

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

CD18 coordena o desenvolvimento de monócitos e a diferenciação em macrófagos  
alternativamente ativados conferindo resistência à infecção por  
*Schistosoma mansoni*

CAMILA DE OLIVEIRA SILVA E SOUZA

Ribeirão Preto

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

CD18 coordena o desenvolvimento de monócitos e a diferenciação em macrófagos  
alternativamente ativados conferindo resistência à infecção por  
*Schistosoma mansoni*

CAMILA DE OLIVEIRA SILVA E SOUZA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

**Área de Concentração:** Imunologia Básica e Aplicada

**Orientadora:** Prof. Dra. Lúcia Helena Faccioli

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).**

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Camila de Oliveira Silva

CD18 coordena o desenvolvimento de monócitos e a diferenciação em macrófagos alternativamente ativados conferindo resistência à infecção por *Schistosoma mansoni*. Ribeirão Preto, 2021.

114 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena

1. *Schistosoma mansoni*; 2. CD18; 3. Monócitos; 4. Macrófagos alternativamente ativados; 5. resistência.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome:** Camila de Oliveira Silva e Souza

**Título:** CD18 coordena o desenvolvimento de monócitos e a diferenciação em macrófagos alternativamente ativados conferindo resistência à infecção por *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

**Área de Concentração:** Imunologia Básica e Aplicada

**Orientadora:** Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Aprovado em:

### Banca examinadora

Prof (a). Dr (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Este trabalho foi realizado no laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP, sob coordenação da Profa. Dr. Lúcia Helena Faccioli, com o apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituição

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP):

Processo: nº 2018/22667-0 (BB – DR); 2014/07125-6 (AP – TEM); 2015/00658-1 (EMU)

- O presente trabalho foi realizado com o apoio Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq):

Processos: nº 302514/2015-5 e nº 303259/2020-5 (Bolsas de produtividade) ; nº 408093/2018-8 (CNPq – Universal)

- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP)

-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os educadores e professores que passaram pela minha vida, incluindo meus maiores exemplos, meu avô **Josué Pedroso** (Prof. de Biologia) e minha mãe **Glaucia de Oliveira Silva** (Profa. de Geografia).

Em especial dedico este trabalho a matriarca da família que sempre me incentivou, apoiou e dedicou seus esforços por nós, minha avó **Arlete de Oliveira Silva**.

## AGRADECIMENTOS

À Prof. **Dra. Lúcia Helena Faccioli** por abrir as portas do seu laboratório, orientação e confiança. Tenho muito orgulho da sua trajetória na ciência, principalmente como mulher, que mesmo frente as adversidades colocadas pelo sexo apostado, filhos e família, não enfraqueceu, mas buscou seguir a luta pela ciência. Muito obrigada por ser um exemplo de mulher cientista no Brasil e encabeçar nossas lutas.

Ao Prof. **Dr. Vanderlei Rodrigrez** e a **Sra. Olinda Mara** por nos auxiliarem e ensinarem os cuidados com o “*Schisto*”, sem vocês a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Prof. **Dr. Luiz Gardinassi** pela fiel colaboração em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada por todas as discussões científicas construtivas e esclarecedoras.

Aos meus colaboradores **Caroline Fontanari, Jefferson Elias-Oliveira, Marcella Pastore** por toda a ajuda durante os experimentos, são peças fundamentais e essenciais.

À **Fabiani Rosseto** e **Denize Ferraz** pelo auxílio com a aquisição dos dados de citometria, ensinamentos e a oportunidade de manipular o citometro de fluxo.

À **Elaine Floriano** pelo prestativo auxílio com as histologias.

Aos funcionários do biotérios pela manutenção e cuidado com os animais: **Ronaldo Araújo, Fabio Junior Marsola e Reinaldo Fernando Batista**.

Aos meus colegas do LIIP que tive a oportunidade de conviver durante esses anos: *Dra. Morgana Prado, Dr. Mouzarlem Barros, Dra. Priscilla Tartari, Dr. Alynne Galvão, Dra. Tanize Acunha, Ms. Luana Macedo, Ms. Jefferson-Elias, Ms. Marcella Pastore, Grazielle Gaia e Amanda Olive* muito obrigada por todas as conversas, risadas e desabafos. Obrigada por sempre mantermos o ambiente saudável e produtivo.

À **Prof. Dra. Fabiani Frantz** e todos os colegas de seu laboratório: *Ms. Ricardo Castro, Ms. Felipe Teixeira, Dr. Fabiana Zambuzi, Ms. Patrick Lima e Fabrícia* pela convivência, amizade e conversas.

À *Carolina Fontanari, Viviane Nardini e Amanda Trabuco* pelo prestativo apoio técnico.

Ao Prof. **Dr. João Santana Silva** que desde o mestrado acompanha minha jornada trazendo grandes ensinamentos. Muito obrigada por nossa amizade construída ao longo desses anos.

À **Ana Cristina** pelas conversas na porta do fundo do prédio central e puxões de orelha. Muito obrigada por esses bons momentos.

A todos os **professores e colegas** da pós-graduação, pela convivência durante os journal's club, reuniões, workshops, SBI's, churrascos da imuno, cursos de inverno, marcão, tocos...entre outros encontros, conversas, drinks e ciência. Aprendemos na pandemia o quão importante e valioso é nosso círculo social, muito obrigada pelo nosso.



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **minha querida família**: meus avós **Josué** e **Arlete**, minha mãe **Gláucia**, meus tios **Márcio** e **Cristiane**, e minhas primas **Maria Eduarda** e **Maria Fernanda**. Muito obrigada por todo apoio e por serem a certeza do meu porto seguro.

Ao meu querido namorado e companheiro da vida **Gustavo Gardinassi**, muito obrigada por todo amor, carinho, amizade e dedicação a nós. Sou muito feliz por dividir com você o nosso amor e a paixão pela ciência. Sou grata pela leve caminhada que seguimos juntos, lado a lado, ao longo desses anos.

