). Dentre os CLRs que participam ativamente durante a esquistossomose relata-se o Receptor de Manose (MR), Dectina-1, Dectina-2, CD209a e MGL (Lu et al., 2017; Paveley et al., 2011; Ponichtera et al., 2014; Ritter et al., 2010; van Liempt et al., 2007). Alguns desses receptores tem participação decisiva em fenótipos da doença e são ativados essencialmente por glicoconjugados produzidos pelos ovos do parasito.

Homólogo ao receptor DC-SIGN humano, o receptor CD209a é expresso em camundongos e nesses animais desempenha não só papel crucial na patologia hepática, como também é molécula chave para explicar a diferença entre as respostas, exacerbadas e moderadas, desenvolvidas em camundongos CBA e C57BL/6, respectivamente. Em camundongos CBA a patologia hepática se apresenta mais severa, com granulomas maiores e menos circunscritos, com participação indispensável de respostas adaptativas Th1/Th17. Em animais C57BL/6, por outro lado, a patologia hepática é moderada, com granulomas relativamente menores e bem definidos, onde as respostas Th1/Th2 são mais relevantes

(Rutitzky, Stadecker, 2011). Recentemente, constatou-se que o receptor CD209a é o principal responsável por esse comportamento divergente entre espécies, a expressão desse receptor é dezoito vezes menor em células dendríticas de animais C57BL/6 quando comparados aos animais CBA (Ponichtera et al., 2014). Essa expressão reduzida altera a capacidade de produção sustentada de IL-23 e IL-1 $\beta$  e, por conseguinte, a diferenciação em um perfil de resposta Th17, o que dá lugar a um perfil Th2 menos severo – observado em animais C57BL/6. Ademais, em camundongos (CBA) deficientes para CD209a são encontrados granulomas hepáticos significativamente reduzidos, os quais se assemelham àqueles característicos de animais C57BL/6 (Kalantari et al., 2018).

De maneira semelhante ao CD209a, o receptor Dectina-2 é descrito como fundamental na resposta à antígenos dos ovos. Tal receptor licencia células dendríticas humanas a promoverem respostas Th2, após estímulo com SEA, por intermédio da produção de Prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), que age de maneira autócrina nessas células. Coerentemente, em animais C57BL/6 deficientes para Dectina-2, constata-se redução significativa na área de granulomas hepáticos, devido à capacidade desse receptor em influenciar na resposta de células T, especialmente Th2 (Kaisar et al., 2018).

Dado o exposto, evidencia-se a importância dos CLRs no curso da doença. Contudo, esse papel pode ser ainda mais relevante quando se considera a conexão desses receptores com via de sinalização induzidas por receptores citosólicos, como será discutido adiante na relação entre o inflamassoma e a esquistossomose.

### **1.3.1.3 A participação do adaptador STING e do Interferon do tipo I (IFN-I) na esquistossomose**

Durante as últimas décadas, se tem ampliado o conhecimento acerca da capacidade do sistema imune inato em reconhecer ácidos nucleicos advindos de microrganismos. Tais estímulos podem ser identificados na forma de Ácidos desoxirribonucleicos (DNAs) e RNAs

de fita dupla ou simples, híbridos de RNA-DNA ou ainda dinucleotídeos cíclicos (Mankan et al., 2014; Tan et al., 2018). Em se tratando especialmente de DNA, em 2013 um novo mecanismo de reconhecimento foi descoberto envolvendo a enzima denominada Guanosina (GMP)-Adenosina (AMP) Cíclico Sintase (cGAS) e a proteína adaptadora definida como Estimulador de Genes de Interferon (STING) (Sun et al., 2013). Durante infecções bacterianas ou por vírus de DNA, parte desse material genético ativa a enzima cGAS que, por sua vez, converte Guanosina Trifosfato (GTP) e Adenosina Trifosfato (ATP) em um produto denominado cGAMP. Esse último é capaz de se associar e promover alteração conformacionais na proteína STING, localizada no retículo endoplasmático. Em seguida, STING é translocado para o complexo de golgi onde induz a ativação de proteínas cinases como TBK1 e I $\kappa$ B. Essas cinases ativam fatores de transcrição como IRF3 e NF $\kappa$ B que, finalmente, induzem a produção de mediadores inflamatórios como TNF, IL-6 e especialmente IFN- $\beta$  (Motwani et al., 2019).

Desde a sua descoberta, a via cGAS-STING foi descrita como envolvida em uma série de contextos fisiológicos, como doenças autoinflamatórias (Liu et al., 2014), cânceres (Foote et al., 2017), infecções virais (Lio et al., 2016) e bacterianas (Wassermann et al., 2015). Contudo, recentemente, nós demonstramos que essa via também tem influência na infecção por *S. mansoni*. Fibroblastos Embrionários de Camundongos (MEFs) transfectados com DNA do parasito respondem induzindo a ativação de STING e a produção de IFN- $\beta$ . *In vivo*, a ausência de cGAS e STING em animais C57BL/6 resulta em resistência à infecção. Esse fenótipo, entre outras razões, está associado ao aumento na produção de INF- $\gamma$  no baço dos camundongos *knockout* para essas moléculas (Souza et al., 2020).

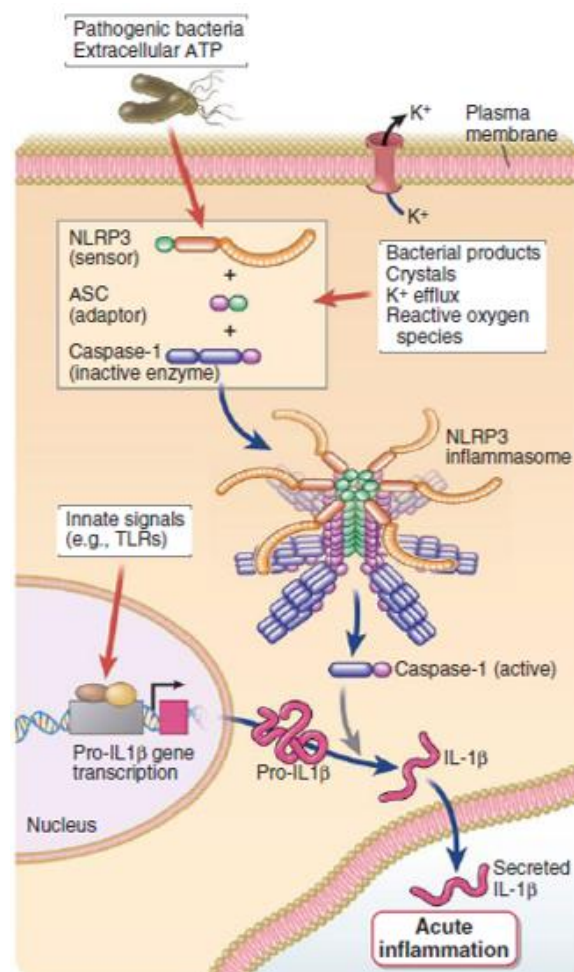
Um dos principais produtos resultantes da ativação de receptores inatos por ácidos nucleicos são os IFN-I. Essa família de citocinas compreende treze subtipos parcialmente homólogos de IFN- $\alpha$  em humanos (quatorze em camundongos), apenas um tipo de IFN- $\beta$  e uma série de outros produtos gênicos pouco estudados. IFN- $\beta$  e todos os subtipos de IFN- $\alpha$  se ligam

e sinalizam através de um receptor heterodimérico constituído das subunidades denominadas IFNAR1 e IFNAR2 (Pestka et al., 2004). O papel dessas citocinas é extensamente descrito em contextos de infecções bacterianas (Rothfuchs et al., 2006) e principalmente virais (Koerner et al., 2007). Entretanto, estudos pontuais demonstram que elas também estão relacionadas a respostas a antígenos do *Schistosoma* (Trottein et al., 2004; Webb et al., 2017). Populações específicas de células dendríticas denominadas FLDCs respondem a antígenos dos ovos de *S. mansoni* produzindo quantidade apreciáveis de IFN- $\alpha$ 3 e IFN- $\beta$ . Tal produção foi também observada mediante a estímulo com ovos mortos, porém, drasticamente reduzida quando frente aos ovos vivos. A investigação de células FLDCs deficientes para a subunidade do receptor de IFNAR1 mostra que a produção e a sinalização por IFN-I, mediante a estímulos com antígenos dos ovos, é também fundamental para essas células migrarem para o linfonodo e induzirem uma diferenciação para o perfil de resposta Th2 (Webb et al., 2017).

#### **1.3.1.4 O relevante papel do inflamassoma nas infecções por *Schistosoma***

A via de sinalização do inflamassoma resulta da ativação de receptores inatos intracelulares, encontrados tanto em células da resposta imune (Awad et al., 2017) como em células não imunes (Feldmeyer et al., 2007). Após a ativação, esses receptores geralmente desencadeiam a formação do complexo inflamassoma (Martinon et al., 2002); uma plataforma que consiste em uma molécula sensora (ou receptor), uma molécula adaptadora e uma efetora. Dentre os principais sensores estão os membros da família de Receptores do tipo NOD (NLR), como NLRP1, NLRP3 e NLRC4, e também receptores como a Proteína Ausente no Melanoma (AIM-2). A proteína ASC atua comumente como adaptadora, levando o sinal recebido pelo sensor/receptor à molécula efetora (protease caspase-1), induzindo sua ativação. Pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 são substratos para caspase-1, bem como a proteína Gasdermina-D (GSDMD). Como consequência da ativação de caspase-1, as formas maduras das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 são

produzidas (Figura 3) e o domínio N-terminal da GSDMD é liberado no citosol (Broz, Dixit, 2016). A porção N-terminal de GSDMD é capaz de formar poros na membrana da célula e, assim, induzir a morte celular em um processo denominado piroptose (Sborgi et al., 2016). De maneira geral, a ativação do inflamassoma requer dois sinais: o primeiro é comumente obtido por meio de TLRs ou por citocinas ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ) que, entre outras consequências, promove a transcrição e a tradução de pró-IL-1 $\beta$ , pró-IL-18 e pró-caspase-1. A segunda etapa consiste em indução do NLR específico e montagem da plataforma do inflamassoma (Broz, Dixit, 2016). A requisição de dois sinais representa um controle fisiológico estratégico, que evita inflamações desnecessárias na ausência de infecção ou de moléculas nocivas (Zamboni, Sacks, 2019).



**Figura 3. Ativação da via do inflamassoma.** Fonte: Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology. 9th ed.

Racionalmente, organismos patogênicos intracelulares são mais propensos a ativar ou modular a via do inflamassoma, como tem sido demonstrado para bactérias (Gulati et al., 2018), fungos (Gringhuis et al., 2012) e protozoários (Carvalho, Zamboni, 2020). No entanto, até o início do na última década, não havia evidências claras que sugerissem que organismos multicelulares, como *Schistosoma*, pudessem ativar tal via, e como essa ativação seria desencadeada. Uma vez que a entrada desses organismos em células hospedeiras é naturalmente inconcebível. No decorrer dos anos que se seguiram, porém, evidências surgiram demonstrando que, de fato, antígenos do *Schistosoma* tinham a capacidade de ativar o inflamassoma e isso poderia acontecer em diferentes contextos celulares. Todas essas evidências foram recentemente reunidas por nosso grupo em um estudo de revisão, que abrange desde a descoberta da participação do inflamassoma na esquistossomose até os achados mais recentes sobre o tema (Sanches et al., 2020) (Anexo).

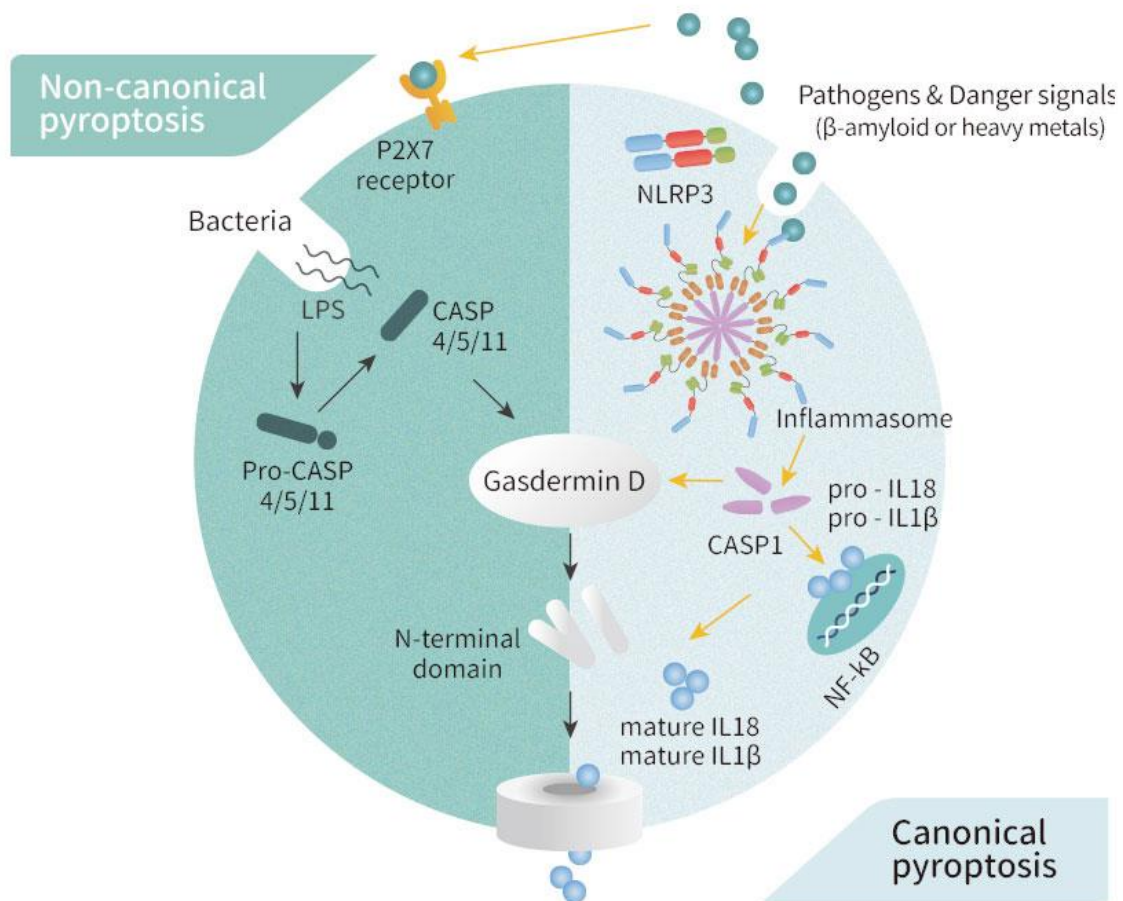
Dentre a grande variedade de antígenos produzidos pelo parasito, aqueles secretados pelos os ovos (SEA) são descritos como os principais ativadores da via do inflamassoma. Em Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea (BMDCs), esses antígenos promovem a ativação de caspase-1 e a produção de IL-1 $\beta$ , de maneira dependente do receptor citosólico NLRP3 (Ritter et al., 2010). Esse receptor possui a característica marcante de responder a uma grande variedade de estímulos e eventos celulares resultantes, ou não, da presença de patógenos como por exemplo a produção de ROS, o efluxo de potássio, a liberação de catepsina B por lisossomos, entre outros (Sutterwala et al., 2014). A interação dos antígenos dos ovos com BMDCs promove aumento na produção de ROS e também o efluxo de potássio, culminando, portanto, na ativação do inflamassoma de NLRP3 (Ritter et al., 2010). De maneira similar, em fibroblastos, como as Células Hepáticas Estreladas (HSCs), o SEA induz a ativação do inflamassoma de NLRP3 porém, nesse contexto os eventos cruciais são a produção de ROS e a liberação de catepsina B (Lu et al., 2017). Ressalta-se ainda que *upstream* a todo esse processo

encontram-se receptores CLRs como Dectina-1 e Dectina-2, com os quais os antígenos dos ovos interagem e sem os quais a ativação do inflamassoma é comprometida (Ferguson et al., 2015; Ritter et al., 2010).

Atualmente, tem-se consolidado o conhecimento acerca do potencial dos antígenos dos ovos do parasito em induzir processos de senescência e de apoptose em células do hospedeiro (Chen et al., 2016; Wang et al., 2014). Entretanto, outros processos como a piroptose são achados recentes no contexto da esquistossomose e, portanto, ainda não compreendidos plenamente. A ativação de caspase-1, conforme definido anteriormente, pode levar a piroptose. Mas a indução não canônica de caspase-11 (ortóloga da caspase-4 em humanos), por LPS situados intracelularmente, também culmina nesse processo (Aglietti et al., 2016). Ambas caspases clivam a gasdermina-D, e o fragmento N-terminal (N-GSDMD) resultante promove a formação de poros na membrana plasmática (Figura 4), apenas quando estes fragmentos se encontram situados no interior da célula (Liu et al., 2016). O resultado compreende hiperpermeabilização, turgidez celular e liberação de conteúdo citoplasmático (Fink, Cookson, 2007; Shi et al., 2014). Estudos indicam que a piroptose induzida por antígenos do *S. mansoni* pode ocorrer em Eosinófilos Derivados da Medula Óssea (BMDE), bem como é detectada em eosinófilos isolados do fígado de camundongos infectados com o parasito (Palacios-Macapagal et al., 2017). Por outro lado, em contextos de indução por antígenos de *S. japonicum*, os relatos demonstram a ocorrência de piroptose em células HSCs (*in vitro*) (Kong et al., 2019) e o aumento da expressão de N-GSDMD no fígado de camundongos acometidos pela doença (Liu et al., 2019).

Os achados relacionando a esquistossomose à via do inflamassoma não são apenas intrigantes pelo ineditismo, mas especialmente pela constatação de que os receptores dessa via desempenham papel importante na patologia desencadeada pela doença. Em infecções por *S. mansoni* o receptor NLRP3 e o adaptador ASC participam da formação do granuloma hepático,

visto a redução da reação inflamatória periovular em animais deficientes para tais moléculas (Ritter et al., 2010). Dados semelhantes são descritos em infecção por *S. japonicum*, porém nesse contexto relata-se ainda a participação direta de NLRP3 na ativação de fibroblastos e, por conseguinte, na deposição de colágeno na estrutura dos granulomas (Lu et al., 2017; Meng et al., 2016). De fato, a via de sinalização do inflamassoma como um todo parece estar ligada ao processo patológico hepático associado à esquistossomose, incluindo receptores nunca antes relacionados a esses eventos, como será apresentado adiante no presente manuscrito.



**Figura 4. Mecanismos moleculares dos processos de indução de piroptose canônica e não-canônica.** Fonte: [www.genetex.com](http://www.genetex.com). Disponível em: [https://www.genetex.com/Research/Overview/cell\\_biology/Pyroptosis\\_Inflammation](https://www.genetex.com/Research/Overview/cell_biology/Pyroptosis_Inflammation). Acesso em: abril, 2021.



### 1.3.2 Aspectos fundamentais da resposta imune adaptativa durante a esquistossomose

Do ponto de vista sistêmico, desde a migração do esquistossômulo até o estabelecimento do casal de vermes adultos nas veias mesentéricas, a resposta imune predominante é do tipo Th1 moderada (Stadecker et al., 2004). As observações em humanos demonstram que, entre outros aspectos, essa resposta é caracterizada pelo aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$ , produzidas majoritariamente por Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs). Tais células quando provenientes de indivíduos em fase aguda liberam, espontaneamente, maiores quantidades de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em relação às advindas de indivíduos em fase crônica (Jesus et al., 2002).

Uma vez que as fêmeas adultas do parasito iniciam a deposição de ovos, entre 5-6 semanas pós-infecção, o perfil sistêmico da resposta imune se altera. Isso porque os antígenos secretados ativamente pelos ovos, nos tecidos em que estes se encontram retidos, são capazes de modular negativamente o perfil Th1 predominante. O novo ambiente resultante é caracterizado pelo aumento expressivo das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Pearce et al., 1991; Wynn et al., 1993). Esse novo perfil, Th2, apresenta um pico aproximadamente na oitava semana pós-infecção, depois da qual essa resposta sofre uma modulação (Montenegro et al., 1999).

A transição entre as respostas Th1 e Th2 na esquistossomose mansônica é um evento fundamental para sobrevivência do parasito e do hospedeiro, e reflete claramente uma relação coevolutiva. A regulação negativa da resposta Th1 se deve ao aumento significativo de IL-10 que atua modulando os níveis de IFN- $\gamma$  (Sadler et al., 2003). Quando animais deficientes para IL-4 e IL-10 foram infectados, a importância dessa modulação ficou evidente, uma vez que a polarização Th1 resultante culminou em elevada hepatotoxicidade e morte dos animais (Hoffmann et al., 2000). Além disso, o pico de produção de IL-4, decorrente da transição entre

as respostas, é fundamental para que os ovos do parasito atinjam a luz do intestino e sejam excretados (Fallon et al., 2000).

A modulação da resposta Th2, que ocorre após a oitava semana de infecção, é também decorrente da ação de IL-10 (Montenegro et al., 1999). Esse evento é tão importante quanto à modulação de Th1. O estudo de Hoffman e colaboradores (2000), mencionado anteriormente, também demonstrou que a infecção de animais duplo-*knockout* para IL-10 e IL-12 resulta em uma polarização Th2 com consequências letais para o hospedeiro, caracterizada por aumento expressivo no tamanho dos granulomas hepáticos e ocorrência de fibrose (Hoffmann et al., 2000).

A modulação de ambos perfis de resposta (Th1 e Th2), ocorre em grande parte por meio da ação Tregs (Baumgart et al., 2006). Tais células podem ser categorizadas em Tregs naturais (nTregs) e Tregs induzíveis (iTregs), a depender da expressão de marcadores específicos e da sua origem (Jonuleit, Schmitt, 2003). A expressão de ambos perfis de células Tregs se elevam durante o curso da esquistossomose, com os antígenos dos ovos sendo considerados os mais potentes indutores desses tipos celulares (Hesse et al., 2004; McKee, Pearce, 2004; Singh et al., 2005; Taylor et al., 2006). Não surpreendentemente, camundongos deficientes para a recombinase Rag-1 ao receberem células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> desenvolvem maior dano hepático e mortalidade, associados à infecção pelo *Schistosoma* (Hesse et al., 2004). Parte dos mecanismos empregados pelas Tregs para regular processos associados à doença passam pelo controle da proliferação de células T CD4<sup>+</sup> (McKee, Pearce, 2004).

### **1.3.3 O granuloma hepático**

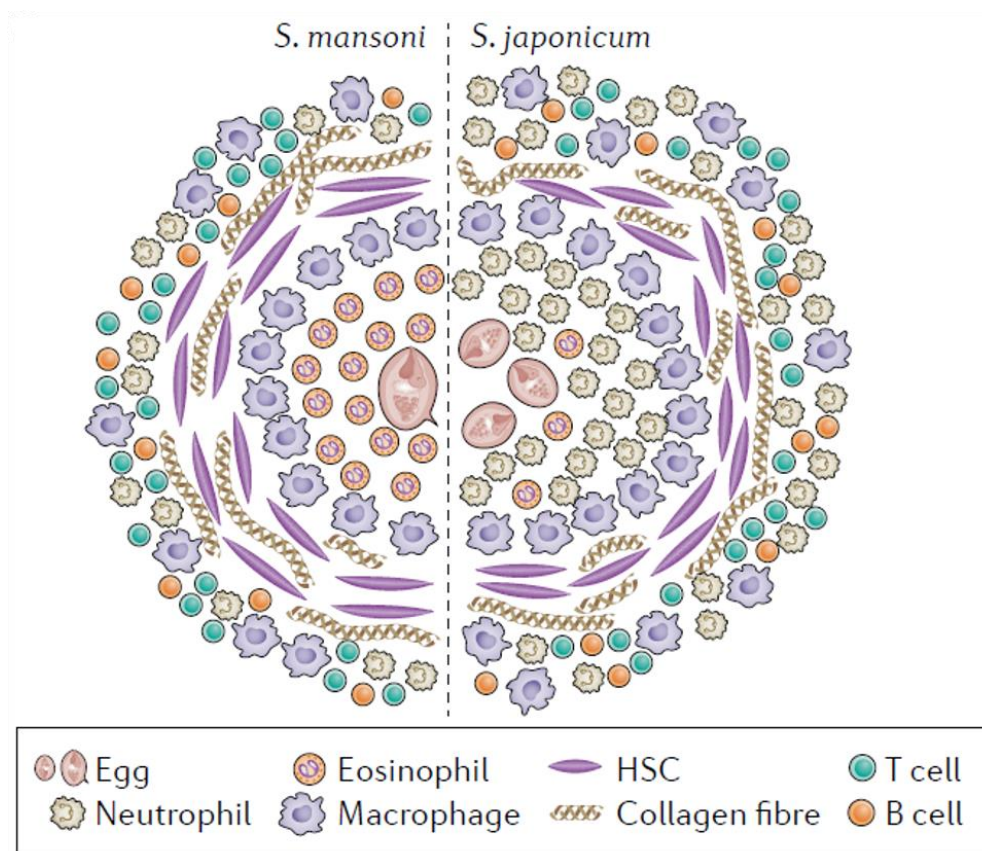
A patologia da esquistossomose, como mencionado anteriormente, decorre do aprisionamento de ovos do parasito em órgãos como intestino e fígado. Quando maduros, os ovos secretam ativamente e continuamente antígenos, em sua maioria glicoconjugados, que

promovem a migração de células imunes para os sítios da infecção e resulta na formação de granulomas periovulares (Cheever, Andrade, 1967). A principal função dos granulomas, durante a esquistossomose, é evitar que os antígenos dos ovos exerçam sua atividade citotóxica, principalmente sobre os hepatócitos (Abdulla et al., 2011). Entretanto, recentemente demonstrou-se que a formação de granulomas no intestino é, também, condição *sine qua non* para que os ovos sejam liberados nas fezes (Takaki et al., 2021). Por outro lado, a deposição de colágeno, característica do processo, pode promover a fibrose e contribuir para o aumento do volume do granuloma, eventualmente obstruindo o fluxo sanguíneo e gerando graves consequências ao hospedeiro (Bloch et al., 1972).

A formação do granuloma hepático é fundamentalmente mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos para antígenos do ovo, visto que a gênese dessa estrutura é comprometida em animais atímicos, animais deficientes para o Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II (MHC classe II<sup>-/-</sup>), para o Receptor de Células T (TCRαβ<sup>-/-</sup>) e para a Recombinase-1 (Rag-1<sup>-/-</sup>) (Hernandez et al., 1997; Iacomini et al., 1995; Phillips et al., 1977). A relevância de cada subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th17 e Th2) no processo varia de acordo com o *background* genético do hospedeiro e do parasito. Camundongos CBA, infectados com *S. mansoni*, apresentam patologia mais severa, com granulomas maiores e menos circunscritos, nos quais a participação de Th1/Th17 é mais decisiva para o fenótipo (Rutitzky, Stadecker, 2011). Ao passo que animais C57BL/6, infectados com *S. mansoni*, apresentam patologia moderada, com granulomas relativamente menores e bem definidos, no quais as respostas Th1/Th2 demonstram ser mais relevantes (Cheever et al., 1987; Fanning et al., 1981). Por outro lado, em animais C57BL/6 infectados com *S. japonicum*, a resposta Th17 tem papel fundamental na formação do granuloma (Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Diante da ação citotóxica dos antígenos dos ovos, as células residentes do fígado (HSC; hepatócitos; células de kupffer e células epiteliais sinusóides) secretam quimiocinas capazes

promover a infiltração de leucócitos (Chuah et al., 2014). Esses últimos, juntamente com células residentes do tecido, compõe a estrutura granulomatosa. A constituição básica dos granulomas é dada por macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas, circundadas por linfócitos. No entanto, granulomas esquistossomóticos possuem também outras populações leucocitárias, como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas (Figura 5) (Giorgio et al., 2020).



**Figura 5. Granulomas hepáticos característicos de infecções por *S. mansoni* e *S. japonicum* e suas constituições celulares.** Fonte: (McManus et al., 2018).

Os neutrófilos estão primordialmente associados à constituição de granulomas induzidos por *S. japonicum*, embora participem também da constituição de granulomas de *S. mansoni* (Li Hsü et al., 1972). Essas células são em geral recrutadas por quimiocinas pró-inflamatórias como CXCL1 e CXCL2 (Fu et al., 2012; Seki et al., 2012). Em infecções por *S.*

*japonicum*, os neutrófilos aparentam ter papel dual na patologia hepática, onde no centro dos granulomas produzem citocinas pró-inflamatórias e causam danos teciduais, ao passo que na periferia dos granulomas essas células secretam proteínas que degradam colágeno (Chuah et al., 2013). Os eosinófilos, por sua vez, são usualmente encontrados em granulomas induzidos por *S. mansoni* (Moore et al., 1977). Relata-se que células necróticas hepáticas possuem especificidade para o recrutamento de eosinófilos, o que não se observa para esplenócitos necróticos, por exemplo (Palacios-Macapagal et al., 2017). Os eosinófilos são capazes de produzir citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 no contexto hepático da infecção por *S. mansoni*, o que contribui para o ambiente de citocinas Th2 e influencia de forma direta e indireta na deposição de colágeno e fibrose (Rumbley et al., 1999).

As HSCs representam as células residentes do tecido que constituem também os granulomas esquistossomóticos, são a fonte primordial de colágeno e Componentes da Matrix Extracelular (ECM), quando transdiferenciadas. Estas células respondem tanto a estímulos do parasito (antígenos glicoconjugados) (Anthony et al., 2013) como do hospedeiro (IL-13) (Liu et al., 2011). Além disso, interagem indiretamente com macrófagos alternativamente ativados, utilizando prolina secretado por essas células para a síntese de colágeno (Hesse et al., 2001).

Os macrófagos exibem extrema versatilidade funcional dentro do contexto granulomatoso. Desempenham papéis inflamatórios clássicos no início da formação do granuloma, agem na deposição de colágeno e fibrose, quando alternativamente ativados e, ainda, tem papéis moduladores da resposta Th2 e da fibrose (Chuah et al., 2014). Essa função moduladora associada aos macrófagos ocorre por meio da produção de Metaloproteinase 9 (MMP9), capaz de induzir apoptose em HSC (Zhou et al., 2004) e da expressão do Receptor IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), que inibe a sinalização promovida por IL-13 (Mentink-Kane et al., 2004).

Juntamente com a gênese da estrutura granulomatosa ocorre a transição de resposta imune sistêmica, como citado na seção anterior, contexto no qual as células dendríticas

desempenham papel chave. DCs pulsadas com antígenos dos ovos induzem o desenvolvimento de resposta Th2, quando injetadas em camundongos, comportamento que depende essencialmente da capacidade do animal receptor em produzir IL-4 (MacDonald, Pearce, 2002).

Dado todo o exposto até aqui, se faz evidente a importância da resposta granulomatosa hepática no curso da esquistossomose mansônica, bem como se evidencia a relevância de certas vias de sinalização celular nesse contexto. Como já discutido, dentre essas vias está a via do inflamassoma que, através do sensor NLRP3, influencia a formação do granuloma e a deposição de colágeno nessa estrutura. Porém, a capacidade de desempenhar papel em doenças hepáticas não é exclusividade deste receptor. Estudos recentes apresentam fortes evidências da participação do sensor NLRP6 em contextos dessa natureza. Logo, nosso estudo buscou compreender a possível participação de NLRP6 na patologia hepática associada a esquistossomose.

## 2. JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada, de caráter crônico. O agente causador pode viver dentro do hospedeiro definitivo por décadas e desencadear processos patológicos devido à presença de ovos do parasito em órgãos como intestino e fígado (Wilson et al., 2007). Tais processos patológicos se resumem a respostas inflamatórias periovulares, denominadas granulomas. Os granulomas hepáticos, em especial, são estruturas que se modificam em tamanho e composição com o passar do tempo e podem culminar em indução de fibrose tecidual (Hams et al., 2013; Silva et al., 2000). Dessa maneira, os granulomas estão intimamente relacionados à morbidade e mortalidade associadas à doença.

Para obter sucesso e sobreviver durante anos no interior do hospedeiro definitivo, o *Schistosoma* desenvolveu, como outros helmintos, a capacidade de regulação do sistema imune (Zakeri et al., 2018). Diversas classes de receptores imunes, sobretudo inatos, são descritas como alvo de antígenos do parasito. Os receptores NLRs, entretanto, têm se mostrado relevantes no contexto da esquistossomose, devido ao papel que desempenham na formação do granuloma hepático, sobretudo o receptor NLRP3 (Lu et al., 2017; Ritter et al., 2010).

A família de receptores NLR é composta por mais de vinte membros, que apresentam uma ampla diversidade funcional e inúmeras formas de ativação (Broz, Dixit, 2016). Além do NLRP3, tido como o componente mais bem estudado dessa família, o receptor NLRP6 tem ganhado notoriedade devido às distintas funções que executa (Levy et al., 2017). Dentre elas, destacam-se nos últimos anos, a participação em processos fibróticos hepáticos relatados em humanos e camundongos, bem como a participação na ativação e proliferação de fibroblastos (Mehta et al., 2014; Zhu et al., 2018).

Dessa forma, considerando a natureza fibrótica da patologia associada a esquistossomose e as funções recentemente descobertas, e supracitadas, para o receptor NLRP6, se faz necessário investigar a participação que tal receptor tem no contexto em questão.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos geral

Avaliar o papel do sensor NLRP6 na patologia hepática associada à infecção pelo parasito *Schistosoma mansoni* em modelo murino.

#### 3.2 Objetivos específicos

i. Verificar se a produção de IL-1 $\beta$  e ativação de caspase-1 em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs), estimuladas com antígenos do parasito, é influenciada por NLRP6;

ii. Avaliar se o sensor NLRP6 modula parâmetros patológicos hepáticos e a carga parasitária em camundongos;

iii. Estimar a frequência de populações de células não parenquimais hepáticas, bem como os níveis de quimiocinas no fígado de camundongos C57BL/6 e *Nlrp6*<sup>-/-</sup> após a infecção;

iv. Medir os níveis de citocinas produzidas por esplenócitos de camundongos C57BL/6 e *Nlrp6*<sup>-/-</sup> reestimulados com antígenos do parasito;

v. Avaliar se a via do inflamassoma, através das moléculas NLRP3, Caspase-1, GSDMD e IL-1R, influencia nos parâmetros patológicos e carga parasitária em camundongos deficientes infectados.



## 4. MÉTODOS

### 4.1 Animais e parasitos

O estudo foi conduzido utilizando-se camundongos de seis a dez semanas de idade. Os Animais Selvagens (WT) foram obtidos do Biotério Central, localizado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos deficientes (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Nlrp6*<sup>-/-</sup>, *Casp-1*<sup>-/-</sup>, *IL-1R*<sup>-/-</sup> e *Gsdmd*<sup>-/-</sup>) foram, por sua vez, provenientes do biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LIDI). Durante a realização dos ensaios experimentais os animais foram acondicionados em microisoladores forrados com maravalha e todos os procedimentos realizados no biotério do LIDI. A alimentação dos camundongos consistiu em uma dieta à base de água e ração estéreis e a acomodação feita em condições adequadas de higiene e temperatura. A execução dos experimentos foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo de permissão: 367/2017.

Para infecção dos camundongos foram utilizadas cercárias da cepa LE, do parasito *Schistosoma mansoni*. Tais organismos foram adquiridos da Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ – Belo horizonte). Antes da infecção, a viabilidade e o número de cercárias foram verificados com auxílio de um microscópio com lupa estereoscópica.