A herdeira do meu amor "*Felício*": **Cacau**, muito obrigada por ser tão fofinha, lindinha e gordinha. É impossível não trabalhar fazendo um carinho. Muito obrigada por deixar meus dias de pandemia e a cabeça mais leves.

Aos meus queridos amigos que o universo fez questão de nos unir durante a pós-graduação: **Mika, Natalia, Tainara, Rafa, Luna e Rômulo**.

E aos meus amigos de longa data que levo comigo: **André e Amanda Scandelai**.

Lhes dedico um trecho de uma música que define nossa amizade e meu sentimento por vocês:

*“Quem tem um amigo tem tudo  
Se o poço devorar, ele busca no fundo  
É tão dez que junto todo stress é miúdo  
É um ponto pra escorar quando foi absurdo  
Quem tem um amigo tem tudo  
Se a bala come, mano, ele se põe de escudo  
Pronto pro que vier mesmo a qualquer segundo  
É um ombro pra chorar depois do fim do mundo  
O amigo é um mago do meigo abraço  
É mega afago, abrigo em laço  
Oásis nas piores fases quando some o chão e as bases  
Quando tudo vai pro espaço, é isso*

*Emicida (2019): Quem tem um amigo (tem tudo)*

## **AGRADECIMENTO À FAPESP**

*“A educação deve ser levada a sério porque ela transforma vidas, muda a realidade e faz nascer um novo mundo, fazendo o futuro parecer um lugar de esperança e transformação”*

O investimento em apoio financeiro permite o progresso da educação. Deste modo, gostaria de agradecer grandemente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por todo suporte financeiro dado a mim ao longo destes anos, no mestrado (2015/21605-3) e em especial durante meu doutorado (FAPESP 2018/22667-0).

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância”

Hipócrates (450 a.C.)

## RESUMO

**SOUZA, COS.** CD18 coordena o desenvolvimento de monócitos e a diferenciação em macrófagos alternativamente ativados conferindo resistência à infecção por *Schistosoma mansoni*. 2021. 114 fls. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

A esquistossomose é uma doença helmíntica negligenciada causada por vermes do gênero *Schistosoma spp.* Essa doença afeta principalmente comunidades pobres e rurais localizadas em regiões tropicais e subtropicais, levando a morte de ~240.000 pessoas todos os anos. Durante o ciclo biológico do parasita no hospedeiro mamífero, os esquistossômulos imaturos transitam pela vasculatura pulmonar até chegarem ao fígado onde amadurecem em vermes adultos e, posteriormente migram para as veias mesentéricas, acasalam e começam a deposição de ovos. A resposta inflamatória desencadeada durante este processo leva ao recrutamento de leucócitos que atuam pela destruição de um número significativo de cercárias no pulmão e, coordenam a formação do granuloma do tipo 2 ao redor dos ovos depositados no fígado, uma marca registrada da doença crônica. O tráfico de leucócitos para os tecidos afetados é dependente de quimiocinas e moléculas envolvidas na adesão celular. A subunidade funcional  $\beta_2$  integrina (CD18) é fundamental para a migração e função transendotelial de leucócitos. No entanto, o papel desempenhado pelo CD18 durante a esquistossomose experimental ainda não é claro. Procuramos resolver essa lacuna usando um modelo de camundongos que expressam baixos níveis de CD18 (*CD18<sup>low</sup>*), assemelhando-se, assim, a humanos com deficiência moderada de ITGB2. Deste modo, infectamos animais selvagens C57BL/6 (WT) e *CD18<sup>low</sup>* com cercárias de *S. mansoni* pela via subcutânea. A baixa expressão de CD18 levou a diminuição da taxa de sobrevivência dos animais, por aumentar a carga parasitaria, deposição de ovos nas fezes e o infiltrado inflamatório no fígado. A suscetibilidade observada nos animais *CD18<sup>low</sup>* foi correlacionada a falhas na monocitopoese na medula óssea. Em relação ao mecanismo molecular, CD18 afeta a transcrição de IRF8 e a expressão de CD115 na superfície dos progenitores de monócitos em proliferação (pMo), levando ao acúmulo destes progenitores e redução dos subtipos de monócitos maduros na medula óssea e no sangue periférico. No pulmão, os baixos níveis de CD18 afetaram o acúmulo de monócitos intermediários Ly6C<sup>inter</sup>, monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup>, macrófagos (MDMs) e células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos após uma semana de infecção. Na fase crônica da doença, a baixa expressão de CD18 diminuiu os monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low</sup>- CD11b<sup>+</sup> no fígado, e a transferência adotiva dessas células para animais os *CD18<sup>low</sup>* reverteu o infiltrado inflamatório e a fibrose. Sabe-se que monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> se diferenciam e polarizam em macrófagos ativados alternativamente (MAAs), os quais promovem o reparo tecidual. Seguindo essa hipótese, confirmamos que, a baixa expressão de CD18 afetou a expressão de *Il4*, *Chi3l3l* e *Arg1*, resultando na diminuição dos MAAs no fígado. Esses resultados se correlacionaram com a diminuição dos níveis de IL-10 no fígado. Em conclusão nossos dados mostram o papel crítico do CD18 no desenvolvimento de monócitos e na diferenciação em MAAs, que promove uma resposta eficiente do hospedeiro durante a esquistossomose experimental.