### 4.2 Preparo de antígenos (Ovos, SEA e SWAP)

Os ovos foram obtidos a partir do fígado de camundongos Swiss infectados por 50 dias, tais animais foram provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO), UFMG. Resumidamente, o fígado foi processado em liquidificador em solução salina fria (2% NaCl) por 2 min. Em seguida, o material foi decantado em cálice de vidro por 35 min, em baixa temperatura. Parte do sobrenadante da decantação foi descartado e o restante foi lavado com solução salina fria (2% NaCl). A lavagem por decantação foi repetida até a obtenção de uma solução translúcida e os ovos foram recuperados por filtração. Para a preparação de Antígenos Solúveis dos Ovos

(SEA), os mesmos foram processados (em macerador de tecido) por 40 min a baixa temperatura, empregando Tampão Salina-Fosfato (PBS – pH 7,2). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 100.000 x g por 1 h a 4 °C. O sobrenadante resultante foi congelado a -80 °C. Os Antígenos Solúveis de Verme Adulto (SWAP) foram obtidos por maceração mecânica de vermes em PBS (pH 7,2) frio. Após a centrifugação (13.000 x g - 7 min), o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C. A concentração proteica de SEA e SWAP foi determinada utilizando-se kit de dosagem BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

### **4.3 Diferenciação e estímulo de BMDCs**

Para obtenção de Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea (BMDCs), células da medula foram cultivadas em meio RPMI contendo Soro Fetal Bovino (FBS - 10%), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e GM-CSF murino recombinante (20 ng/mL) (Peprotech, Ribeirão Preto, Brasil). Placas de Petri contendo  $1 \times 10^7$  células foram incubadas a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. No terceiro dia de incubação, foram adicionados 5 mL de meio completo com GM-CSF. Posteriormente, no quinto e no sétimo dia, 5 mL de meio foram substituídos por igual volume de meio suplementado contendo GM-CSF. No décimo dia, as células não aderentes foram obtidas e transferidas para placas de 24 poços ( $5 \times 10^5$  células/poço). Inicialmente, as BMDCs foram incubadas com 1 µg/ml de Pam<sub>3</sub>Cys (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) por 5 h e, então estimuladas com 50 µg/mL de SEA por 17 e 24 h. Como controle positivo de ativação do inflamassoma, as células foram incubadas com 1 µg/ml de Pam<sub>3</sub>Cys (5 h) ou 1 µg/ml de LPS (4 h) e estimuladas com ATP (5 mM - 50 min) ou nigericina (20 mM - 50 min). Os sobrenadantes de cultura foram coletados e as células foram lisadas com reagente de extração de proteína de mamífero M-PER (Thermo Fisher Scientific), suplementado com mistura de inibidores de protease 1:100 (Sigma-Aldrich).

#### 4.4 Western Blotting

Os lisados celulares e sobrenadantes da cultura BMDCs foram submetidos a análise por SDS-PAGE e Western blotting. As proteínas foram resolvidas em um gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). As membranas foram bloqueadas por 1 h em TBS *Tween* (0,1% Tween-20, 5% leite em pó desnatado) e incubadas com anticorpos primários a 4 °C, por 18 horas. Foi utilizado anticorpo primário monoclonal, de camundongos, contra a subunidade p20 da caspase-1 (Adipogen, San Diego, CA, Estados Unidos). Anticorpo monoclonal contra  $\beta$ -actina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Estados Unidos) foi usado como controle de expressão (1: 1.000). As membranas foram lavadas por três vezes com TBS *Tween* 20 (0,1%), com duração de 10 minutos cada lavagem. Em seguida, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase HRP (1:1.000). Por fim, as membranas foram lavadas novamente TBS *Tween* 20 (0,1%) e as bandas foram visualizadas, em fotodocumentador, através do uso do substrato Luminol (Millipore).

#### 4.5 Cultura de esplenócitos

Os esplenócitos foram obtidos a partir da maceração dos baços de camundongos C57BL/6 e *Nlrp6*<sup>-/-</sup> infectados por seis semanas. Redes de metal estéreis foram utilizadas para auxiliar a maceração dos órgãos. As células foram lavadas com salina (0,9% NaCl), centrifugadas a 270 x g por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante descartado. Os eritrócitos foram lisados com uma solução hemolítica (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, pH 7,2) por 5 min e, posteriormente, o processo interrompido pela adição de salina (0,9% NaCl). As células foram então filtradas, centrifugadas novamente a 270 x g por 10 min a 4°C e ressuspendidas em meio RPMI (10% soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina e 100  $\mu$ g/mL estreptomicina). Um total de 1x10<sup>6</sup> células foram cultivadas por poço, em placas de 96 poços, e estimuladas com SWAP (200  $\mu$ g/mL), SEA (20  $\mu$ g/mL), Ovos (50 /poço), concanavalina A (ConA) (5  $\mu$ g/mL) ou meio

RPMI. Os sobrenadantes da cultura foram coletados após 24 h para dosar IL-5 e após 72 h para dosar IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-13, as dosagens foram feitas por ELISA.

#### 4.6 Processamento hepático

O lobo direito do fígado de animais C57BL/6 e *Nlrp6*<sup>-/-</sup>, infectados por seis semanas, foi coletado e 1 mL de solução de extração de citocina (0,4 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,5% BSA, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e aprotinina 20 KI) foi adicionado a cada 100 mg de tecido. O homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax) foi usado para processar os órgãos em solução. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4 °C.

Para análise de citometria de fluxo, o lobo esquerdo dos camundongos foi utilizado. Para tanto o tecido foi removido sem perfusão, cortado em pequenos pedaços com auxílio de bisturi, incubado (40 min) em meio RPMI [contendo 30  $\mu$ g/ml de Liberase TM (Roche) e 20 U/ml de DNase I (GE)]; e, por fim, filtrado por um poro de 70  $\mu$ m. Após centrifugação (270 x g, 10 min, 4°C), as células foram ressuspensas em PBS contendo 2% de FBS e 5 mM EDTA. Centrifugações de baixa velocidade (50 x g - 5 min) foram usadas para remover células parenquimatosas. Os eritrócitos foram lisados com uma solução hemolítica (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, pH 7.2). Após centrifugação (270 x g, 10 min, 4°C), as células não parenquimatosas restantes foram ressuspensas em meio de cultura RPMI.

#### 4.7 Citocinas e quimiocinas

As análises de citocinas/quimiocinas (IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, CXCL1/KC, CCL3 e CCL11) foram realizadas utilizando kits de ELISA Duoset (R&D Diagnostic, Minnesota, EUA). Para essa finalidade, foram seguidas as instruções fornecidas pelo fabricante.

#### 4.8 Ensaio de atividade MPO e EPO

Os ensaios de atividade das enzimas Peroxidase Eosinofílica (EPO) e Mieloperoxidase (MPO) foram realizados conforme descrito por Cançado e colaboradores, 2011 (Canaçado et al., 2011). O lobo direito do fígado foi processado, os eritrócitos foram submetidos à lise hipotônico e as células hepáticas restantes submetidas à lise com detergente e ciclos de congelamento/descongelamento. O ensaio enzimático foi realizado usando os substratos adequados e o resultado foi medido em um leitor de microplaca no comprimento de onda apropriado (492 nm para EPO e 450 nm para MPO). O resultado foi expresso em unidades de absorbância.

#### 4.9 Citometria de fluxo

Esplenócitos e células hepáticas não parenquimatosas foram marcadas utilizando anticorpos anti-CD11b, CD11c, Ly6G, F4/80, CD3 e CD4. Resumidamente, em placas de 96 poços, as células foram incubadas por 20 min com anticorpo anti-CD16/32 (BD Biosciences) em tampão FACS (PBS, 1% FBS, 1 mM NaN<sub>3</sub>) para bloqueio dos receptores Fc. Em seguida, foi adicionado PBS (0,5% BSA) e as placas submetidas a centrifugação a 204 x g por 7 min, 4°C. Após descartar o sobrenadante e homogeneizar o *pellet*, foram adicionados, e incubados por 20 min ao abrigo da luz, os anticorpos para marcadores de superfície [anti-CD11b-APC-Cy7 (1:200, M1/70; BD Biosciences), anti-CD11c-FITC (1:100, HL3; BD Biosciences), anti-Ly6G-PE (1:200, 1A8; BD Biosciences), anti-F4/80 biotilado (1:200, BM8; BD Biosciences), anti-CD3-PE-Cy7 (1:100, BD Biosciences) e anti-CD4-APC (1:200, BD Biosciences)]. Controles de isotipo também foram empregados. Em seguida, as células foram lavadas, centrifugadas novamente (204 x g, 7 min, 4°C) e incubadas por 20 min a 4°C, ao abrigo da luz, com estreptavidina conjugada com PerCP-Cy5.5 (1:200 BD Biosciences). Por último, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS. Empregou-se o citômetro de fluxo Attune (Applied

Biosystems, Waltham, MA, Estados Unidos) para coleta dos eventos, e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, Estados Unidos).

A fim de avaliar a polarização dos macrófagos, células hepáticas não parenquimatosos foram marcadas como descrito acima, utilizando anticorpos anti-CD11b-APC-Cy7 (1:200, M1/70; BD Biosciences), anti-F4/80 biotilado (1:200, BM8; BD Biociências), anti-CD197-BB700 (1:200, 4B12 BD Biosciences), anti-CD80-FITC (1:200, 16-10A1, BD Biosciences), anti-CD163-PE (1:200, TNKUPJ, eBioscience) e anti-CD206-APC (1:200, MR5D3, BD Biosciences).

#### 4.10 PCR em tempo real

O lobo médio do fígado de animais C57BL/6 e *Nlrp6*<sup>-/-</sup>, infectados por seis semanas, foi utilizado para extração de RNA. O tecido foi homogeneizado em TRIzol (Invitrogen) e o RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa do RNA total foi realizada e o PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) foi conduzido em um volume final de 20 µL contendo: SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), oligo-dT cDNA como *template* da PCR e 2,5 mM de primers. A reação de PCR foi realizada no equipamento QuantStudio3 (Applied Biosystems). Os primers utilizados para amplificar fragmento específico (100-120 bp) dos genes alvo foram: 18S *Forward* (50-CGTTCCACCAACTAAGAACG-30) e 18S *Reverse* (50-CTCAACACGG GAAACCTCAC-30);  $\alpha$ -SMA *Forward* (50-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-30) e  $\alpha$ -SMA *Reverse* (50-TCGGATACTTCAGCGTCAG-30); IL-13 *Forward* (50-CCTGGCTCTTGCTTGCC- 30) e IL-13 *Reverse* (50-GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA- 30). Todos os dados foram apresentados como unidades de expressão relativa após a normalização para o gene 18S.

#### 4.11 Infecção e carga parasitária

Camundongos selvagem e deficientes, de seis a oito semanas de idade, foram anestesiados com solução salina (NaCl 0,9%) contendo cetamina (5%) e xilazina (2%) e, então, infectados com 100 cercárias através da exposição percutânea da pele abdominal por 1 h. Após seis semanas de infecção, animais foram sacrificados e perfundidos (solução salina 0,9%, citrato de sódio 1,5%) a partir da veia porta, os vermes recuperados foram contados e avaliado o número médio por grupo de camundongos.

#### 4.12 Parâmetros patológicos

O número de ovos do parasito foi avaliado no lobo médio do fígado dos animais. O tecido foi pesado e digerido em uma solução aquosa de KOH (5%) por 16 h a 37 °C. Posteriormente, os ovos foram lavados em solução salina (0,9%) e centrifugados por duas vezes a 270 x g por 10 min. Por fim, a amostra foi ressuspensa em PBS contendo 10% de formaldeído e os ovos contados usando um microscópio óptico. O número de ovos calculados foi corrigido considerando a massa do tecido, resultando em número de ovos por grama de fígado.

O lobo esquerdo, por sua vez, foi fixado em PBS contendo 10% de formaldeído. A partir deles foram feitos cortes histológicos de 6  $\mu\text{m}$  que, em seguida, foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) ou azul de masson. Para medir o tamanho do granuloma e a deposição de colágeno, uma câmera JVC TK-1270/RBG, anexada ao microscópio (lente objetiva 10x), foi usado para obter as imagens. As análises foram realizadas usando o software ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos). O tamanho do granuloma foi medido em  $\mu\text{m}^2$  para todos os granulomas encontrados nos cortes do fígado.

#### 4.13 Análises estatísticas

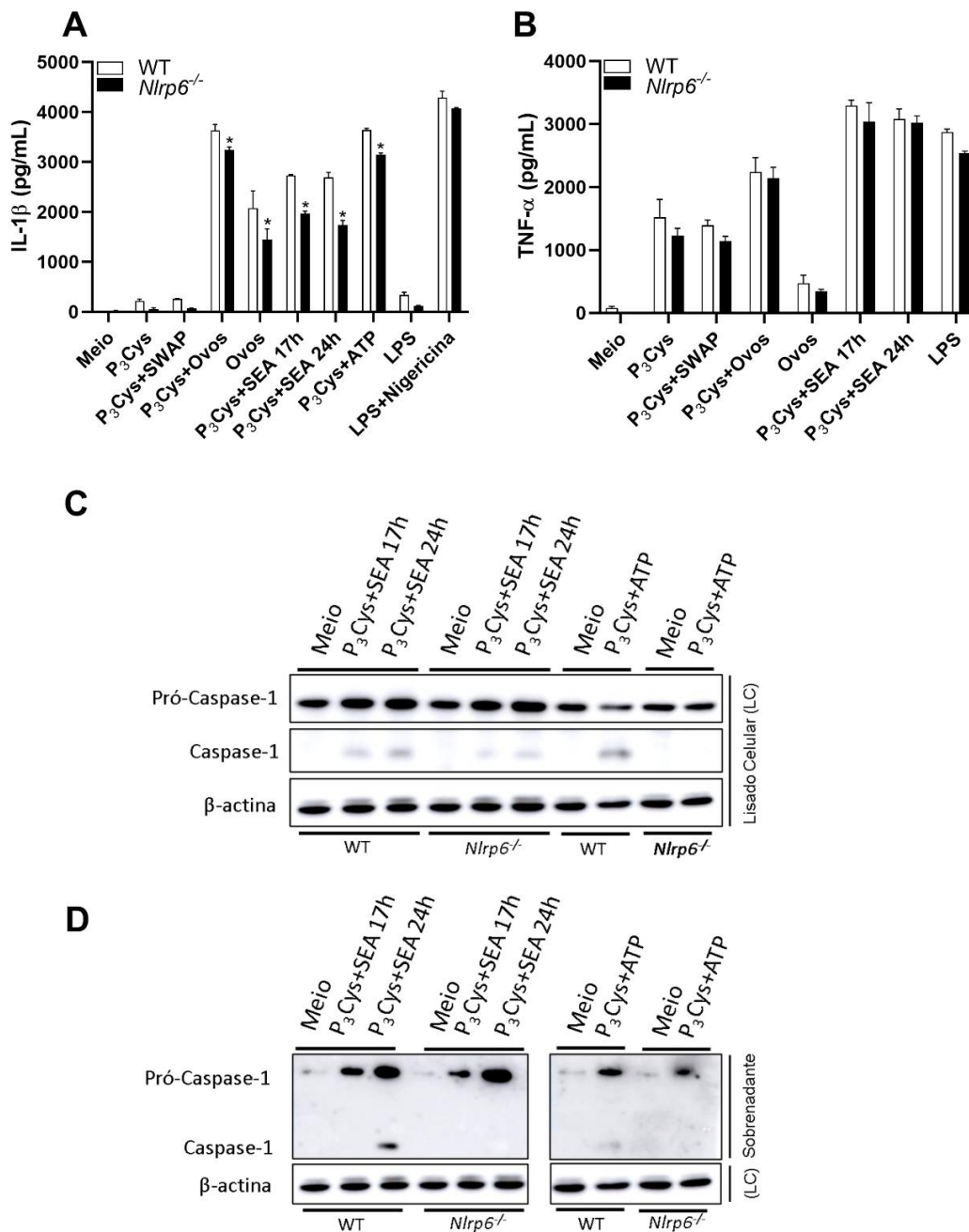
Os testes estatísticos empregados compreenderam o teste *t* de *student*, o *one-way* e o *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni para comparação entre grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, Estados Unidos).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 A produção de IL-1 $\beta$ e a ativação de caspase-1 em células dendríticas estimuladas com Ovos/SEA são parcialmente dependentes de NLRP6

Durante a infecção por *S. mansoni* as células dendríticas desempenham um papel crucial, principalmente na resposta à antígenos dos ovos do parasito. Tais células participam, por exemplo, da alteração do perfil de resposta imune sistêmico (Th1 para Th2) que ocorre após a ovoposição. Ademais, o primeiro relato da ativação do inflamassoma por antígenos de *S. mansoni* se deu em Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea (BMDCs). Dessa forma, nós decidimos iniciar nossa investigação avaliando o comportamento de BMDCs frente ao estímulo com diferentes antígenos do parasito, especialmente no que concerne à produção de IL-1 $\beta$  e ativação de caspase-1. Considerando a necessidade de um estímulo prévio para ativação da via do inflamassoma, as células foram inicialmente estimuladas com agonista de TLR2 (Pam<sub>3</sub>Cys). A Figura 6A demonstra que os ovos do parasito e seus antígenos solúveis (SEA) possuem notável capacidade em induzir a produção de IL-1 $\beta$  e que tal produção é parcialmente dependente do receptor NLRP6. Nota-se ainda que, os ovos induzem produção expressiva de IL-1 $\beta$  sem a necessidade de pré-estímulo com Pam<sub>3</sub>Cys. Em contra partida, o SWAP apresentou-se como um conjunto de antígenos com baixo potencial em induzir a ativação do inflamassoma. A produção de TNF- $\alpha$ , por sua vez, não se alterou quando se comparam os dois grupos celulares, WT e *knockout* (Figura 6B).



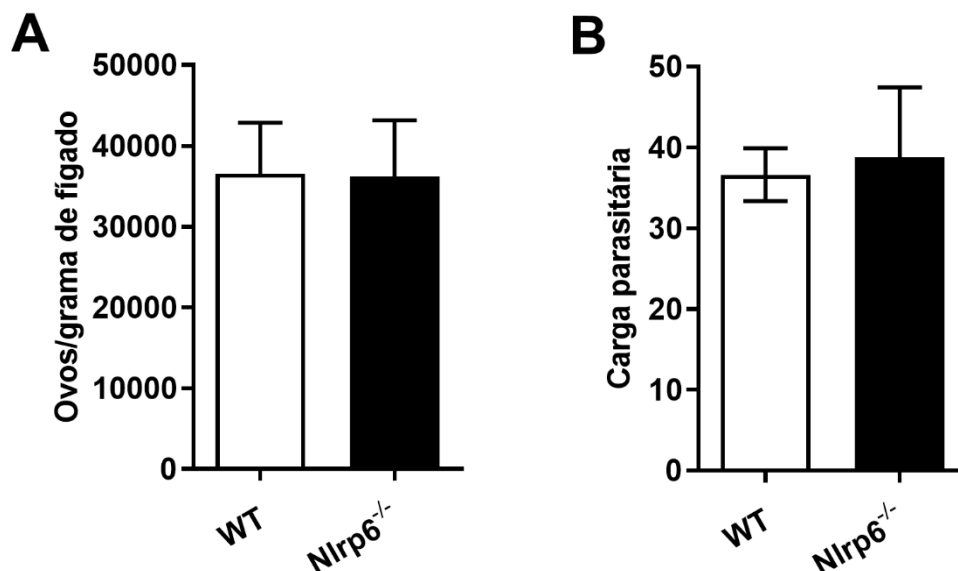


**Figura 6. NLRP6 regula a produção de IL-1 $\beta$  e a ativação de caspase-1 induzida por SEA.** BMDCs (WT ou *Nlrp6*<sup>-/-</sup>) foram pré-tratadas Pam<sub>3</sub>Cys (1  $\mu$ g/mL – 5 h) e estimuladas com SEA (50  $\mu$ g/mL – 17 h, 24 h), ovos (100 ovos/poço – 24 h), SWAP (200  $\mu$ g/mL – 24 h) ou ATP (5 mM – 50 min). Para o controle com nigericina (20  $\mu$ M), as células foram pré-tratadas com LPS (1  $\mu$ g/mL – 4 h) e estimuladas por 50 min. (A) IL-1 $\beta$  e (B) TNF- $\alpha$  foram dosados por ELISA. A ativação de caspase-1 foi avaliada por western blot no lisado celular (C) e no sobrenadante (D,) usando anticorpo contra a subunidade p20. Asterisco denota diferença significativa entre *Nlrp6*<sup>-/-</sup> e WT ( $p < 0,05$ ).

Uma vez o SEA demonstrando ser suficiente para induzir a produção de IL-1 $\beta$ , nós empregamos este estímulo par avaliar o papel de NLRP6 na ativação de caspase-1. A Figura 6C e D evidenciam que o SEA induz ativação de caspase-1 em células dendríticas WT e que tal processo foi claramente inibido em células dendríticas provenientes do animal *Nlrp6*<sup>-/-</sup>.

## 5.2 O NLRP6 influencia a formação do granuloma e a deposição de colágeno no fígado

Considerando que o fígado é o principal órgão onde ovos do parasito ficam alojados e uma vez observada a participação do NLRP6 frente, sobretudo, ao estímulo com ovos e seus antígenos, nós nos perguntamos se esse receptor poderia desempenhar papel na patologia hepática associada à doença. Foi observado, inicialmente, que o número de ovos por grama de tecido não variou entre os grupos de animais WT e *knockout* (Figura 7A). De forma coerente, quando se observa a quantidade de vermes recuperados após infecção por 6 semanas, os números são similares comparando-se ambos grupos experimentais (Figura 7B).

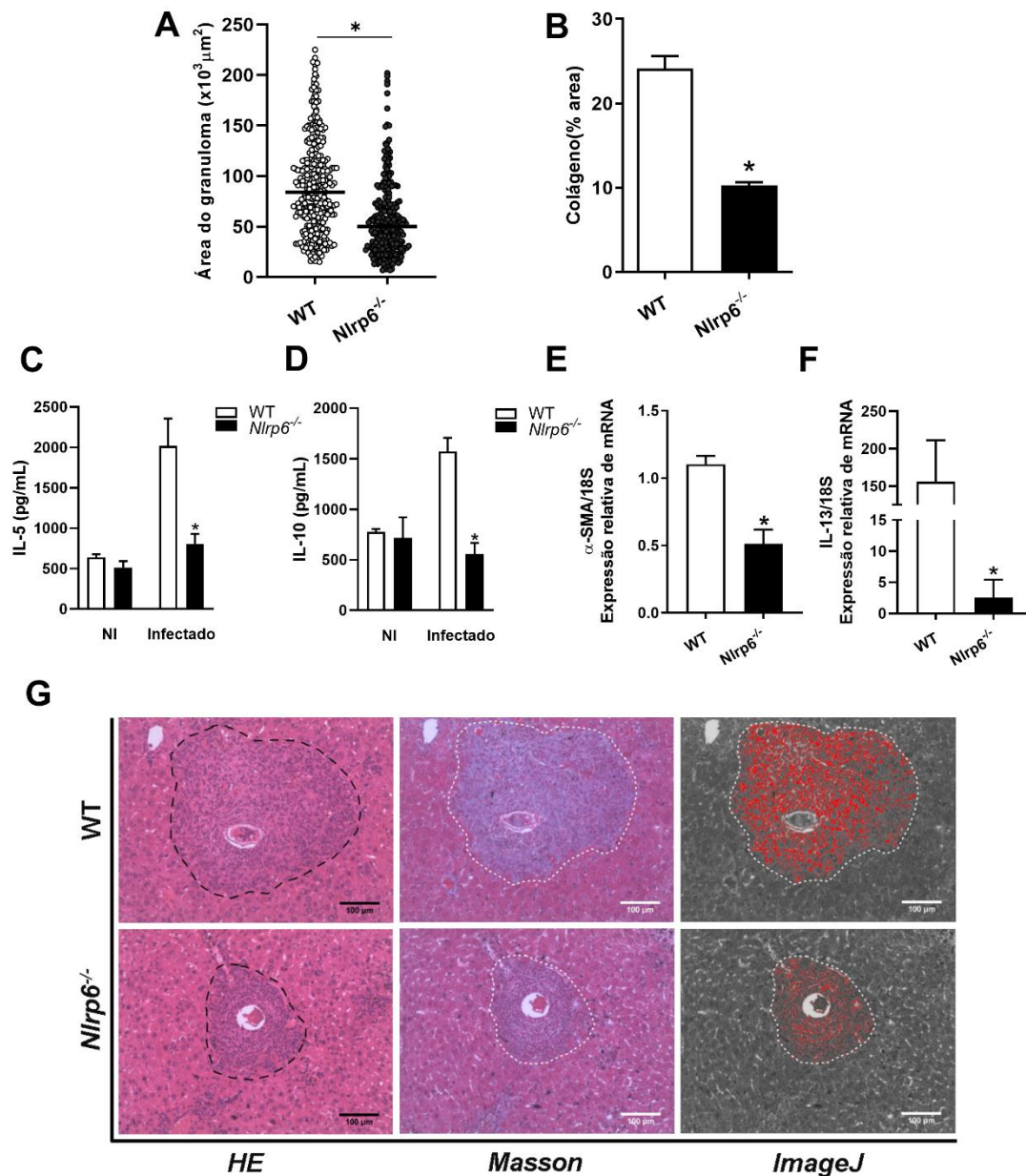


**Figura 7. NLRP6 não influencia o número de ovos no fígado e a carga parasitária.** Após seis semanas de infecção (100 cercárias), os fígados dos animais foram coletados e processados para contagem de ovos e cálculo da (A) relação do número de ovos por grama de fígado. O sistema porta-hepáticos desses animais foi lavado para obtenção dos vermes e avaliação da (B) carga parasitária.

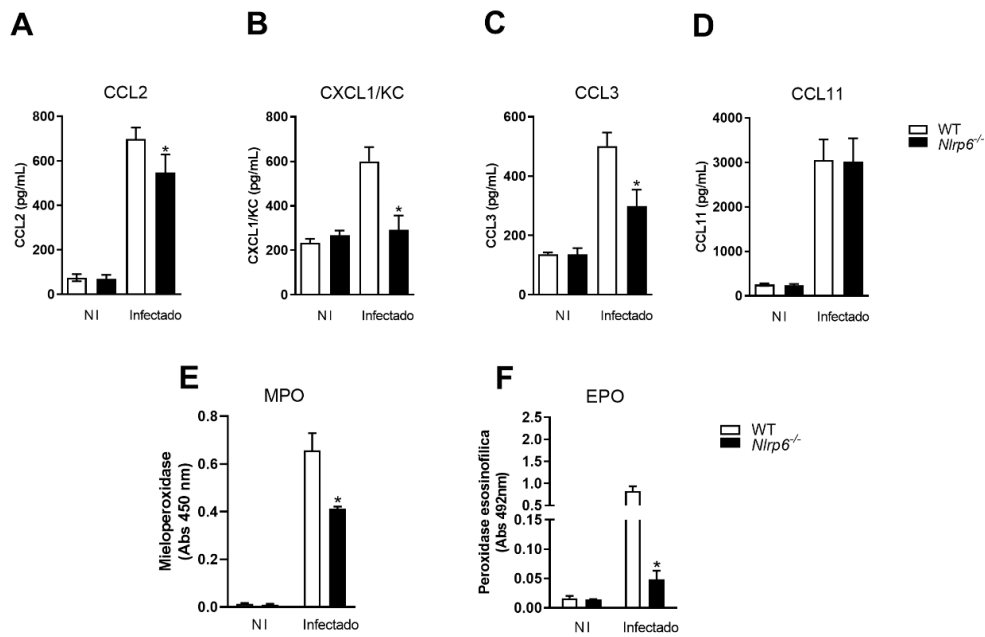
Por outro lado, o sensor NLRP6 demonstrou ter influência na resposta inflamatória periovular, contribuindo significativamente na formação do granuloma (Figura 8A e G). Além disso, esse último fenótipo foi acompanhado também por redução de deposição de colágeno na estrutura granulomatosa de animais *Nlrp6*<sup>-/-</sup> comparados aos WT (Figura 8B e G). Avaliou-se, ainda, os níveis de certas citocinas envolvidas no processo patológico (IL-5 e IL-10), bem como de marcadores fibróticos relevantes (IL-13 e  $\alpha$ -SMA). A Figura 8C-F demonstra que os níveis das citocinas IL-5 e IL-10, assim como as medidas de mRNA de IL-13 e  $\alpha$ -SMA reduziram no grupo *Nlrp6*<sup>-/-</sup>, quando comparado ao grupo WT. Esses dados em conjunto demonstram que NLRP6 contribui para a patologia hepática causada pelo *S. mansoni*.

### **5.3 O sensor NLRP6 medeia o recrutamento de células imunes inatas para o fígado de animais infectados por *S. mansoni***

Uma vez que a ausência de NLRP6 foi capaz de modular a formação do granuloma hepático, nós buscamos entender como esse sensor induz tal fenótipo. Inicialmente, foi avaliado o nível de quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL11 e CXCL1/KC) no fígado de animais infectados. Essas quimiocinas têm sido descritas como relacionadas ao processo de formação dos granulomas. No fígado de animais *Nlrp6*<sup>-/-</sup> infectados, apenas CCL11 não apresentou alteração em comparação a WT (Figura 9D). Os níveis das demais quimiocinas; CCL2, CCL3 e CXCL1, reduziram no fígado de animais *knockout* (Figura 9A-C). Além disso, nós observamos que a atividade enzimática das enzimas Mieloperoxidase (MPO) e Peroxidase Eosinofílica (EPO) também se encontravam reduzidas nos animais *Nlrp6*<sup>-/-</sup>, quando comparada aos animais WT (Figura 9E, F).



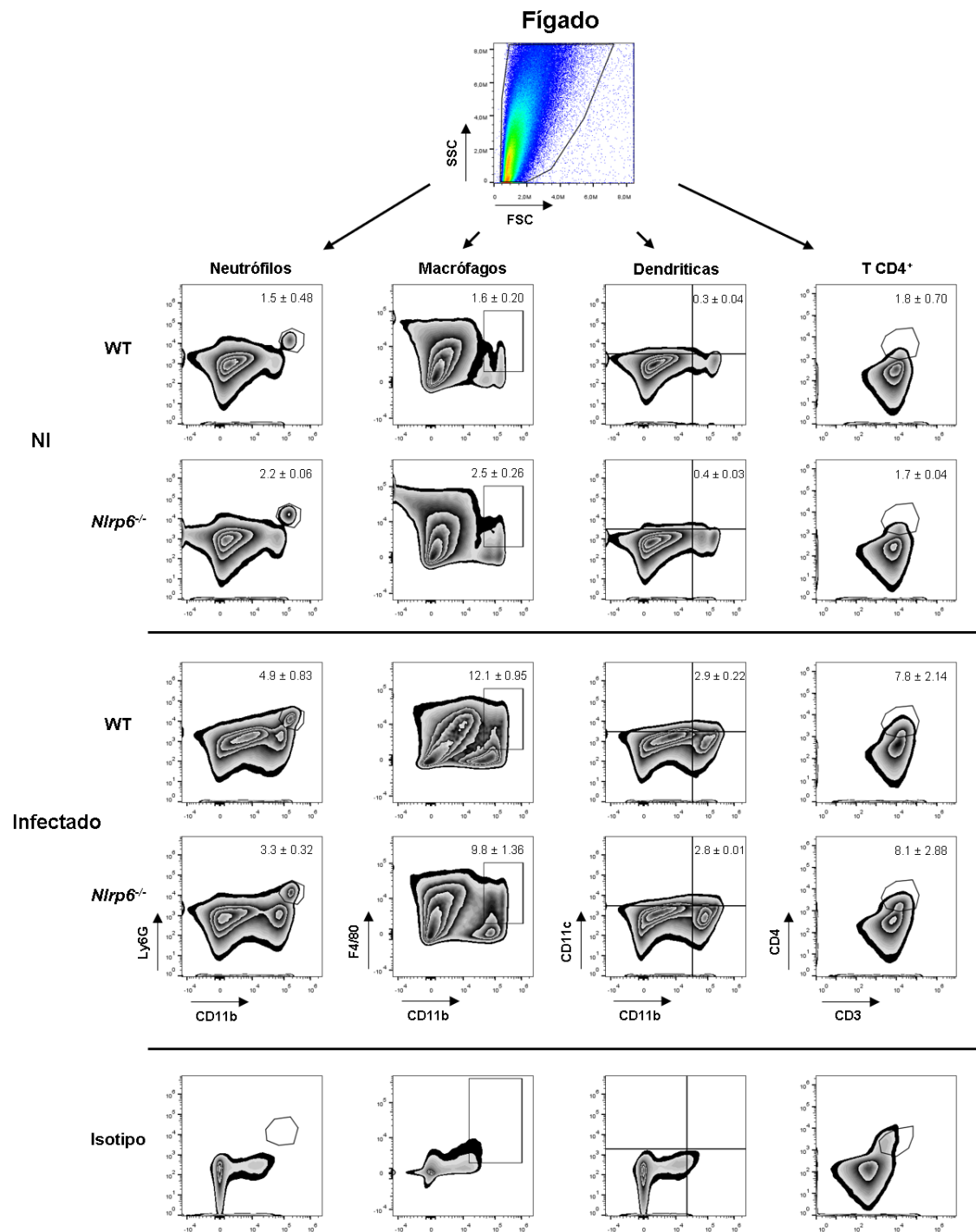
**Figura 8. A patologia associada a infecção por *S. mansoni* é influenciada por NLRP6.** Parâmetros patológicos e moleculares foram avaliados após seis semanas de infecção em animais WT e *Nlrp6*<sup>-/-</sup>. (A) Área granulomatosa ( $\mu\text{m}^2$ ) e (B) deposição de colágeno. Os níveis de (C) IL-5 e (D) IL-10 foram medidos, assim como os níveis dos transcritos de (E)  $\alpha$ -SMA e (F) IL-13. (G) Imagens representativas dos granulomas detectados em hematoxilina-eosina, azul de masson e imagens geradas pelo programa ImageJ, respectivamente. Asterisco denota diferença significativa entre *Nlrp6*<sup>-/-</sup> e WT ( $p < 0,05$ ). As barras representam 100  $\mu\text{m}$ . NI denota animais não infectados.



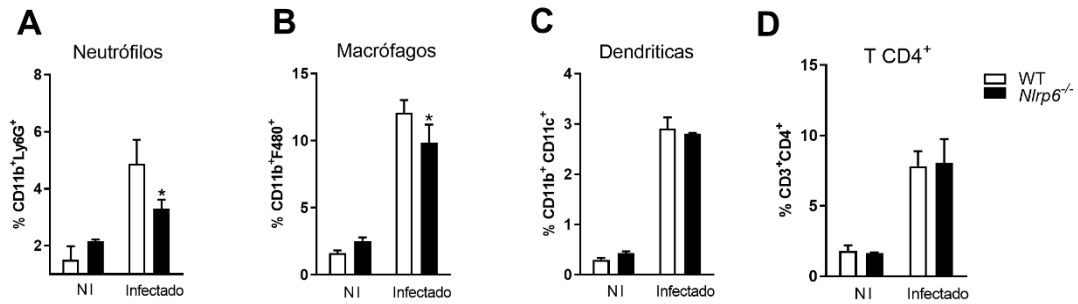
**Figura 9. NLRP6 regula a produção de quimiocinas e a atividades enzimáticas no fígado.** Após seis semanas de infecção, o fígado foi utilizado para medir os níveis de quimiocinas e a atividade de MPO e EPO. Os níveis de (A) CCL2, (B) CXCL1, (C) CCL3 e (D) CCL11 foram avaliados por ELISA. As atividades de (E) MPO e (F) EPO também foram detectadas. Asterisco denota diferença significativa entre *Nlrp6*<sup>-/-</sup> e WT ( $p < 0,05$ ). NI denota animais não infectados.

Considerando o fenótipo de redução dos granulomas nos camundongos *knockout*, o próximo passo foi avaliar quais populações de células não-parenquimais poderiam estar alteradas nestes animais. Baseando-se na estratégia de *gate* da Figura 10, constatou-se que neutrófilos e macrófagos foram as principais populações reduzidas em animais *Nlrp6*<sup>-/-</sup>, quando comparadas ao WT (Figura 11A, B). A frequência de células dendríticas e de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, por sua vez, permaneceram inalteradas (Figura 11C, D). Ademais, nós constatamos que a ausência de NLRP6 não exerce influência na polarização dos macrófagos, embora haja uma tendência de redução na população de macrófagos anti-inflamatórios em camundongos *Nlrp6*<sup>-/-</sup> comparados aos WT, como demonstra a Figura 12.