**PALAVRAS-CHEVES:** *Schistosoma mansoni*, CD18, monócitos, macrófagos alternativamente ativados, resistência.

## ABSTRACT

**SOUZA, COS.** CD18 coordinates monocyte development and differentiation into alternatively activated macrophages conferring resistance to *Schistosoma mansoni* infection. 2021. 114 fls. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Schistosomiasis is a neglected helminth disease caused by worms of the genus *Schistosoma spp.* The disease affects poor and rural communities localized in tropical and sub-tropical regions and causes ~240,000 fatal outcomes every year. During its development into mammalian hosts, immature schistosomula transit through the vasculature before they reach the liver, where they mature into adult worms and later migrate to mesenteric venues, mate, and begin egg deposition. The immune response during this process leads to the recruitment of leukocytes that act by destroying a significant number of cercariae in the lung and trigger a type 2 granuloma formation around the eggs in the liver, a hallmark of chronic disease. The trafficking of leukocytes to affected tissues depends on chemokines and molecules involved in cellular adhesion. The functional  $\beta 2$  integrin subunit (CD18) is a fundamental regulator of leukocyte trans-endothelial migration. However, the role played by CD18 during experimental schistosomiasis remains unclear. We sought to address this knowledge gap using a mouse model that expresses low levels of CD18 ( $CD18^{low}$ ), thus resembling humans with moderate ITGB2 deficiency. We infected wild-type C57BL/6 mice (WT) and  $CD18^{low}$  with cercariae of *S. mansoni* subcutaneously. Low CD18 expression leads to a decrease in the survival rate of these animals by increasing the parasite burden, eggs deposition in the feces and inflammatory infiltrated in the liver. The susceptibility observed in  $CD18^{low}$  mice was correlated to failures in monocytopoiesis in the bone marrow. Mechanistically, CD18 affects the IRF8-dependent CD115 expression on the proliferating monocyte progenitor (pMo), leading to the accumulation of these cells and consequent reduction of the mature monocyte subsets in the bone marrow and peripheral blood. In the lung, low levels of CD18 affected the accumulation of patrolling  $Ly6C^{low}$ , intermediate  $Ly6C^{inter}$  monocytes, monocyte-derived macrophages (MDMs) and dendritic cells (MDCs) after one week of infection. In the chronic phase of disease, low levels of CD18 decreased the inflammatory  $Ly6C^{high} CX_3CR1^{low/-} CD11b^+$  monocytes in the liver, and the adoptive transference of these cell to  $CD18^{low}$  mice ameliorates the inflammatory infiltrate and fibrosis. Inflammatory  $Ly6C^{high}$  monocytes differentiate and polarize in alternatively activated macrophages (AAMs), which promote tissue repair. Following this hypothesis, we confirmed that low levels of CD18 affected the expression of *Ii4*, *Chi3l3l* and *Arg1*, which decrease AAMs in the liver. This correlated with decreased IL-10 levels. In conclusion, our data point for a fundamental role of CD18 in monocytes development and differentiation into AAMs, which promotes an efficient host response during experimental schistosomiasis.

**KEYWORDS:** *Schistosoma mansoni*, CD18, monocyte, alternatively activated macrophages, resistance.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO DE VIDA DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> . .....	24
FIGURA 2. HEMATOPOESE DE CÉLULAS MIELÓIDES NA MEDULA ÓSSEA E BAÇO. ....	30
FIGURA 3. MONÓCITOS E MACRÓFAGOS EM RESPOSTA AO GRANULOMA DE <i>S. MANSONI</i> . .	32
FIGURA 4. ATIVAÇÃO DE INTEGRINAS. ....	36
FIGURA 5. ESTRATÉGIA PARA DETERMINAR OS ESTÁGIOS SEQUENCIAIS DE DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA. ....	47
FIGURA 6. ESTRATÉGIA PARA DETERMINAR OS SUBTIPOS DE MONÓCITOS LY6C NA MEDULA ÓSSEA, SANGUE PERIFÉRICO, PULMÃO E FÍGADO. ....	48
FIGURA 7. ESTRATÉGIA PARA DETERMINAR MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS E MONÓCITOS PATRULHEIROS, COM INCLUSÃO DE CX3CR1. ....	49
FIGURA 8. ESTRATÉGIA PARA DETERMINAR NEUTRÓFILOS. ....	49
FIGURA 9. ESTRATÉGIA PARA DETERMINAR MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS NO PULMÃO E FÍGADO. ....	50
FIGURA 10. ESTRATÉGIA PARA AVALIAR A-SUBUNIDADES DE INTEGRINAS EM MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS E MONÓCITOS PATRULHEIROS NO FÍGADO. ....	51
FIGURA 11. ESTRATÉGIA PARA ANÁLISE DE MACRÓFAGOS ALTERNATIVAMENTE ATIVADOS (MAAs) NO FÍGADO. ....	51
FIGURA 12. ESTRATÉGIA PARA DIFERENCIAÇÃO DE LEUCÓCITOS INTRAVASCULARES. ....	52
FIGURA 13. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 CONFERE SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> . ....	60
FIGURA 14. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 ESTÁ ASSOCIADA AO AUMENTO DE GRANULOMAS NO FÍGADO. ....	61
FIGURA 15. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 AFETA A HEMATOPOESE DE MONÓCITOS NOS PRIMEIROS DIAS DA INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> . ....	62
FIGURA 16. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 AFETA O PROGENITOR DE MONÓCITOS EM PROLIFERAÇÃO (PMo) NA MEDULA ÓSSEA APÓS 7 SEMANAS DE INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> . ....	65
FIGURA 17. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 DIMINUI O MFI DE Ki-67 NOS PROGENITORES DE MONÓCITOS APÓS 7 SEMANAS DE INFECÇÃO COM <i>S. MANSONI</i> . ....	66
FIGURA 18. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 AFETA A EXPRESSÃO DE IRF8 E CD115 NO PROGENITOR DE MONÓCITOS EM PROLIFERAÇÃO (PMo) DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA. ....	68