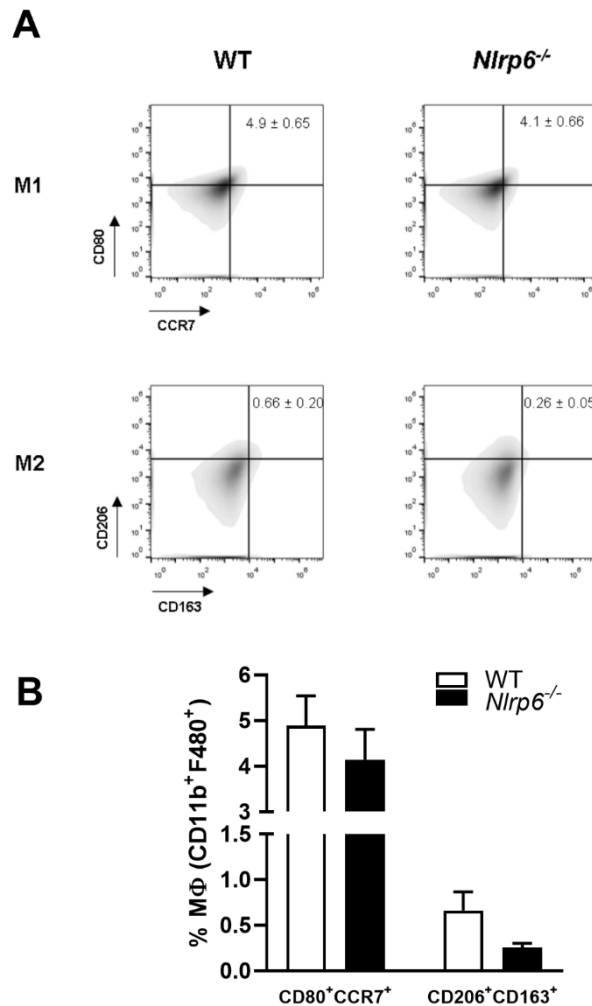
Dessa forma, o sensor NLRP6 possivelmente induz a formação do granuloma hepático favorecendo a produção de quimiocinas e o recrutamento de células imunes para o fígado.



**Figura 10. Estratégia de gate para citometria de fluxo de células não-parenquimais hepáticas de animais WT e *Nlrp6*<sup>-/-</sup>.** Células não parenquimais hepáticas de animais infectados e não infectados (NI) foram marcadas *ex vivo* para proteínas de superfície, após seis semanas de infecção. Os resultados apresentados, a seguir, na Figura 11 foram analisados como segue: Um gate SSC-A e FSC-A foi criado, seguido pela seleção duplo-positiva de CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Como controle negativo, as células foram marcadas com controle isotipo para cada conjunto de anticorpos.



**Figura 11. NLRP6 regula o recrutamento de células para o fígado.** A porcentagem das populações de (A) CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>, (B) CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>, (C) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> e (D) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foram medidas através de citometria de fluxo. Asterisco denota diferença significativa entre *Nlrp6*<sup>-/-</sup> e WT ( $p < 0,05$ ). NI denota animais não infectados.



**Figura 12. Análise da polarização de macrófagos no fígado.** A expressão de marcadores M1 (CD80<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) e M2 (CD206<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>), em células não parenquimais hepáticas, foram determinadas por citometria de fluxo, após seis semanas de infecção. Células CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> foram obtidas com base na estratégia de *gate* mencionada anteriormente. Células duplo-positivas para CD80<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> e CD206<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> foram selecionadas como denota o (A) *dot plot* e a (B) frequência de células.

#### **5.4 A produção de IL-10 e IFN- $\gamma$ por esplenócitos ativados com SEA/Ovos é influenciada por NLRP6**

Após observar o papel de NLRP6 na resposta aos ovos e seus antígenos em BDMCs e constatar a participação fundamental na patologia hepática, nós decidimos avaliar também se em órgãos linfoides secundários, como o baço, encontraríamos ações mediadas por esse receptor. Para tanto, esplenócitos advindos de animais infectados por 6 semanas foram cultivados e estimulados com antígenos do parasito. Observou-se, inicialmente, que frente ao estímulo com SWAP os níveis de citocinas IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$  não variaram de maneira significativa entre os grupos WT e *knockout* (Figura 13A). Contudo, ao avaliar a produção de tais citocinas frente ao estímulo com os ovos e seus antígenos, evidencia-se aumento nos níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  no sobrenadante de células provenientes dos animais *Nlrp6*<sup>-/-</sup>. Nesse mesmo grupo de camundongos há, também, uma tendência de redução dos níveis de IL-13 (Figura 13B). Ademais, foi constatado que as populações de células dendríticas e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> não variaram de maneira significativa entre os grupos (Figura 13C), a despeito de estudo recente relatar que a ausência de NLRP6 tem influência nas populações de linfócitos esplênicos (Radulovic et al., 2019).

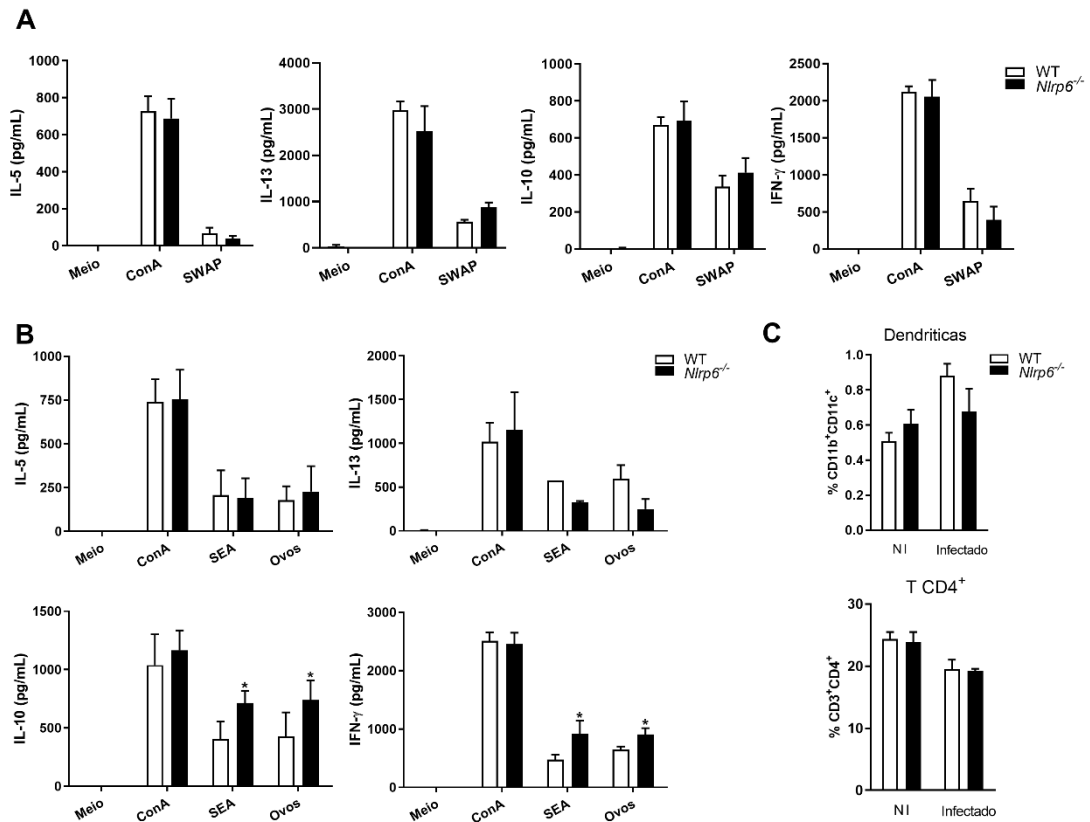
Dado o exposto, observa-se, uma vez mais, que o sensor NLRP6 participa de maneira significativa em resposta aos ovos e seus antígenos, reforçando que talvez os antígenos do verme tenham potencial reduzido de ativar o inflamassoma.

#### **5.5 A via de sinalização do inflamassoma é amplamente relevante na formação do granuloma hepático**

Na última década, estudos têm demonstrado que as moléculas envolvidas na via de sinalização inflamassoma podem desempenhar, também, papéis de maneira independente da formação do complexo citoplasmático característico da via. Os sensores NLRP3 e NLRP6, bem como a molécula adaptadora ASC são exemplos desse comportamento. Por essa razão, nós



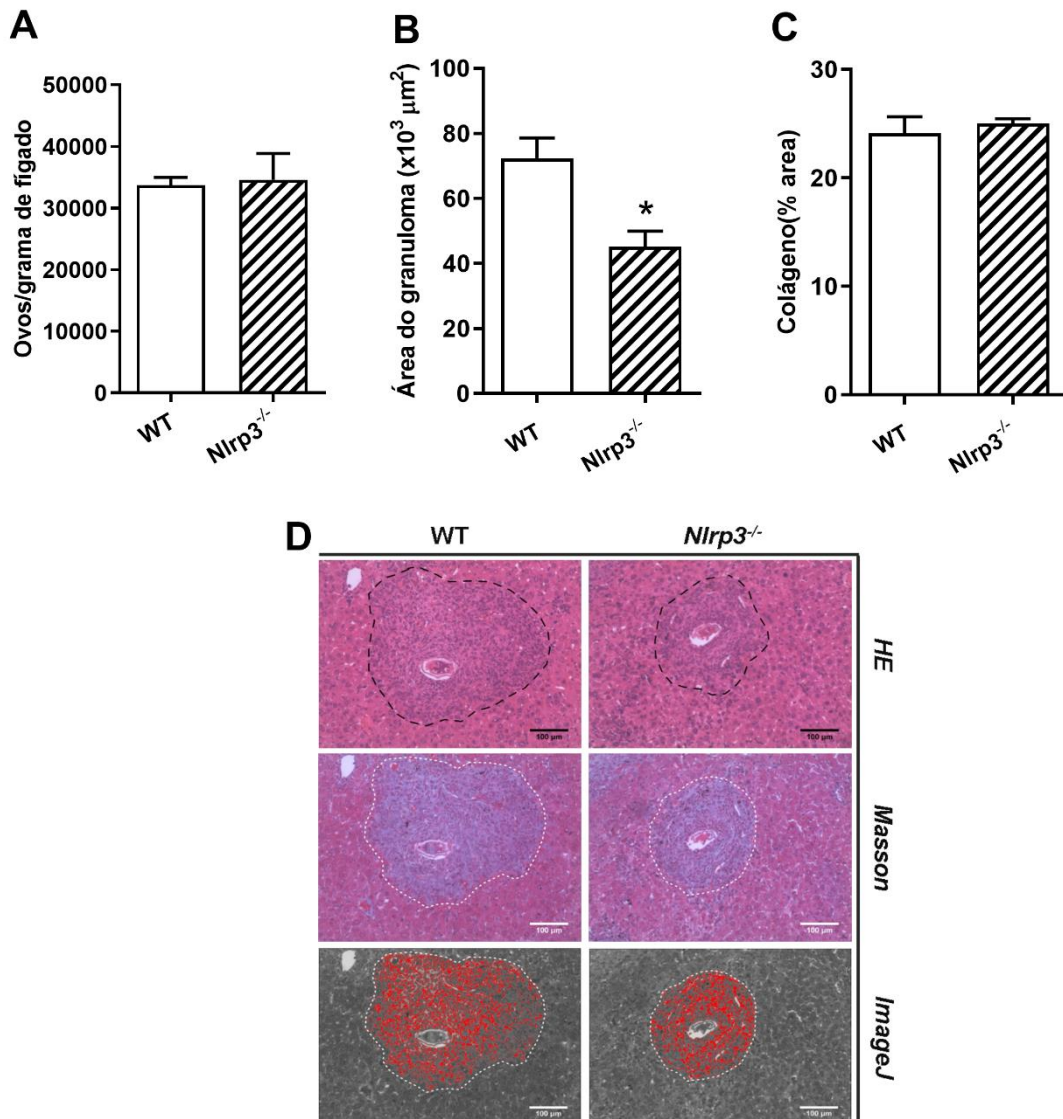
decidimos avaliar se a participação do NLRP6 na patologia hepática convergia com a participação da via do inflamassoma como um todo. Para tanto, parâmetros patológicos já descritos anteriormente foram novamente avaliados para os animais *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *capase-1*<sup>-/-</sup>, *Gsdmd*<sup>-/-</sup> e *IL-1R*<sup>-/-</sup>.



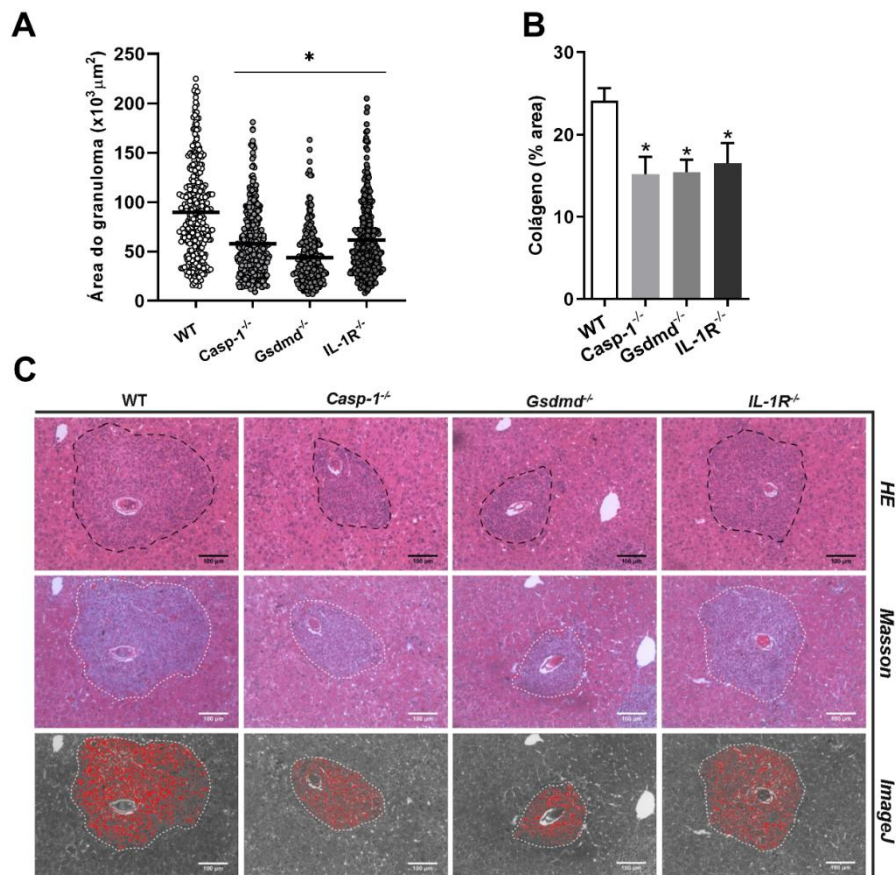
**Figura 13. Perfil de citocinas esplênicas induzidas por SEA/Ovos e SWAP.** Após seis semanas de infecção, os esplênocitos foram reestimulados com (A) SWAP (200 µg/mL), (B) SEA (20 µg/mL), ovos (50/poço) ou ConA (5 µg/mL). Os níveis de citocinas foram medidos por ELISA no sobrenadante das células após 24h (IL-5) e 72h (IL-13, IL-10 e IFN-γ). (C) A porcentagem de células dendríticas (CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) foi analisada a partir do baço de animais infectados e não infectados (NI), através de citometria de fluxo. Asterisco denota diferença significativa entre *Nlrp6*<sup>-/-</sup> e WT ( $p < 0,05$ ).

Nossos resultados para *Nlrp3*<sup>-/-</sup> confirmam as observações feitas por Ritter e colaboradores (2010) em relação à redução na área dos granulomas hepáticos, porém, divergem no que concerne à deposição de colágeno nessas estruturas (Figura 14). Por outro lado, as análises para os demais grupos revelam, de maneira inédita, que na esquistossomose a formação do granuloma hepático e a deposição de colágeno são processos influenciados por caspase-1,

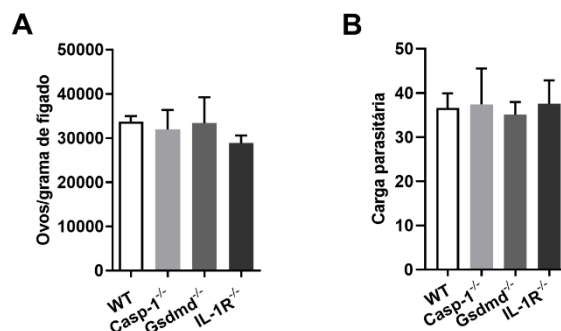
gasdermin-D e pela sinalização via IL-1R (Figura 15). Vale ainda ressaltar que, na comparação entre todos esses animais *knockout* com os animais selvagens, não foi observada alteração no número de ovos por grama de fígado, assim como na carga parasitária (Figura 16).



**Figura 14. O sensor NLRP3 influencia a imunopatologia induzida por *S. mansoni*.** Após seis semanas de infecção, diferentes porções do fígado foram utilizadas para se avaliar parâmetros patológicos. (A) Número de ovos por grama de fígado, (B) área granulomatosa (μm<sup>2</sup>) e (C) deposição de colágeno. (D) Imagens representativas dos granulomas detectados em hematoxilina-eosina, azul de masson e imagens geradas pelo programa ImageJ, respectivamente. Asterisco denota diferença significativa entre *Nlrp3*<sup>-/-</sup> e WT ( $p < 0,05$ ). As barras representam 100 μm.



**Figura 15. A ativação do inflamassoma é requerida para a formação do granuloma e para deposição de colágeno.** Parâmetros patológicos foram analisados no fígado de camundongos deficientes para diferentes componentes do inflamassoma como caspase-1, gasdermina-D e IL-1R. (A) Área do granuloma ( $\mu\text{m}^2$ ) e (B) deposição de colágeno. (C) Imagens representativas dos granulomas detectados em hematoxilina-eosina, azul de masson e imagens geradas pelo programa ImageJ, respectivamente. Asterisco denota diferença significativa entre os animais deficientes e os animais WT ( $p < 0,05$ ). As barras representam 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 16. A via do inflamassoma não influencia o número de ovos no fígado e a carga parasitária.** Após seis semanas de infecção (100 cercárias), os fígados dos animais foram coletados e processados para contagem de ovos e cálculo da (A) relação do número de ovos por grama de fígado. O sistema porta-hepáticos desses animais foi lavado para obtenção dos vermes e avaliação da (B) carga parasitária.

## 6. DISCUSSÃO

Atualmente, doenças hepáticas crônicas são descritas como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Byass, 2014). Infecções por vírus (hepatite) (Gower et al., 2014), síndromes metabólicas (Rosselli et al., 2014) e consumo abusivo de álcool (Rehm et al., 2013) estão entre os principais causadores desse tipo de enfermidade. Diferentemente das lesões hepáticas agudas, onde as células parenquimais regeneram o tecido de maneira controlada através da deposição limitada de Matriz Extracelular (MEC), as lesões crônicas caracterizam-se por um desbalanço na deposição e degradação desses componentes, resultando na gênese de processos fibróticos. Tais processos se caracterizam pela deposição excessiva de componentes matriz extracelular no órgão lesado. Esse acúmulo distorce a arquitetura tecidual, promove disfunção hepatocelular e o aumento da resistência do fluxo sanguíneo, culminando, respectivamente, em insuficiência hepática e hipertensão portal (Friedman, 2003; Ginès et al., 2004).