FIGURA 19. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 REDUZ OS MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS E MONÓCITOS PATRULHEIROS NO SANGUE PERIFÉRICO AO LONGO DA INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> .....	71
FIGURA 20. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 DIMINUI O ACUMULO DE MONÓCITOS PATRULHEIROS NOS PULMÕES DE ANIMAIS INFECTADOS COM <i>S. MANSONI</i> . ....	74
FIGURA 21. ANIMAIS CD18 <sup>LOW</sup> APRESENTAM REDUÇÃO NA FREQUÊNCIA DE MACRÓFAGOS (MDMs) E CÉLULAS DENDRÍTICAS (MDCs) DERIVADAS DE MONÓCITOS NOS PULMÕES DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE AGUDA. ....	76
FIGURA 22. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 NÃO ALTERA O ACUMULO DE MONÓCITOS, MACRÓFAGOS (MDMs) E CÉLULAS DENDRÍTICAS (MDCs) DERIVADAS DE MONÓCITOS NO PULMÃO APÓS 7 SEMANAS DE INFECÇÃO COM <i>S. MANSONI</i> . ....	77
FIGURA 23. CD18 É NECESSÁRIO PARA A PRODUÇÃO ADEQUADA DE CITOCINAS NOS PULMÕES DE ANIMAIS INFECTADOS COM <i>S. MANSONI</i> . ....	78
FIGURA 24. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 DIMINUI A PORCENTAGEM DE MONÓCITOS INTERMEDIÁRIOS LY6C <sup>INTER</sup> E MONÓCITOS PATRULHEIROS LY6C <sup>LOW</sup> NO FÍGADO APÓS 7 SEMANAS DE INFECÇÃO COM <i>S. MANSONI</i> . ....	79
FIGURA 25. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 PREJUDICA A SUBUNIDADE CD11B <sup>+</sup> EM MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS LY6C <sup>HIGH</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>LOW/-</sup> NO FÍGADO DE ANIMAIS INFECTADOS CRONICAMENTE COM <i>S. MANSONI</i> . ....	81
FIGURA 26. A TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS E MONÓCITOS PATRULHEIROS NÃO ALTERA OS PARÂMETROS PARASITOLÓGICOS DE ANIMAIS CD18 <sup>LOW</sup> INFECTADOS COM <i>S. MANSONI</i> . ....	82
FIGURA 27. A TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS DIMINUI O INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO FÍGADO DE ANIMAIS CD18 <sup>LOW</sup> INFECTADOS CRONICAMENTE COM <i>S. MANSONI</i> . ....	83
FIGURA 28. A TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS DIMINUI A FIBROSE HEPÁTICA DE ANIMAIS CD18 <sup>LOW</sup> APÓS 7 SEMANAS DE INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> . ...	84
FIGURA 29. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 NÃO AFETA O ACUMULO DE MACRÓFAGOS (MDMs) E CÉLULAS DENDRÍTICAS (MDCs) DERIVADAS DE MONÓCITOS NO FÍGADO APÓS 7 SEMANAS DE INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> . ....	85
FIGURA 30. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 DIMINUI OS MACRÓFAGOS ALTERNATIVAMENTE ATIVADOS (MAAs) NO FÍGADO APÓS 7 SEMANAS DE INFECÇÃO COM <i>S. MANSONI</i> . ....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE PROGENITORES DE MONÓCITOS E MONÓCITOS MADUROS NA MEDULA ÓSSEA.....	47
<b>TABELA 2.</b> CLASSIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS DE MONÓCITOS PELA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE LY6C.....	48
<b>TABELA 3.</b> MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS E MONÓCITOS PATRULHEIROS, COM INCLUSÃO DE CX <sub>3</sub> CR1.....	48
<b>TABELA 4.</b> MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE NEUTRÓFILOS.....	49
<b>TABELA 5.</b> MARCADORES DE SUPERFÍCIES DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS.....	49
<b>TABELA 6.</b> MARCADORES DE SUPERFÍCIE PARA CLASSIFICAÇÃO DE SUBTIPOS DE MONÓCITOS, COM INCLUSÃO DAS A-SUBUNIDADES DE INTEGRINAS.....	50
<b>TABELA 7.</b> MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS ALTERNATIVAMENTE ATIVADOS (MAAs).....	51
<b>TABELA 8.</b> SEQUÊNCIA DE INICIADORES (PRIMERS) MURINOS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE qPCR.....	55



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADCC** – *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*
- Arg1** – Arginase 1
- CCL2** – *Chemokine C-C motif ligand 2*
- CCR2** – *C-C chemokine receptor type 2*
- CD** – *Cluster of differentiation*
- CD18<sup>HYP</sup>** – camundongos hipomórfico para CD18
- CD18<sup>low</sup>** – camundongos com baixa expressão de CD18
- Chi3l3** – *Chitinase-like protein 3*
- cMoP** – *common monocyte progenitor*
- CMP** – *common myeloid progenitor*
- CR4** – *complement receptor 4*
- CSFR1** – *Colony stimulating factor 1 receptor*
- CX3CR1** – *CX3C chemokine receptor 1*
- DCs** – *dendritic cells*
- FcεRI** – *High-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E*
- FSC-A** – *forward scatter area*
- FSC-H** – *forward scatter height*
- GMP** – *granulocyte-monocyte progenitor*
- HSCs** – *Hematopoietic stem cells*
- ICAM** – *Intracellular Adhesion Molecule 1*
- IFN-γ** – *Interferon gamma*
- IL** – interleucina
- IL-4Rα** – receptor da interleucina – 4
- IL13Rα2** – receptor da interleucina 13 subunidade alpha 2
- ILC2** – *Group 2 innate lymphoid cells*
- IRF8** – *Interferon regulatory factor 8*
- KLF4** – *Krüppel-like factor 4*
- LAD** – Deficiência de adesão leucocitária
- LDL** – *low density lipoprotein*
- LFA-1** – *Lymphocyte function-associated antigen 1*
- LPC** – lisofosfatidilcolina
- LsyM<sup>cre</sup>Arg<sup>flox</sup>** – camundongos Arginase -1 deficientes em células mielóides.

**Ly6C** – *Lymphocyte antigen 6 complex*

**LysM<sup>cre</sup>IL-4R $\alpha$ <sup>flox</sup>** – camundongos deficientes do receptor de IL-4 em células mielóides

**M1** - macrófagos ativados classicamente

**MAAs** – macrófagos alternativamente ativados

**MAC-1** – *Macrophage 1 Antigen*

**MDCs** – *monocyte derived dendritic cells*

**MDMs** – *monocyte derived macrophages*

**MDP** – *monocyte-dendritic cells progenitor*

**MFI** – *Mean Fluorescent Intensity*

**MIF** – *Macrophage Migration Inhibitory Factor*

**MIP-1 $\alpha$**  – *Macrophage inflammatory protein-1 alpha*

**MMP** – metaloproteinases

**mRNA** – RNA mensageiro

**NR4A1** – *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1*

**PCR** – Reação em cadeia de polimerase

**PD-L2** – Programmed death-ligand 2

**pMo** – *proliferating monocytes*

**PPAR- $\gamma$**  – *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

**Raldh** – retinaldeído desidrogenase

**Relma** – *Resistin-like alpha*

**sdLN** – *skin draining lymph node*

**SEA** – antígeno solúvel de ovo

**SjCL3** – Catepsina L3 de *S. japonicum*

**Sm-p80** – Calpaína de *S. mansoni*

**SSC-A** – *Side scatter area*

**STAT6** - *Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6*

**t-SNE** – *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*

**TGF- $\beta$**  – fator de crescimento transformante beta

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alpha

**TSLP** – Thymic stromal lymphopoietin

**$\beta 2^{-/-}$**  - camundongos deficientes totais de  $\beta 2$  integrina

## Sumário

<b>1.1. ESQUISTOSSOMOSE</b> .....	23
1.1.1. <i>Ciclo biológico exemplificado pelo S. mansoni</i> .....	24
<b>1.2. RESPOSTA IMUNE DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE</b> .....	25
1.1.2. <i>Origem e função dos monócitos durante a esquistossomose</i> .....	28
1.1.1.2. <i>Macrófagos alternativamente ativados durante a esquistossomose</i> ....	32
<b>1.3. INTEGRINAS</b> .....	35
1.1.3. <i>Integrinas <math>\beta_2</math></i> .....	36
1.1.1.3. <i>Impacto do CD18 durante a hematopoese</i> .....	37
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
2.1. JUSTIFICATIVA .....	40
2.2. OBJETIVO GERAL.....	40
2.1.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	40
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	43
3.2. MANUTENÇÃO DO <i>S. MANSONI</i> E INFECÇÃO EXPERIMENTAL .....	43
3.3. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA, VIABILIDADE INTESTINAL DO OVO E QUANTIFICAÇÃO DE OVOS FECAIS. ....	44
3.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	44
3.5. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS .....	45
3.1.5. <i>Medula óssea</i> .....	45
3.2.5. <i>Sangue Periférico</i> .....	45
3.3.5. <i>Pulmão</i> .....	45
3.4.5. <i>Fígado</i> .....	45
3.6. CITOMETRIA DE FLUXO .....	46
3.1.6. <i>Marcação extracelular</i> .....	46
3.2.6. <i>Marcação intravascular</i> .....	52
3.7. SELEÇÃO DE CÉLULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS-CELL SORTING).....	52
3.1.7. <i>Seleção de progenitor de monócito em proliferação (pMo) e monócitos inflamatórios (IM):</i> .....	52
3.2.7. <i>Seleção de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros da medula óssea de animais CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/+</sup></i> .....	53

3.8.	TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE MONÓCITOS .....	53
3.9.	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL .....	53
3.10.	SÍNTESE DE CDNA .....	54
3.11.	REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR) .....	54
3.12.	OBTENÇÃO DO HOMOGENATO DE PULMÃO E FÍGADO .....	55
	3.1.12. <i>Dosagens de citocinas por ELISA</i> .....	56
3.13.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	56
4.	RESULTADOS.....	59
4.1.	CD18 CONFERE RESISTÊNCIA À INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>S. MANSONI</i> .....	59
4.2.	A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 RESULTA NO AUMENTO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NO FÍGADO APÓS A INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> .....	61
4.3.	A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 DIMINUI OS SUBTIPOS DE MONÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA NOS MOMENTOS INICIAIS DA INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> .....	62
4.4.	A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 LEVA AO ACÚMULO DO PROGENITOR DE MONÓCITOS EM PROLIFERAÇÃO (PMo) NA MEDULA ÓSSEA DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA.....	63
4.5.	A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 DIMINUI A PROLIFERAÇÃO DOS PROGENITORES DE MONÓCITOS DURANTE A INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>S. MANSONI</i> .....	66
4.6.	CD18 CONTROLA A EXPRESSÃO DE IRF8 E CD115 NO PROGENITOR DE MONÓCITOS EM PROLIFERAÇÃO (PMo) DURANTE A INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>S. MANSONI</i> . 67	
4.7.	A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 REDUZ OS SUBTIPOS DE MONÓCITOS NA CIRCULAÇÃO DURANTE À INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i> .....	69
4.8.	A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 DIMINUI OS MONÓCITOS PATRULHEIROS NO PULMÃO DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE AGUDA.....	72
4.9.	A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 REDUZ MACRÓFAGOS (MDMs) E CÉLULAS DENDRÍTICAS (MDCs) DERIVADAS DE MONÓCITOS NO PULMÃO APÓS A INFECÇÃO POR <i>S.</i> <i>MANSONI</i> . .....	75
4.10.	A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 NÃO PREJUDICA O RECRUTAMENTO DE MONÓCITOS E A DIFERENCIAÇÃO EM MACRÓFAGOS (MDMs) E CÉLULAS DENDRÍTICAS (MDCs) DERIVADAS DE MONÓCITOS NOS PULMÕES DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA. ..	76
4.11.	CD18 REGULA A PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS PULMÕES DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE.....	78

<b>4.12. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 DIMINUI OS MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS LY6C<sup>HIGH</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>LOW/-</sup> CD11B<sup>+</sup> NO FÍGADO DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA.</b>	<b>79</b>
<b>4.13. A TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS LY6C<sup>HIGH</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>LOW/-</sup> REVERTE O DANO HEPÁTICO DE ANIMAIS CD18<sup>LOW</sup> INFECTADOS CRONICAMENTE COM <i>S. MANSONI</i>.</b>	<b>82</b>
<b>4.14. A BAIXA EXPRESSÃO DE CD18 REDUZ OS MACRÓFAGOS ALTERNATIVAMENTE ATIVADOS NO FÍGADO DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA.</b>	<b>85</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>89</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>95</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>97</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO I – APROVAÇÃO CEUA</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO II – APROVAÇÃO CEUA</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO II – SISGEN</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO IV – LISTA DE PUBLICAÇÕES</b>	<b>112</b>
<i>Artigos publicados durante o doutorado relacionados à tese</i>	<i>112</i>
<i>Artigos publicados durante o doutorado não relacionados à tese</i>	<i>112</i>
<b>ANEXO V – PRÊMIOS ASSOCIADOS A ESSA TESE</b>	<b>114</b>