As implicações supracitadas, inerentes às condições hepáticas crônicas, são amplamente observadas na patologia desencadeada pela esquistossomose, o que, indiscutivelmente, a classifica com uma doença hepática crônica. A longevidade dos parasitos no interior do hospedeiro definitivo e, por conseguinte, a periódica liberação de ovos levam a ciclos de injúria/regeneração no fígado, contribuindo para o estabelecimento de processo fibrótico nesse órgão (Wilson et al., 2007).

O panorama inflamatório hepático, que potencialmente leva à fibrose, envolve vários participantes e uma rede complexa de interação. Os hepatócitos são alvos para grande parte dos agentes hepatotóxicos, o que inclui os antígenos dos ovos de *Schistosoma* (Abdulla et al., 2011). Quando lesados, os hepatócitos liberam uma série de DAMPs e citocinas pró-inflamatórias que induzem o recrutamento de células imunes para o local. Esses sinais promovem a transdiferenciação de fibroblastos, como as Células Hepáticas Estreladas (HSCs), que a partir

de então passam a secretar componentes da MEC. Além disso, as células HSCs ativadas secretam também citocinas inflamatórias, expressam moléculas de adesão e modulam a ativação de leucócitos. Dessa forma, se estabelece um ciclo em que células inflamatórias e fibrogênicas estimulam-se mutualmente (Bataller, Brenner, 2005).

Grande parte dos processos citados acima decorrem da ativação de vias de sinalização da resposta imune, como aquelas desencadeadas por receptores TLRs e CLRrs (Seifert et al., 2015). Contudo, recentemente, a via do inflamassoma tem ganhado grande destaque nesse contexto. Luan e Ju (2018) reuniram achados que demonstram que o inflamassoma pode desempenhar tanto papéis fisiológicos como patológicos durante as doenças hepáticas (Luan, Ju, 2018). Essas ações foram descritas para uma diversa gama de receptores. Animais deficientes para NLRC4 (C57BL/6), por exemplo, são mais susceptíveis à infecção por *Chromobacterium violaceum*, patógeno que apresenta tropismo para o fígado. O inflamassoma de NLRC4 medeiam a produção de IL-18 que, então, auxilia Células Assassina Naturais (NK) a eliminarem nichos de replicação de *C. violaceum* nos hepatócitos (Maltez et al., 2015). O NLRP3, por sua vez, participa na supressão do crescimento de tumores localizados no fígado, advindos de metástase de câncer colorretal (C57BL6/J). Esse processo é altamente dependente de IL-18, que promove a maturação de células NK e auxilia sua ação citotóxica tumoral (Dupaul-Chicoine et al., 2015). Além disso, NLRP3 induz também a piroptose como forma de controle de proliferação, em contextos de carcinoma hepatocelular (Zhiyu et al., 2016). Por outro lado, ambos receptores (NLRC4 e NLRP3) podem atuar, de maneira igualmente decisiva, na patogênese da Doença Hepática Alcólica (ALD), o que evidencia suas funções duais (fisiológicas e patológicas) e contexto-dependentes (Cui et al., 2015; DeSantis et al., 2013).

As constatações que estabelecem, portanto, a relação entre doenças hepáticas e a via do inflamassoma tornaram legítimas as especulações do envolvimento de tal via com a esquistossomose, dada a natureza patológica da doença. Ademais, como já extensamente

descrito na seção introdutória, os antígenos do parasito têm a capacidade de ativar um vasto repertório de receptores imunes inatos. Diante disso, Ritter e colaboradores (2010) estabeleceram, pela primeira vez, que os antígenos de *S. mansoni* de fato induzem a ativação do inflamassoma. Mais precisamente, BMDCs respondem a antígenos dos ovos, produzindo IL-1 $\beta$  de forma dependente de NLRP3. Tal receptor demonstrou ser ainda mais relevante quando se analisou a patologia hepática resultante da infecção de animais deficientes (C57BL/6 *Nlrp3*<sup>-/-</sup>), onde se constatou granulomas significativamente menores e mais fibróticos (Ritter et al., 2010). Essas observações patológicas foram, em parte, confirmadas em nosso estudo, onde constatamos a redução da área granulomatosa em animais *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, mas sem variação na deposição de colágeno, quando comparado ao animal selvagem. Essa discordância pode estar relacionada ao tempo de infecção empregado em nossa abordagem (6 semanas).

Os achados iniciais de Ritter e colaboradores (2010) foram sustentados, a posteriori, pelos estudos de Meng e colaboradores (2016) e Lu e colaboradores (2017). Esses autores demonstraram que o papel desempenhado por NLRP3 na patologia hepática induzida por *S. japonicum* é semelhante ao observado em infecções por *S. mansoni*. Contudo, nos modelos empregados (BALB/c), as constatações foram de que a ausência de NLRP3 promove não só a redução na área do granuloma hepático como também a redução da deposição de colágeno. Além disso, verificou-se que tal receptor influencia a forma como células HSCs respondem à antígenos dos ovos (*S. japonicum*). Essa última observação foi sobretudo relevante pois evidencia que, além alterar a ativação de caspase-1 e a produção de IL-1 $\beta$  frente ao estímulo com SEA, o NLRP3 influencia também o perfil fibrogênico das HSCs, como a produção de colágeno tipo I e do Inibidor de Metaloproteinase 1 (TIMP-1), ambos reduzidos mediante o silenciamento do receptor (Lu et al., 2017; Meng et al., 2016).

As evidências supracitados colocaram, irrefutavelmente, a via do inflamassoma como parte fundamental do processo patológico associado à infecção pelo *Schistosoma*,

principalmente por intermédio do receptor NLRP3. Contudo, a observação de estudos relacionados a doenças hepáticas crônicas de naturezas distintas, nos deram indícios de que outros receptores NLRs, como o NLRP6, poderiam também estar envolvidos na patologia causada pela esquistossomose.

Sabe-se que o estado pró-inflamatório encontrado em indivíduos com obesidade visceral se correlaciona com o desenvolvimento de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (NFLD). Diante disso, Mehta e colaboradores (2014) observaram que em amostras de tecido adiposo visceral, proveniente de indivíduos obesos e positivos para fibrose portal hepática, a expressão do mRNA de *NLRP6* foi maior quando comparada a amostras advindas de indivíduos obesos e negativos para fibrose hepática (Mehta et al., 2014). Por outro lado, em Esteatose Hepática Não Alcoólica (NASH) induzida por dieta deficiente em metionina-colina, observa-se elevada expressão de NLRP3 e NLRP6 no fígado dos animais experimentais (C57BL/6). Após tratamento com polissacarídeos de *Lycium barbarum* (LBP) relata-se melhora no quadro de NASH com redução da expressão hepática de NLRP3 e NLRP6 (Xiao et al., 2018). Zhu e colaboradores (2018), por sua vez, demonstraram que a expressão de NLRP6 é modulada em pacientes com fibrose e cirrose hepática. Além disso, em fibroblastos humanos (LX-2), os autores observaram que a superexpressão de NLRP6 promove alterações na proliferação celular, no acúmulo de hidroxiprolina, na expressão de colágeno, de  $\alpha$ -SMA e de metaloproteinases (Zhu et al., 2018). Mediante a todas essas observações, nos coube avaliar se NLRP6 poderia contribuir também durante a patologia hepática associada a esquistossomose.

Com base no papel das células dendríticas durante a apresentação de antígenos dos ovos e, por conseguinte, na patologia, nós iniciamos investigando BMDCs. Constatou-se, que o NLRP6 poderia influenciar a ativação de capase-1 e a produção de IL-1 $\beta$  em células estimuladas com SEA e ovos, porém de maneira menos pronunciada do que reportado anteriormente para NLRP3 (Ritter et al., 2010). Ademais, ainda nesse contexto celular, nós verificamos que os

ovos de *S. mansoni* detêm o potencial de ativar a via do inflamassoma sem a necessidade de indução prévia com Pam<sub>3</sub>Cys, tal como descrito por Kalantari e colaboradores (2018).

Por outro lado, no que concerne à patologia, o papel de NLRP6 demonstrou ser mais pronunciado. Os granulomas hepáticos e a deposição de colágeno nessas estruturas foram altamente modulados em animais *Nlrp6*<sup>-/-</sup>. Essa evidência, naturalmente, sugeriu que o recrutamento de células para o fígado poderia, em certa medida, ser controlado por NLRP6. Os dados obtidos acerca da produção de quimiocinas e da atividade enzimática de MPO e EPO (ambos reduzidos em camundongos *Nlrp6*<sup>-/-</sup>) reforçaram a necessidade de avaliar a frequência de células imunes no fígado desses animais após a infecção. Como esperado, a redução percentual dessas células foi constatada, mais precisamente para as populações de macrófagos e neutrófilos. A capacidade do NLRP6 em influenciar o recrutamento de neutrófilos, em modelo de inflamação não-estéril, já havia sido relatada anteriormente para infecção por *Staphylococcus aureus*, com os dados mostrando aumento no recrutamento e na função dessas células no pulmão de camundongos C57BL/6 *Nlrp6*<sup>-/-</sup> (Ghimire et al., 2018). Entretanto, recentemente, Cai e colaboradores (2020) observaram que em modelo de infecção pela bactéria gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* o comportamento parece ser antagônico. Os autores demonstram que animais (C57BL/6) deficientes para NLRP6 são mais susceptíveis à infecção, uma vez que apresentam menor atividade de MPO, produção reduzida de CXCL1 e menor recrutamento de neutrófilos para o pulmão. Ademais, comprovou-se que administração de CXCL1 em animais *Nlrp6*<sup>-/-</sup> restaura a proteção frente à infecção (Cai et al., 2020). Embora opostos, esses achados evidenciam que o sensor NLRP6 de fato influencia o recrutamento de células imunes para os tecidos, assim como relatado em nosso estudo, e que isso guarda relação com a produção de quimiocinas teciduais.

Ainda com relação às consequências da ausência de NLRP6 na produção de quimiocinas, vale salientar que em nosso modelo observamos também a redução nos níveis da



quimiocina CCL3, o que representa um achado importante. Isso porque a investigação de animais C57BL/6 *Ccl3*<sup>-/-</sup>, conduzida por Souza e colaboradores (2005), revelou fenótipos semelhantes aos observados em camundongos *Nlrp6*<sup>-/-</sup> infectados. Dentre eles destaca-se redução da atividade de EPO, redução da área granulomatosa e da deposição de colágeno no fígado. Além disso, em humanos, os autores constataram maior produção de CCL3 no plasma de indivíduos acometidos pela forma hepatoesplênica da doença, quando comparado à forma intestinal (Souza et al., 2005).

Outra característica notória, porém, não exclusiva, do sensor NLRP6 é a capacidade de executar funções sem que esteja necessariamente associado ao complexo citosólico característico da via do inflamassoma (Levy et al., 2017). Exemplos dessas funções incluem contextos de infecção viral entérica (Wang et al., 2015) e ações de regulação negativa das vias canônicas de NF- $\kappa$ B e MAPK em células mieloides, como macrófagos e neutrófilos (Anand et al., 2012). Contudo, vale ressaltar que esse tipo de ação inflamassoma-independente já fora relatada também para o NLRP3 (Bruchard et al., 2015) e ASC (Ippagunta et al., 2010). Devido a esse comportamento não-canônico, consideramos importante avaliar se outros componentes da via do inflamassoma como caspase-1, Gasdermina-D e IL-1R estariam envolvidos na patologia hepática induzida pela esquistossomose. Os dados de tamanho de granuloma e deposição de colágeno indicaram que os três componentes mencionados participam na patologia da doença. Dessa forma, se faz legítimo e factível sugerir que as ações de NLRP3 e NLRP6 na formação do granuloma hepático possam estar relacionadas a formação do complexo inflamassoma.

A participação de gasdermina-D na formação do granuloma hepático induzido pela infecção por *S. mansoni* não havia sido relatado anteriormente, até onde se tem conhecimento. Contudo, estudos com *S. japonicum* corroboram nossos achados. Liu e colaboradores (2019) demonstram que, após infecção, a expressão da porção N-terminal de gasdermina-D (GSDMD-

N) é detectável no fígado de animais C57BL/6, e ocorre de maneira dependente de NLRP3 (Liu et al., 2019). Além disso, comprovou-se recentemente que SEA advindo de ovos de *S. japonicum* são capazes de induzir piroptose em HSCs, de maneira dependente de ROS (Kong et al., 2019). Todas essas observações são, também, suportadas pelo fato de que a piroptose tem sido demonstrada como processo fundamental na patogênese de diferentes doenças hepáticas, como revisado por Guo e colaboradores (2019)(Guo et al., 2019).

Uma vez que se compreende cada vez mais o papel do inflamassoma no contexto das doenças hepáticas, incluindo a esquistossomose, a consideração acerca da inibição dessa via como forma de terapia naturalmente emerge. Sabe-se que terapias com antagonistas de IL-1R estão atualmente aprovadas para o tratamento de doenças auto inflamatórias, mas estudos clínicos ainda estão sendo conduzidos para se avaliar essa estratégia em contexto hepático (Alegre et al., 2017). Por outro lado, o estudo de abordagens visando a interferência direta na via do inflamassoma ainda estão menos aprofundados, o composto mais promissor é o inibidor de NLRP3 MCC950 (Coll et al., 2015). Em infecção por *S. japonicum* o uso de MCC950 apresentou papel dual. Quando administrado simultaneamente à infecção, tal composto promove melhora na patologia hepática. Mas quando administrado após 22 dias de infecção agrava parâmetros fibróticos (Zhang et al., 2019). A administração do aminoácido não-essencial taurina, por sua vez, demonstrou recentemente potencial em reduzir a patologia induzida por *S. japonicum* em camundongos, promovendo redução nos níveis hepáticos de NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$  e GSDMD-N (Liu et al., 2019). Esses dados ressaltam a escassez e, logo, a necessidade de mais estudos pré-clínicos para explorar a intervenção da via do inflamassoma como terapia alternativa para esquistossomose.

## 7. CONCLUSÃO

Dado todo o exposto, se faz evidente que mesmo após décadas de estudos, a patologia hepática associada à esquistossomose ainda não está plenamente elucidada. A descoberta do envolvimento da via do inflamassoma nesse contexto, sobretudo do receptor NLRP3, mostrou que a complexidade do processo patológico pode ser ainda maior. Em nosso estudo nós demonstramos que outro receptor da mesma família, o NLRP6, desempenha papel igualmente crucial na formação do granuloma hepático e também na ativação de caspase-1 em resposta aos ovos de *S. mansoni*. Dessa forma, maiores investigações serão necessárias para aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos moleculares relacionados ao NLRP6 nesse contexto, e em um futuro próximo aplica-los na descoberta de novas formas de terapia para a esquistossomose.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abdulla, M.-H., Lim, K.-C., McKerrow, J.H. and Caffrey, C.R. Proteomic identification of IPSE/alpha-1 as a major hepatotoxin secreted by *Schistosoma mansoni* eggs. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, p. e1368, 2011.
- Aglietti, R.A., Estevez, A., Gupta, A., Ramirez, M.G., Liu, P.S., Kayagaki, N., Ciferri, C., Dixit, V.M. and Dueber, E.C. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 28, p. 7858-63, 2016.
- Aksoy, E., Zouain, C.S., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M. and Capron, M. Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 1, p. 277-83, 2005.
- Alegre, F., Pelegrin, P. and Feldstein, A.E. Inflammasomes in liver fibrosis. In *Semin Liver Dis*, vol. 37: **Thieme Medical Publishers**, pp. 119-27, 2017.
- Anand, P.K., Malireddi, R.S., Lukens, J.R., Vogel, P., Bertin, J., Lamkanfi, M. and Kanneganti, T.-D. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 389-93, 2012.
- Anthony, B.J., James, K.R., Gobert, G.N., Ramm, G.A. and McManus, D.P. *Schistosoma japonicum* eggs induce a proinflammatory, anti-fibrogenic phenotype in hepatic stellate cells. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e68479, 2013.
- Appleton, C. and Lethbridge, R. Schistosome dermatitis in the Swan estuary, Western Australia. **Med. J. Aust.**, v. 1, n. 5, p. 141-44, 1979.
- Ashour, D.S. Toll-like receptor signaling in parasitic infections. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 11, n. 6, p. 771-80, 2015.
- Awad, F., Assrawi, E., Jumeau, C., Georjin-Lavialle, S., Cobret, L., Duquesnoy, P., Piterboth, W., Thomas, L., Stankovic-Stojanovic, K. and Louvrier, C. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175336, 2017.
- Bafica, A.M.B., Cardoso, L.S., Oliveira, S.C., Loukas, A., Goes, A., Oliveira, R.R., Carvalho, E.M. and Araujo, M.I. Changes in T-cell and monocyte phenotypes in vitro by *Schistosoma mansoni* antigens in cutaneous leishmaniasis patients. **J Parasitol Res**, v. 2012, n., 2012.
- Barsoum, R.S. Urinary schistosomiasis. **J Adv Res**, v. 4, n. 5, p. 453-59, 2013.
- Barsoum, R.S., Esmat, G. and El-Baz, T. Human schistosomiasis: clinical perspective. **J Adv Res**, v. 4, n. 5, p. 433-44, 2013.
- Basch, P.F. *Schistosomes: Development, reproduction, and host relations*: **Oxford University Press**, 1991.

- Bataller, R. and Brenner, D.A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 209-18, 2005.
- Baumgart, M., Tompkins, F., Leng, J. and Hesse, M. Naturally occurring CD4+ Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. **J Immunol**, v. 176, n. 9, p. 5374-87, 2006.
- Bloch, E.H., Wahab, M.A. and Warren, K.S. In vivo microscopic observations of the pathogenesis and pathophysiology of hepatosplenic schistosomiasis in the mouse liver. **Am J Trop Med Hyg**, v. 21, n. 5, p. 546-57, 1972.
- Broz, P. and Dixit, V.M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 7, p. 407-20, 2016.
- Bruchard, M., Rebé, C., Derangère, V., Togbé, D., Ryffel, B., Boidot, R., Humblin, E., Hamman, A., Chalmin, F. and Berger, H. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH 2 differentiation. **Nat. Immunol.**, v. 16, n. 8, p. 859-70, 2015.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. and van Noort, J.M. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 61, n. 11, p. 1013-21, 2002.
- Butterworth, A., Sturrock, R., Houba, V., Mahmoud, A., Sher, A. and Rees, P. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. **Nature**, v. 256, n. 5520, p. 727-29, 1975.
- Byass, P. The global burden of liver disease: a challenge for methods and for public health. **BMC Med**, v. 12, n. 1, p. 1-3, 2014.
- Cai, S., Paudel, S., Jin, L., Ghimire, L., Taylor, C.M., Wakamatsu, N., Bhattarai, D. and Jeyaseelan, S. NLRP6 modulates neutrophil homeostasis in bacterial pneumonia-derived sepsis. **Mucosal Immunol**, v., n., p. 1-11, 2020.
- Cançado, G.G.L., Fiuza, J.A., de Paiva, N.C.N., de Carvalho Dhom Lemos, L., Ricci, N.D., Gazzinelli-Guimaraes, P.H., Martins, V.G., Bartholomeu, D.C., Negrao-Correia, D.A. and Carneiro, C.M. Hookworm products ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 11, p. 2275-86, 2011.
- Cario, E., Rosenberg, I.M., Brandwein, S.L., Beck, P.L., Reinecker, H.-C. and Podolsky, D.K. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. **J Immunol**, v. 164, n. 2, p. 966-72, 2000.
- Carvalho, R.V. and Zamboni, D.S. Inflammasome activation in response to intracellular protozoan parasites. **Trends Parasitol.**, v. 36, n. 5, p. 459-72, 2020.
- Cheever, A.W. and Andrade, Z.A. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 5, p. 626-39, 1967.

- Cheever, A.W., Duvall, R.H., Hallack Jr, T.A., Minker, R.G., Malley, J.D. and Malley, K.G. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 37, n. 1, p. 85-97, 1987.
- Chen, J., Pan, J., Wang, J., Song, K., Zhu, D., Huang, C. and Duan, Y. Soluble egg antigens of *Schistosoma japonicum* induce senescence in activated hepatic stellate cells by activation of the STAT3/p53/p21 pathway. **Sci Rep**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. and Savioli, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.**, v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000.
- Chuah, C., Jones, M.K., Burke, M.L., McManus, D.P. and Gobert, G.N. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends Parasitol.**, v. 30, n. 3, p. 141-50, 2014.
- Chuah, C., Jones, M.K., Burke, M.L., Owen, H.C., Anthony, B.J., McManus, D.P., Ramm, G.A. and Gobert, G.N. Spatial and temporal transcriptomics of *Schistosoma japonicum*-induced hepatic granuloma formation reveals novel roles for neutrophils. **J. Leukocyte Biol.**, v. 94, n. 2, p. 353-65, 2013.
- Clarke, V. Evidence of the development in man of acquired resistance to infection of schistosoma SPP. **Cent Afr J Med**, v. 12, n. 1, p. 1-3, 1966.
- Clegg, J. and Smithers, S. Death of schistosome cercariae during penetration of the skin: II. Penetration of mammalian skin by *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 111-28, 1968.
- Coll, R.C., Robertson, A.A., Chae, J.J., Higgins, S.C., Muñoz-Planillo, R., Insserra, M.C., Vetter, I., Dungan, L.S., Monks, B.G. and Stutz, A. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Nat. Med.**, v. 21, n. 3, p. 248-55, 2015.
- Collins III, J.J., King, R.S., Cogswell, A., Williams, D.L. and Newmark, P.A. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e1009, 2011.
- Collins III, J.J., Wang, B., Lambrus, B.G., Tharp, M.E., Iyer, H. and Newmark, P.A. Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 494, n. 7438, p. 476-79, 2013.
- Correale, J. and Farez, M. Helminth antigens modulate immune responses in cells from multiple sclerosis patients through TLR2-dependent mechanisms. **J Immunol**, v. 183, n. 9, p. 5999-6012, 2009.
- Cui, K., Yan, G., Xu, C., Chen, Y., Wang, J., Zhou, R., Bai, L., Lian, Z., Wei, H. and Sun, R. Invariant NKT cells promote alcohol-induced steatohepatitis through interleukin-1 $\beta$  in mice. **J Hepatol**, v. 62, n. 6, p. 1311-18, 2015.

- D Almeida, J., Maliska, C., Pellegrini, P., Penas, M., Collares, R. and Cruz, M. Schistosomiasis haematobia in Brazilian patients: clinical and renal functional evaluation with <sup>99m</sup>Tc-DTPA. **J. Venom. Anim. Tox. incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 3, p. 677-85, 2007.
- DeSantis, D.A., Ko, C.-w., Liu, Y., Liu, X., Hise, A.G., Nunez, G. and Croniger, C.M. Alcohol-induced liver injury is modulated by Nlrp3 and Nlrc4 inflammasomes in mice. **Mediators Inflamm**, v. 2013, n., 2013.
- Dorsey, C.H., Cousin, C.E., Lewis, F.A. and Stirewalt, M.A. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**, v. 33, n. 3, p. 279-323, 2002.
- Dupaul-Chicoine, J., Arabzadeh, A., Dagenais, M., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A., Rodrigue-Gervais, I.G., Breton, V., Colpitts, S.L. and Beauchemin, N. The Nlrp3 inflammasome suppresses colorectal cancer metastatic growth in the liver by promoting natural killer cell tumoricidal activity. **Immunity**, v. 43, n. 4, p. 751-63, 2015.
- Duverger, E., Lamerant-Fayel, N., Frison, N. and Monsigny, M. Carbohydrate-lectin interactions assayed by SPR. In Surface Plasmon Resonance: **Springer**, pp. 157-78, 2010.
- Engels, D., Chitsulo, L., Montresor, A. and Savioli, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop.**, v. 82, n. 2, p. 139-46, 2002.
- Fallon, P.G., Richardson, E.J., McKenzie, G.J. and McKenzie, A.N. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2585-91, 2000.
- Fanning, M., Peters, P., Davis, R., Kazura, J. and Mahmoud, A. Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni*: relationship of genetic background to hepatosplenic disease and modulation. **J. Infect. Dis.**, v. 144, n. 2, p. 148-53, 1981.
- Farley, J. Bilharzia: a history of imperial tropical medicine: **Cambridge University Press**, 2003.
- Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S. and Beer, H.-D. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1 $\beta$  by keratinocytes. **Curr. Biol.**, v. 17, n. 13, p. 1140-45, 2007.
- Ferguson, B.J., Newland, S.A., Gibbs, S.E., Tourlomousis, P., dos Santos, P.F., Patel, M.N., Hall, S.W., Walczak, H., Schramm, G. and Haas, H. The *Schistosoma mansoni* T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in macrophages. **Int. J. Parasitol.**, v. 45, n. 13, p. 809-13, 2015.
- Fink, S.L. and Cookson, B.T. Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection. **Cell. Microbiol.**, v. 9, n. 11, p. 2562-70, 2007.
- Foote, J.B., Kok, M., Leatherman, J.M., Armstrong, T.D., Marcinkowski, B.C., Ojalvo, L.S., Kanne, D.B., Jaffee, E.M., Dubensky, T.W. and Emens, L.A. A STING agonist given

- with OX40 receptor and PD-L1 modulators primes immunity and reduces tumor growth in tolerized mice. **Cancer Immunol Res**, v. 5, n. 6, p. 468-79, 2017.
- Franz, K.M. and Kagan, J.C. Innate immune receptors as competitive determinants of cell fate. **Mol. Cell**, v. 66, n. 6, p. 750-60, 2017.
- Friedman, S.L. Liver fibrosis—from bench to bedside. **J Hepatol**, v. 38, n., p. 38-53, 2003. Fu, C.-L., Odegaard, J.I., De'Broski, R.H. and Hsieh, M.H. A novel mouse model of *Schistosoma haematobium* egg-induced immunopathology. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002605, 2012.
- Georgi, J.R., Wade, S.E. and Dean, D.A. *Schistosoma mansoni*: mechanism of attrition and routes of migration from lungs to hepatic portal system in the laboratory mouse. **J Parasitol**, v., n., p. 706-11, 1987.
- Ghimire, L., Paudel, S., Jin, L., Baral, P., Cai, S. and Jeyaseelan, S. NLRP6 negatively regulates pulmonary host defense in Gram-positive bacterial infection through modulating neutrophil recruitment and function. **PLoS Path.**, v. 14, n. 9, p. e1007308, 2018.
- Ginès, P., Cárdenas, A., Arroyo, V. and Rodés, J. Management of cirrhosis and ascites. **New Engl. J. Med.**, v. 350, n. 16, p. 1646-54, 2004.
- Giorgio, S., Gallo-Francisco, P.H., Roque, G.A.S. and e Silva, M.F. Granulomas in parasitic diseases: the good and the bad. **Parasitol. Res.**, v., n., p. 1-16, 2020.
- Goldring, O., Clegg, J., Smithers, S. and Terry, R. Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 26, n. 1, p. 181, 1976.
- Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K. and Razavi, H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, v. 61, n. 1, p. S45-S57, 2014.
- Gringhuis, S.I., Kaptein, T.M., Wevers, B.A., Theelen, B., Van Der Vlist, M., Boekhout, T. and Geijtenbeek, T.B. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 $\beta$  via a noncanonical caspase-8 inflammasome. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 246, 2012.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schäfer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Förster, I. and Ruland, J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**, v. 442, n. 7103, p. 651-56, 2006.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J. and Kestens, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-18, 2006.
- Gulati, A., Kaur, D., Prasad, G.K. and Mukhopadhyaya, A. PRR function of innate immune receptors in recognition of bacteria or bacterial ligands. In *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules*: **Springer**, pp. 255-80, 2018.



- Guo, H., Xie, M., Zhou, C. and Zheng, M. The relevance of pyroptosis in the pathogenesis of liver diseases. **Life Sci.**, v. 223, n., p. 69-73, 2019.
- Hams, E., Aviello, G. and Fallon, P.G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Front Immunol**, v. 4, n., p. 89, 2013.
- Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Rigby, R.J., Bell, S.J., Emmanuel, A.V., Knight, S.C., Kamm, M.A. and Stagg, A.J. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 129, n. 1, p. 50-65, 2005.
- Hernandez, H.J., Wang, Y., Tzellas, N. and Stadecker, M.J. Expression of class II, but not class I, major histocompatibility complex molecules is required for granuloma formation in infection with *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, n. 5, p. 1170-76, 1997.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J. and Wynn, T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J Immunol**, v. 167, n. 11, p. 6533-44, 2001.
- Hesse, M., Piccirillo, C.A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., Cheever, A.W., Shevach, E.M. and Wynn, T.A. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 3157-66, 2004.
- Hoffmann, K.F., Cheever, A.W. and Wynn, T.A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6406-16, 2000.
- Iacomini, J., Ricklan, D.E. and Stadecker, M.J. T cells expressing the  $\gamma\delta$  T cell receptor are not required for egg granuloma formation in schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 4, p. 884-88, 1995.
- Ippagunta, S.K., Brand, D.D., Luo, J., Boyd, K.L., Calabrese, C., Stienstra, R., Van de Veerdonk, F.L., Netea, M.G., Joosten, L.A. and Lamkanfi, M. Inflammasome-independent role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in T cell priming is critical for collagen-induced arthritis. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 16, p. 12454-62, 2010.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat. Immunol.**, v. 16, n. 4, p. 343-53, 2015.
- Jenkins, S.J., Hewitson, J.P., Ferret-Bernard, S. and Mountford, A.P. Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and-independent pathways. **Int. Immunol.**, v. 17, n. 11, p. 1409-18, 2005.
- Jesus, A.R., Silva, A., Santana, L.B., Magalhaes, A., de Jesus, A.A., de Almeida, R.P., Rêgo, M.A., Burattini, M.N., Pearce, E.J. and Carvalho, E.M. Clinical and immunologic

- evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis**, v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.
- Jonuleit, H. and Schmitt, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **J Immunol**, v. 171, n. 12, p. 6323-27, 2003.
- Kaisar, M.M., Ritter, M., Del Fresno, C., Jónasdóttir, H.S., van der Ham, A.J., Pelgrom, L.R., Schramm, G., Layland, L.E., Sancho, D. and da Costa, C.P. Dectin-1/2-induced autocrine PGE2 signaling licenses dendritic cells to prime Th2 responses. **PLoS Biol.**, v. 16, n. 4, p. e2005504, 2018.
- Kalantari, P., Morales, Y., Miller, E.A., Jaramillo, L.D., Ponichtera, H.E., Wuethrich, M.A., Cheong, C., Seminario, M.C., Russo, J.M. and Bunnell, S.C. CD209a synergizes with Dectin-2 and mincle to drive severe Th17 cell-mediated schistosome egg-induced immunopathology. **Cell Rep**, v. 22, n. 5, p. 1288-300, 2018.
- Kane, C.M., Cervi, L., Sun, J., McKee, A.S., Masek, K.S., Shapira, S., Hunter, C.A. and Pearce, E.J. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. **J Immunol**, v. 173, n. 12, p. 7454-61, 2004.
- Kapoor, S. Katayama syndrome in patients with schistosomiasis. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 4, n. 3, p. 244, 2014.
- Katz, N. and Peixoto, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, n. 3, p. 303-08, 2000.
- Kawai, T. and Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 5, p. 373, 2010.
- Kawasaki, T. and Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol**, v. 5, n., p. 461, 2014.
- King, C.L., Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J.H. and Kazura, J.W. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. **J Immunol**, v. 160, n. 7, p. 3578-84, 1998.
- Koerner, I., Kochs, G., Kalinke, U., Weiss, S. and Staeheli, P. Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus. **J. Virol.**, v. 81, n. 4, p. 2025-30, 2007.
- Kolářová, L., Horák, P., Skírnisson, K., Marečková, H. and Doenhoff, M. Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v. 45, n. 1, p. 63-74, 2013.
- Kong, D.-L., Kong, F.-Y., Liu, X.-Y., Yan, C., Cui, J., Tang, R.-X. and Zheng, K.-Y. Soluble egg antigen of *Schistosoma japonicum* induces pyroptosis in hepatic stellate cells by modulating ROS production. **Parasit Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2019.
- Lawson, J.R. and Wilson, R. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilization. **Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 337-48, 1980.

- Layland, L.E., Rad, R., Wagner, H. and Da Costa, C.U.P. Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 8, p. 2174-84, 2007.
- LeibundGut-Landmann, S., Osorio, F., Brown, G.D. and Reis e Sousa, C. Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 4971-80, 2008.
- Levy, M., Shapiro, H., Thaiss, C.A. and Elinav, E. NLRP6: a multifaceted innate immune sensor. **Trends Immunol.**, v. 38, n. 4, p. 248-60, 2017.
- Li Hsü, S., Hsü, H., Davis, J. and Lust, G. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in livers of albino mice and rhesus monkeys. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 66, n. 1, p. 89-97, 1972.
- Lio, C.-W.J., McDonald, B., Takahashi, M., Dhanwani, R., Sharma, N., Huang, J., Pham, E., Benedict, C.A. and Sharma, S. cGAS-STING signaling regulates initial innate control of cytomegalovirus infection. **J. Virol.**, v. 90, n. 17, p. 7789-97, 2016.
- Liu, X., Zhang, Y.-R., Cai, C., Ni, X.-Q., Zhu, Q., Ren, J.-L., Chen, Y., Zhang, L.-S., Xue, C.-D. and Zhao, J. Taurine alleviates Schistosoma-induced liver injury by inhibiting the TXNIP/NLRP3 inflammasome signal pathway and pyroptosis. **Infect. Immun.**, v. 87, n. 12, 2019.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V.G., Wu, H. and Lieberman, J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 153-58, 2016.
- Liu, Y., Jesus, A.A., Marrero, B., Yang, D., Ramsey, S.E., Montealegre Sanchez, G.A., Tenbrock, K., Wittkowski, H., Jones, O.Y. and Kuehn, H.S. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. **New Engl. J. Med.**, v. 371, n. 6, p. 507-18, 2014.
- Liu, Y., Meyer, C., Müller, A., Herweck, F., Li, Q., Müllenbach, R., Mertens, P.R., Dooley, S. and Weng, H.-L. IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- $\beta$ -independent Smad signaling. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2814-23, 2011.
- LoVerde, P.T. Schistosomiasis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 1154, n., p. 45-70, 2019.
- LoVerde, P.T., Niles, E.G., Osman, A. and Wu, W. *Schistosoma mansoni* male-female interactions. **Can J Zool**, v. 82, n. 2, p. 357-74, 2004.
- Lu, Y.-Q., Zhong, S., Meng, N., Fan, Y.-P. and Tang, W.-X. NLRP3 inflammasome activation results in liver inflammation and fibrosis in mice infected with *Schistosoma japonicum* in a Syk-dependent manner. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- Luan, J. and Ju, D. Inflammasome: a double-edged sword in liver diseases. **Front Immunol**, v. 9, n., p. 2201, 2018.

- MacDonald, A.S. and Pearce, E.J. Cutting edge: polarized Th cell response induction by transferred antigen-pulsed dendritic cells is dependent on IL-4 or IL-12 production by recipient cells. **J Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3127-30, 2002.
- Maltez, V.I., Tubbs, A.L., Cook, K.D., Aachoui, Y., Falcone, E.L., Holland, S.M., Whitmire, J.K. and Miao, E.A. Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium. **Immunity**, v. 43, n. 5, p. 987-97, 2015.
- Mankan, A.K., Schmidt, T., Chauhan, D., Goldeck, M., Höning, K., Gaidt, M., Kubarenko, A.V., Andreeva, L., Hopfner, K.P. and Hornung, V. Cytosolic RNA: DNA hybrids activate the cGAS–STING axis. **EMBO J**, v. 33, n. 24, p. 2937-46, 2014.
- Markel, S.F., LoVerde, P.T. and Britt, E.M. Prolonged latent schistosomiasis. **JAMA**, v. 240, n. 16, p. 1746-47, 1978.
- Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . **Mol. Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, 2002.
- McKee, A.S. and Pearce, E.J. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol**, v. 173, n. 2, p. 1224-31, 2004.
- McManus, D.P., Dunne, D.W., Sacko, M. Schistosomiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, n. 13, 2018.
- McWilliam, H.E., Driguez, P., Piedrafita, D., Maupin, K.A., Haab, B.B., McManus, D.P. and Meeusen, E.N. The developing schistosome worms elicit distinct immune responses in different tissue regions. **Immunol. Cell Biol.**, v. 91, n. 7, p. 477-85, 2013.
- Mehta, R., Neupane, A., Wang, L., Goodman, Z., Baranova, A. and Younossi, Z.M. Expression of NALPs in adipose and the fibrotic progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese subjects. **BMC gastroenterol**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014.
- Meng, N., Xia, M., Lu, Y.-Q., Wang, M., Boini, K.M., Li, P.-L. and Tang, W.-X. Activation of NLRP3 inflammasomes in mouse hepatic stellate cells during *Schistosoma J.* infection. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 39316, 2016.
- Mentink-Kane, M.M., Cheever, A.W., Thompson, R.W., Hari, D.M., Kabatereine, N.B., Vennervald, B.J., Ouma, J.H., Mwatha, J.K., Jones, F.M. and Donaldson, D.D. IL-13 receptor  $\alpha$  2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 2, p. 586-90, 2004.
- Mócsai, A., Ruland, J. and Tybulewicz, V.L. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 6, p. 387-402, 2010.