# *1. Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Esquistossomose

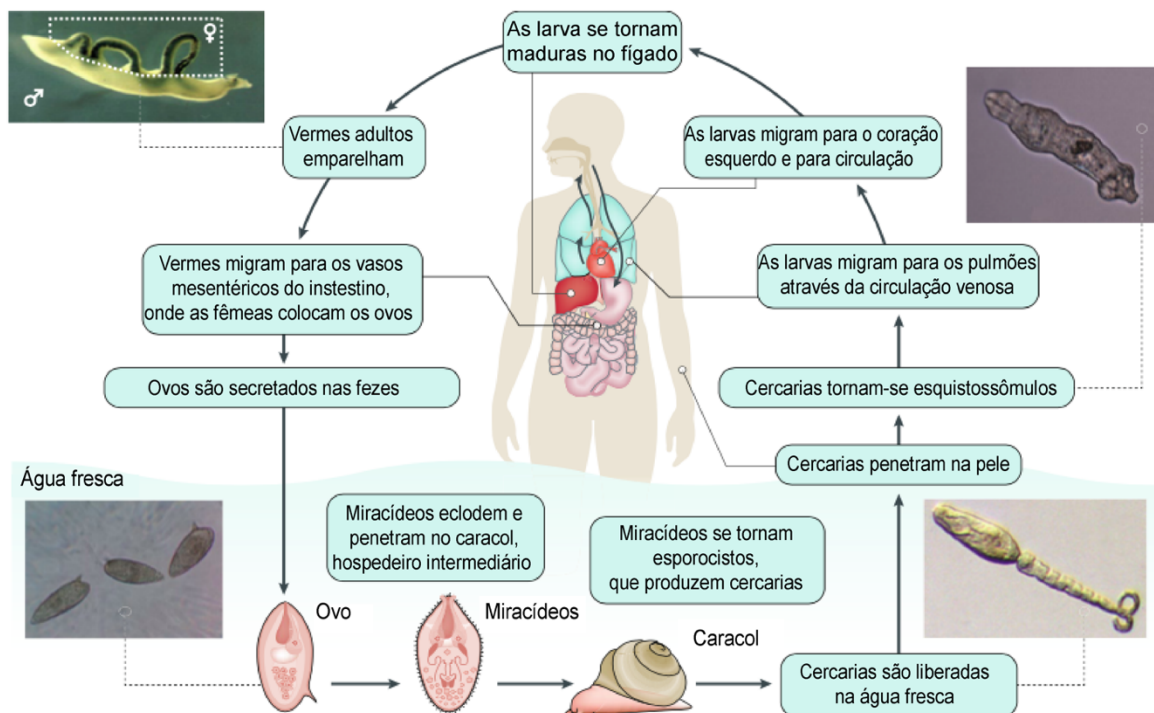
Durante uma expedição para o Egito em 1852, o médico alemão Theodor Bilharz realizou autópsias em múmias, nas quais encontrou vermes trematódeos sanguíneos na parede da bexiga e nas veias mesentéricas (JORDAN, 2000). Por essa razão o nome inicial da doença causada por estes vermes foi denominada de “bilharzia”, mas que atualmente é conhecida como esquistossomose (JORDAN, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002).

A esquistossomose é uma doença helmíntica negligenciada causada por vermes do gênero *Schistosoma spp*, com prevalência em países localizados nas regiões tropicais e subtropicais (PEARCE; MACDONALD, 2002; MCMANUS et al., 2018). As três principais espécies que infectam os humanos são: *S. mansoni* (África e América do Sul) e *S. japonicum* (Leste Asiático), que promovem fibrose no fígado e intestino; e *S. haematobium* (África e Oriente Médio), que desencadeia manifestações urogenitais.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a esquistossomose leva a morte de cerca de 240 mil pessoas todos os anos ao redor do mundo, sendo que mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, configurando-se como um grave problema de saúde pública que está intimamente relacionado com condições de pobreza e desvantagens sociais dos indivíduos afetados (“Schistosomiasis (Bilharzia)”, [s.d.]). No Brasil, entre os anos de 2000 – 2011 foram registrados 12.491.280 óbitos, sendo 8.756 relacionados à esquistossomose (MARTINS-MELO et al., 2014). Alagoas (1.48/100.000 habitantes), Pernambuco (1.20/100.000 habitantes) e Sergipe (0.61/100.000 habitantes) são os estados brasileiros com as maiores médias de mortalidade por essa doença (NASCIMENTO et al., 2019). Em 2015 no Brasil, os gastos totais relacionados com a esquistossomose e suas decorrências, somaram cerca de US\$ 41,7 milhões dólares (NASCIMENTO et al., 2019).