- Montenegro, S.M., Miranda, P., Mahanty, S., Abath, F.G., Teixeira, K.M., Coutinho, E.M., Brinkman, J., Gonçalves, I., Domingues, L.A. and Domingues, A.L. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, v. 179, n. 6, p. 1502-14, 1999.
- Moore, D.L., Grove, D.I. and Warren, K.S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. **J. Pathol.**, v. 121, n. 1, p. 41-50, 1977.
- Motwani, M., Pesiridis, S. and Fitzgerald, K.A. DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease. **Nat Rev Genet**, v. 20, n. 11, p. 657-74, 2019.
- Otte, J.-M., Rosenberg, I.M. and Podolsky, D.K. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. **Gastroenterology**, v. 124, n. 7, p. 1866-78, 2003.
- Palacios-Macapagal, D., Connor, J., Mustelin, T., Ramalingam, T.R., Wynn, T.A. and Davidson, T.S. Cutting edge: eosinophils undergo caspase-1–mediated pyroptosis in response to necrotic liver cells. **J Immunol**, v. 199, n. 3, p. 847-53, 2017.
- Papamatheakis, D.G., Mocumbi, A.O.H., Kim, N.H. and Mandel, J. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. **Pulm Circ**, v. 4, n. 4, p. 596-611, 2014.
- Paveley, R.A., Aynsley, S.A., Turner, J.D., Bourke, C.D., Jenkins, S.J., Cook, P.C., Martinez-Pomares, L. and Mountford, A.P. The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN $\gamma$  production. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, n. 13-14, p. 1335-45, 2011.
- Pearce, E.J., Caspar, P., Grzych, J.-M., Lewis, F.A. and Sher, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, v. 173, n. 1, p. 159-66, 1991.
- Pearce, E.J. and MacDonald, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.
- Pestka, S., Krause, C.D. and Walter, M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunol. Rev.**, v. 202, n. 1, p. 8-32, 2004.
- Phillips, S.M., DiConza, J.J., Gold, J.A. and Reid, W.A. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse: I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. **J Immunol**, v. 118, n. 2, p. 594-99, 1977.
- Ponichtera, H.E., Shainheit, M.G., Liu, B.C., Raychowdhury, R., Larkin, B.M., Russo, J.M., Salantes, D.B., Lai, C.-Q., Parnell, L.D. and Yun, T.J. CD209a expression on dendritic cells is critical for the development of pathogenic Th17 cell responses in murine schistosomiasis. **J Immunol**, v. 192, n. 10, p. 4655-65, 2014.
- Radulovic, K., Ayata, C.K., Mak'Anyengo, R., Lechner, K., Wuggenig, P., Kaya, B., Hruz, P., de Agüero, M.G., Broz, P. and Weigmann, B. NLRP6 deficiency in CD4 T cells

- decreases T cell survival associated with increased cell death. **J Immunol**, v. 203, n. 2, p. 544-56, 2019.
- Rehm, J., Samokhvalov, A.V. and Shield, K.D. Global burden of alcoholic liver diseases. **J Hepatol**, v. 59, n. 1, p. 160-68, 2013.
- Ritter, M., Gross, O., Kays, S., Ruland, J., Nimmerjahn, F., Saijo, S., Tschopp, J., Layland, L.E. and da Costa, C.P. *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 47, p. 20459-64, 2010.
- Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L. and Brown, G.D. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. **Immunity**, v. 22, n. 4, p. 507-17, 2005.
- Ross, A.G., Bartley, P.B., Sleight, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M. and McManus, D.P. Schistosomiasis. **N Engl J Med**, v. 346, n. 16, p. 1212-20, 2002.
- Ross, A.G., Vickers, D., Olds, G.R., Shah, S.M. and McManus, D.P. Katayama syndrome. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 218-24, 2007.
- Rosselli, M., Lotersztajn, S., Vizzutti, F., Arena, U., Pinzani, M. and Marra, F. The metabolic syndrome and chronic liver disease. **Curr. Pharm. Des.**, v. 20, n. 31, p. 5010-24, 2014.
- Rothfuchs, A.G., Trumstedt, C., Mattei, F., Schiavoni, G., Hidmark, Å., Wigzell, H. and Rottenberg, M.E. STAT1 regulates IFN- $\alpha\beta$ - and IFN- $\gamma$ -dependent control of infection with *Chlamydia pneumoniae* by nonhemopoietic cells. **J Immunol**, v. 176, n. 11, p. 6982-90, 2006.
- Rumbley, C.A., Sugaya, H., Zekavat, S.A., El Refaei, M., Perrin, P.J. and Phillips, S.M. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **J Immunol**, v. 162, n. 2, p. 1003-09, 1999.
- Rutitzky, L.I. and Stadecker, M.J. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- $\gamma$ . **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 9, p. 2677-87, 2011.
- Sadler, C.H., Rutitzky, L.I., Stadecker, M.J. and Wilson, R.A. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 4, p. 880-88, 2003.
- Sanches, R.C., Souza, C., Marinho, F.V., Mambelli, F.S., Morais, S.B., Guimarães, E.S. and Oliveira, S.C. NLRP6 plays an important role in early hepatic immunopathology caused by *Schistosoma mansoni* infection. **Front Immunol**, v. 11, n., p. 795, 2020.
- Sanin, D.E., Prendergast, C.T., Bourke, C.D. and Mountford, A.P. Helminth infection and commensal microbiota drive early IL-10 production in the skin by CD4<sup>+</sup> T cells that are functionally suppressive. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 5, p. e1004841, 2015.

- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C.J., Müller, D.J., Broz, P. and Hiller, S. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. **EMBO J**, v. 35, n. 16, p. 1766-78, 2016.
- Seifert, L., Deutsch, M., Allothman, S., Alqunaibit, D., Werba, G., Pansari, M., Pergamo, M., Ochi, A., Torres-Hernandez, A. and Levie, E. Dectin-1 regulates hepatic fibrosis and hepatocarcinogenesis by suppressing TLR4 signaling pathways. **Cell Rep**, v. 13, n. 9, p. 1909-21, 2015.
- Seki, T., Kumagai, T., Kwansa-Bentum, B., Furushima-Shimogawara, R., Anyan, W.K., Miyazawa, Y., Iwakura, Y. and Ohta, N. Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 1, p. 159, 2012.
- Shaker, Y., Samy, N. and Ashour, E. Hepatobiliary schistosomiasis. **J Clin Transl Hepatol**, v. 2, n. 3, p. 212, 2014.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L. and Shao, F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 187-92, 2014.
- Silva, L.M., Fernandes, A.L., Barbosa Jr, A., Oliveira, I.R. and Andrade, Z.A. Significance of schistosomal granuloma modulation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 353-61, 2000.
- Simpson, A. Schistosome surface antigens: developmental expression and immunological function. **Parasitol. Today**, v. 6, n. 2, p. 40-45, 1990.
- Singh, K.P., Gerard, H.C., Hudson, A.P., Reddy, T.R. and Boros, D.L. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Immunology**, v. 114, n. 3, p. 410-17, 2005.
- Song, L.-G., Wu, X.-Y., Sacko, M. and Wu, Z.-D. History of schistosomiasis epidemiology, current status, and challenges in China: on the road to schistosomiasis elimination. **Parasitol. Res.**, v. 115, n. 11, p. 4071-81, 2016.
- Souza, A.L., Roffê, E., Pinho, V., Souza, D.G., Silva, A.F., Russo, R.C., Guabiraba, R., Pereira, C.A., Carvalho, F.M. and Barsante, M.M. Potential role of the chemokine macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  in human and experimental schistosomiasis. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 4, p. 2515-23, 2005.
- Souza, C., Sanches, R.C., Assis, N.R., Marinho, F.V., Mambelli, F.S., Morais, S.B., Gimenez, E.G., Guimarães, E.S., Castro, T.B. and Oliveira, S.C. The role of the adaptor molecule STING during *Schistosoma mansoni* infection. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.
- Stadecker, M.J., Asahi, H., Finger, E., Hernandez, H.J., Rutitzky, L.I. and Sun, J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, n. 1, p. 168-79, 2004.

- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M. and Utzinger, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 7, p. 411-25, 2006.
- Stirewalt, M. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Adv. Parasitol.**, v. 12, n., p. 115-82, 1974.
- Stirewalt, M., Cousin, C.E. and Dorsey, C.H. *Schistosoma mansoni*: stimulus and transformation of cercariae into schistosomules. **Exp. Parasitol.**, v. 56, n. 3, p. 358-68, 1983.
- Stirewalt, M.A. and Hackey, J.R. Penetration of host skin by cercariae of *Schistosoma mansoni*. I. Observed entry into skin of mouse, hamster, rat, monkey and man. **J Parasitol**, v. 42, n. 6, p. 565-80, 1956.
- Sturrock, R.F. The schistosomes and their intermediate hosts. In Schistosomiasis: **World Scientific**, pp. 7-83, 2001.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. and Chen, Z.J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 786-91, 2013.
- Sutterwala, F.S., Haasken, S. and Cassel, S.L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1319, n. 1, p. 82, 2014.
- Takaki, K.K., Rinaldi, G., Berriman, M., Pagán, A.J. and Ramakrishnan, L. *Schistosoma mansoni* eggs modulate the timing of granuloma formation to promote transmission. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 1, p. 58-67. e5, 2021.
- Takeda, K. and Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int. Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.
- Tan, X., Sun, L., Chen, J. and Chen, Z.J. Detection of microbial infections through innate immune sensing of nucleic acids. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 72, n., p. 447-78, 2018.
- Tang, J., Lin, G., Langdon, W.Y., Tao, L. and Zhang, J. Regulation of C-type lectin receptor-mediated antifungal immunity. **Front Immunol**, v. 9, n., p. 123, 2018.
- Taylor, J.J., Mohrs, M. and Pearce, E.J. Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Populatio. **J Immunol**, v. 176, n. 10, p. 5839-47, 2006.
- Trottein, F., Pavelka, N., Vizzardelli, C., Angeli, V., Zouain, C.S., Pelizzola, M., Capozzoli, M., Urbano, M., Capron, M. and Belardelli, F. A type I IFN-dependent pathway induced by *Schistosoma mansoni* eggs in mouse myeloid dendritic cells generates an inflammatory signature. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 3011-17, 2004.



- Tucker, M.S., Lewis, F.A., Driver, J.D. and Granath Jr, W.O. Determination and quantification of *Schistosoma mansoni* cercarial emergence from *Biomphalaria glabrata* snails. **J Parasitol**, v. 100, n. 6, p. 778-83, 2014.
- van de Veerdonk, F.L., Kullberg, B.J., van der Meer, J.W., Gow, N.A. and Netea, M.G. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 305-12, 2008.
- van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F., Kruize, Y.C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L. and Golenbock, D.T. A novel host-parasite lipid cross-talk: schistosomal lyso-phosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 50, p. 48122-29, 2002.
- van Liempt, E., van Vliet, S.J., Engering, A., Vallejo, J.J.G., Bank, C.M., Sanchez-Hernandez, M., van Kooyk, Y. and van Die, I. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. **Mol. Immunol.**, v. 44, n. 10, p. 2605-15, 2007.
- Vázquez-Mendoza, A., Carrero, J.C. and Rodriguez-Sosa, M. Parasitic infections: a role for C-type lectins receptors. **BioMed Res Int**, v. 2013, n., 2013.
- Wang, J., Xu, F., Zhu, D., Duan, Y., Chen, J., Sun, X., He, X., Li, P., Sun, W. and Feng, J. *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens facilitate hepatic stellate cell apoptosis by downregulating Akt expression and upregulating p53 and DR5 expression. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e3106, 2014.
- Wang, P., Zhu, S., Yang, L., Cui, S., Pan, W., Jackson, R., Zheng, Y., Rongvaux, A., Sun, Q. and Yang, G. Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. **Science**, v. 350, n. 6262, p. 826-30, 2015.
- Wassermann, R., Gulen, M.F., Sala, C., Perin, S.G., Lou, Y., Rybniker, J., Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Hornung, V. and Cole, S.T. Mycobacterium tuberculosis differentially activates cGAS-and inflammasome-dependent intracellular immune responses through ESX-1. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 6, p. 799-810, 2015.
- Webb, L.M., Lundie, R.J., Borger, J.G., Brown, S.L., Connor, L.M., Cartwright, A.N., Dougall, A.M., Wilbers, R.H., Cook, P.C. and Jackson-Jones, L.H. Type I interferon is required for T helper (Th) 2 induction by dendritic cells. **EMBO J**, v. 36, n. 16, p. 2404-18, 2017.
- Weerakoon, K.G., Gobert, G.N., Cai, P. and McManus, D.P. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 28, n. 4, p. 939, 2015.
- WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: World Health Organization/Unicef joint statement. **World Health Organization**, 2004.
- Wilkins, H., Goll, P., Marshall, T.d.C. and Moore, P. Dynamics of *Schistosoma haematobium* infection in a Gambian community. III. Acquisition and loss of infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 2, p. 227-32, 1984.

- Wilson, M.S., Mentink-Kane, M.M., Pesce, J.T., Ramalingam, T.R., Thompson, R. and Wynn, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, n. 2, p. 148-54, 2007.
- Wynn, T., Eltoun, I., Cheever, A., Lewis, F., Gause, W. and Sher, A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 151, n. 3, p. 1430-40, 1993.
- Xiao, J., Wang, F., Liang, E.C., So, K.-F. and Tipoe, G.L. Lycium barbarum polysaccharides improve hepatic injury through NF $\kappa$ -B and NLRP3/6 pathways in a methionine choline deficient diet steatohepatitis mouse model. **Int J Biol Macromol**, v. 120, n., p. 1480-89, 2018.
- Zakeri, A., Hansen, E.P., Andersen, S.D., Williams, A.R. and Nejsum, P. Immunomodulation by helminths: intracellular pathways and extracellular vesicles. **Front Immunol**, v. 9, n., p. 2349, 2018.
- Zamboni, D.S. and Sacks, D.L. Inflammasomes and Leishmania: in good times or bad, in sickness or in health. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 52, n., p. 70-76, 2019.
- Zhang, M., Gao, Y., Du, X., Zhang, D., Ji, M. and Wu, G. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 deficiencies exert differential in vivo effects against *Schistosoma japonicum*. **Parasite Immunol.**, v. 33, n. 4, p. 199-209, 2011.
- Zhang, W.-J., Fang, Z.-M. and Liu, W.-Q. NLRP3 inflammasome activation from Kupffer cells is involved in liver fibrosis of *Schistosoma japonicum*-infected mice via NF- $\kappa$ B. **Parasit Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2019.
- Zhang, Y., Chen, L., Gao, W., Hou, X., Gu, Y., Gui, L., Huang, D., Liu, M., Ren, C. and Wang, S. IL-17 neutralization significantly ameliorates hepatic granulomatous inflammation and liver damage in *S. schistosoma japonicum* infected mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 42, n. 6, p. 1523-35, 2012.
- Zhang, Y., Huang, D., Gao, W., Yan, J., Zhou, W., Hou, X., Liu, M., Ren, C., Wang, S. and Shen, J. Lack of IL-17 signaling decreases liver fibrosis in murine schistosomiasis japonica. **Int. Immunol.**, v. 27, n. 7, p. 317-25, 2015.
- Zhiyu, W., Wang, N., Wang, Q., Peng, C., Zhang, J., Liu, P., Ou, A., Zhong, S., Cordero, M.D. and Lin, Y. The inflammasome: an emerging therapeutic oncotarget for cancer prevention. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, p. 50766, 2016.
- Zhou, X., Murphy, F.R., Gehdu, N., Zhang, J., Iredale, J.P. and Benyon, R.C. Engagement of  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 23, p. 23996-4006, 2004.
- Zhu, Y., Ni, T., Deng, W., Lin, J., Zheng, L., Zhang, C. and Luo, M. Effects of NLRP6 on the proliferation and activation of human hepatic stellate cells. **Exp. Cell Res.**, v. 370, n. 2, p. 383-88, 2018.

## 9. ANEXO

### 9.1 Estudos publicados durante o período do doutorado

#### 2017-2021

Souza, C., **Sanches**, R.C.O, Assis, N.R., Marinho, F.V., Mambelli, F.S., Morais, S.B., Gimenez, E.G., Guimarães, E.S., Castro, T.B. and Oliveira, S.C. The role of the adaptor molecule STING during *Schistosoma mansoni* infection. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

Rios D. L., Costa S. de S., **Sanches** R. C. O., Camargos V. N., Moura C. da S. S., Andrade T. A., Carneiro P. G., Cassiano C. S. S., Marques W. R. A., & Silva P. C. L. da. Probióticos: como uma microbiota intestinal saudável ajuda a combater infecções respiratórias virais agudas, similares à covid-19. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 46, p. e3537, 2020.

**Sanches** RCO, Tiwari S, Ferreira LCG, Oliveira FM, Lopes MD, Passos MJF, Maia EHB, Taranto AG, Kato R, Azevedo VAC and Lopes DO. Immunoinformatics Design of Multi-Epitope Peptide-Based Vaccine Against *Schistosoma mansoni* Using Transmembrane Proteins as a Target. **Front Immunol**.12:621706, 2021.

### 9.2 Estudos principais gerados a partir da tese de doutorado

**Sanches**, R.C.O, Souza, C., Marinho, F.V., Mambelli, F.S., Morais, S.B., Guimarães, E.S. and Oliveira, S.C. NLRP6 plays an important role in early hepatic immunopathology caused by *Schistosoma mansoni* infection. **Front Immunol**, v. 11, n., p. 795, 2020.

**Sanches**, R.C.O, Souza, C. and Oliveira, S.C. Schistosoma antigens as activators of inflammasome pathway: from an unexpected stimulus to an intriguing role. **Microb. Infect.**, v., n., 2020.