### 1.1.1. Ciclo biológico exemplificado pelo *S. mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni* inicia-se após o contato do hospedeiro vertebrado (o homem) com a forma infectante, a cercária, a qual emerge em resposta à luz solar do caramujo do gênero *Biomphalaria spp*, comumente encontrado em águas doces e limpas. Após a penetração das cercárias através da pele do hospedeiro, estas perdem sua cauda e se diferenciam em larvas denominadas esquistossômulos (COLLINS et al., 2011), que permanecem na pele por pelo menos 2 dias, antes de migrarem através da corrente sanguínea, para os pulmões, com pico entre 3 e 7 dias após a infecção (WILSON, 2009). Posteriormente, as larvas passam pela vasculatura pulmonar e ventrículo esquerdo do coração, chegam ao sistema porta-hepático onde permanecem até atingirem a maturidade sexual, quando então emparelham-se e migram para as vênulas mesentéricas, dando início ao acasalamento e a deposição de ovos que atravessam a mucosa intestinal e são eliminados nas fezes (~ 6 - 7 semanas após a infecção). Os ovos no meio ambiente eclodem em contato com a água liberando miracídeos, que penetram o caramujo, hospedeiro intermediário, onde se desenvolvem em esporocistos que produzem as cercárias (reprodução assexuada), fechando o ciclo (NATION et al., 2020) **Figura 1.**



**Figura 1. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.**

O ciclo de vida do *S. mansoni* envolve hospedeiro intermediário (caracol) e hospedeiro definitivo (vertebrado/homem). Os ovos eliminados nas fezes pelo hospedeiro vertebrado



eclodem ao entrar em contato com a água, liberando os miracídios, que penetram os caracóis do gênero *Biomphalaria spp.* Dentro do caracol, os miracídios se desenvolvem em esporocistos e produzem grandes números de cercárias (~ 30 dias), que em resposta à luz solar saem do caracol, nadam até encontrarem o hospedeiro humano/vertebrado e penetram pela pele. Na pele, as caudas da cercária caem originando os esquistossômulos que migram pelos vasos sanguíneos até atingirem o pulmão e coração direito, antes de chegarem ao coração esquerdo, de onde entram na circulação arterial. Ao chegarem no sistema porta-hepático, os esquistossômulos migram para as veias mesentéricas do fígado, amadurecem e se tornam vermes adultos machos ou fêmeas. O verme macho acopla-se na fêmea e migram para as veias mesentéricas do intestino, acasalam-se, e as fêmeas liberam os ovos. Os ovos liberados na circulação, passam pela parede intestinal e são excretados nas fezes, dando continuidade ao ciclo. Adaptado de (MCMANUS et al., 2018)

## 1.2. Resposta imune durante a esquistossomose

A infecção por *Schistosoma spp.* induz resposta imune celular e humoral (WILSON et al., 2007), sendo que o hospedeiro vertebrado pode apresentar particularidades na resposta durante as diferentes fases da migração e estabelecimento do parasita. A reação inflamatória, ocasionada nos momentos iniciais é caracterizada pelo edema e influxo de neutrófilos (PAVELEY et al., 2009), bem como a ativação de macrófagos residentes, células de Langerhans (KUMKATE et al., 2007) e células dendríticas (DCs) (WINKEL et al., 2018), que destroem número significativo de cercárias e esquistossômulos na pele, denominada dermatite cercária (SCHWARTZ; ROZENMAN, 2002).

Após a ativação por cercárias de *S. mansoni*, macrófagos residentes liberam IL-10, enquanto que as DCs produzem IL-6, IL-12p40 e TNF- $\alpha$ , que contribuem para a ativação das respostas imune adaptativas nos linfonodos drenantes da pele (do inglês: *skin draining lymph node* - sdLN) (MOUNTFORD; TROTTEIN, 2004; PAVELEY et al., 2009). Assim, as DCs aumentam a expressão de HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e PD-L2, aumentando a interação com as células T e coordenando a polarização para o perfil Th2 (WINKEL et al., 2018). Além disso, os antígenos das cercárias são internalizados por macrófagos induzindo as respostas de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-4<sup>+</sup> (T CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup>) nos sdLN.

As cercárias que se transformam em esquistossômulos migram pela pele e entram na circulação (SCHWARTZ; HAMS; FALLON, 2018). Mecanismos efetores são ativados para matar os esquistossômulos em migração, sendo o microambiente pulmonar um local eficaz para a eliminação das larvas, resultando na denominada pneumonite esquistossomótica aguda (SCHWARTZ; ROZENMAN, 2002).

Macrófagos e eosinófilos que expressam FcεRI reconhecem IgE e induzem a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (do inglês: *Antibody-dependent cellular cytotoxicity* - ADCC) em resposta as larvas de *S. mansoni* (DOMBROWICZ et al., 2000). Curiosamente, a imunização com antígeno Sm-p80 (*S. mansoni*) induz ADCC eficaz no pulmão durante a migração das larvas (TORBEN et al., 2012), enquanto SjCL3 (*S. japonicum*) suprime a ADCC, evitando uma resposta exacerbada do hospedeiro (HUANG et al., 2020). Além disso, as células imunes presentes no pulmão interagem com os produtos excretórios e secretórios dos esquistossômulos resultando na produção das citocinas TNF-α, IL-12, IL-6 e IL-1β, as quais induzem a resposta imune inicial mediada por linfócitos do tipo Th1 e produção de IFN-γ (DE JESUS et al., 2002; DEAN; MANGOLD, 1992; EL RIDI; TALLIMA, 2009).

Os esquistossômulos sobreviventes que escapam da resposta imune inicial continuam o seu ciclo biológico, transformando-se em vermes adultos no fígado, intestino e bexiga, fazendo com que o hospedeiro se adapte a carga de vermes e deposição de ovos (WILSON, 2009; NATION et al., 2020). Assim, quando os ovos são produzidos, o perfil de citocinas muda drasticamente, sendo a fase crônica da doença caracterizada por altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 que induzem a resposta granulomatosa do tipo 2 (PEARCE; MACDONALD, 2002).

O balanço das respostas Th1 e Th2 ao longo da esquistossomose determina o desfecho clínico da doença (PEARCE; MACDONALD, 2002; SCHWARTZ; ROZENMAN, 2002; MCMANUS et al., 2018). Sabe-se que animais deficientes de IL-4, quando infectados com *S. mansoni* produzem altos níveis de IFN-γ e TNF-α levando a doença grave e fatal (PATTON et al., 2001). Por outro lado, camundongos deficientes para IFN-γ exibem granulomas com tamanho reduzido, associados ao desenvolvimento precoce da fase crônica, sugerindo que o IFN-γ é importante para a formação dos granulomas. Entretanto, a produção excessiva de IFN-γ pode ocasionar o dano hepático durante a esquistossomose (REZENDE et al., 1997). Portanto, uma adequada ativação e regulação refinada da resposta imune está associada a desfechos favoráveis na infecção por *S. mansoni*.

A promoção e magnitude da resposta imune mediada por linfócitos T é induzida e auxiliada por células do sistema imune inato (PEARCE; MACDONALD, 2002). Assim, a inflamação hepática durante a esquistossomose inicia-se com o recrutamento de células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup> e células B CD19<sup>+</sup>, enquanto que eosinófilos, neutrófilos e macrófagos F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> aumentam durante a fase crônica

da doença e maturação do granuloma (BURKE et al., 2010). Curiosamente, o granuloma induzido durante a infecção pelo *S. mansoni* é caracterizado pela presença de eosinófilos, monócitos e macrófagos (SCHWARTZ; FALLON, 2018), enquanto que os granulomas de *S. haematobium* (FU et al., 2012) e *S. japonicum* (SCHWARTZ; FALLON, 2018) possuem predominância de células CD68<sup>+</sup> (macrófagos sinciciais) e neutrófilos, respectivamente. Sabe-se que o pico de deposição de colágeno se correlaciona com o aumento de MIP-1 $\alpha$ , CXCL1 (FU et al., 2012) e influxo das células imune inatas para o granuloma hepático (BURKE et al., 2010). Lipídeos derivados do *S. mansoni*, são capazes de ativar eosinófilos via TLR2 (MAGALHÃES et al., 2010), promovendo a liberação de metaloproteinases (MMP), histamina e colagenases que contribuem para o remodelamento tecidual e formação do granuloma (ARIYARATNE; FINNEY, 2019), enquanto que o fator inibidor da migração de macrófagos (do inglês: *Macrophage Migration Inhibitory Factor*- MIF) aumenta IL-5 e eosinófilos (MAGALHÃES et al., 2009). Sabe-se ainda que os ovos de *S. japonicum* induzem armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), MMP9, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , CCL3 e CXCL2, que precede a formação do granuloma (CHUAH et al., 2014).

O dano tecidual causado durante a esquistossomose leva a liberação de IL-33 (PENG et al., 2016; LI et al., 2019), TSLP e IL-25 (alarminas) (COOK et al., 2011; VANNELLA et al., 2016). Na infecção por *S. japonicum*, o aumento da expressão gênica de *Il33* está correlacionado ao aumento séricos da proteína transglutaminase (tTG) tecidual (LI et al., 2019). A liberação de IL-33 promove o desenvolvimento de células Th2 CD4<sup>+</sup>IL-5<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>L-10<sup>+</sup>; e CD4<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> (YU; DENG; LEI, 2015). Além disso, o número de macrófagos que expressam o receptor da IL-33 (ST2L) é maior quando comparado aos de células T CD3<sup>+</sup> ST2L<sup>+</sup> após a infecção por *S. japonicum* (PENG et al., 2016). Animais deficientes para o receptor ST2 são mais susceptíveis à infecção por *S. mansoni* (MAGGI et al., 2021). No entanto, a fibrose hepática induzida pelo *S. mansoni* não é afetada pela falta da sinalização de TSLP, IL-25 (VANNELLA et al., 2016) e IL-33 (MUKENDI et al., 2021) individualmente, mas a interrupção da sinalização por todos os três mediadores reduz eosinófilos, células linfoides inatas (ILC) – 2 e a fibrose em camundongos infectados (VANNELLA et al., 2016). Em comparação com células T CD4<sup>+</sup>, as ILC2s produzem altos níveis de IL-13, mas não IL-4, enquanto IL-25 desencadeia fibrose mediada por ILC2 IL-13<sup>+</sup> no pulmão após injeção de ovos de *Schistosoma* (HAMS et al., 2014).

A sinalização de IL-4 e IL-13 tem sido associada com a gravidade da esquistossomose (HERBERT et al., 2004; ADEDOKUN et al., 2018; MUTENGO et al., 2018). De fato, a progressão da esquistossomose e o dano hepático estão correlacionados com o aumento de IL-13 em pacientes (MUTENGO et al., 2018). Polimorfismos no gene promotor de IL-4 e STAT6 estão associados a maior susceptibilidade de crianças infectadas com *S. haematobium* (ADEDOKUN et al., 2018). Além disso, a sinalização via IL-4R $\alpha$  favorece o desenvolvimento de granulomas e induz fibrose na bexiga após a injeção de ovos de *S. haematobium* (MBANEFO et al., 2020). Curiosamente, lipídeos derivados da 5-lipoxigenase induzem o aumento de IL-4 e IL-13 que controlam o tamanho do granuloma após a injeção de ovos de *S. mansoni* (TOFFOLI DA SILVA et al., 2016). A infecção por *S. japonicum* regula positivamente a via de sinalização de IL-4 e IL-13 no fígado de camundongos infectados, que inclui genes relacionados com o remodelamento da matriz extracelular, como *Mmp2* e *Mmp9* (SOUZA et al., 2020). A ausência da sinalização de IL-4R $\alpha$  em células B afeta o recrutamento de monócitos (YONG et al., 2019) e o desenvolvimento das repostas Th2 resultando em susceptibilidade a infecção por *S. mansoni* (HURDAYAL et al., 2017). No entanto, o influxo de monócitos sanguíneos e sua conversão em macrófagos ocorre independentemente da sinalização via IL-4R $\alpha$  durante a infecção por *S. mansoni* (ROLOT et al., 2019). Monócitos e macrófagos exercem papéis importantes durante a formação do granuloma e regulação da resposta imune durante a esquistossomose (SCHWARTZ; ROZENMAN, 2002; MCMANUS et al., 2018; ROLOT; DEWALS, 2018; SOUZA et al., 2020), sendo que os altos níveis de IL-4 e IL-13 afetam o fenótipo e funcionalidade destas células (GORDON, 2003; HERBERT et al., 2004; GORDON; MARTINEZ, 2010).

### 1.1.2. Origem e função dos monócitos durante a esquistossomose

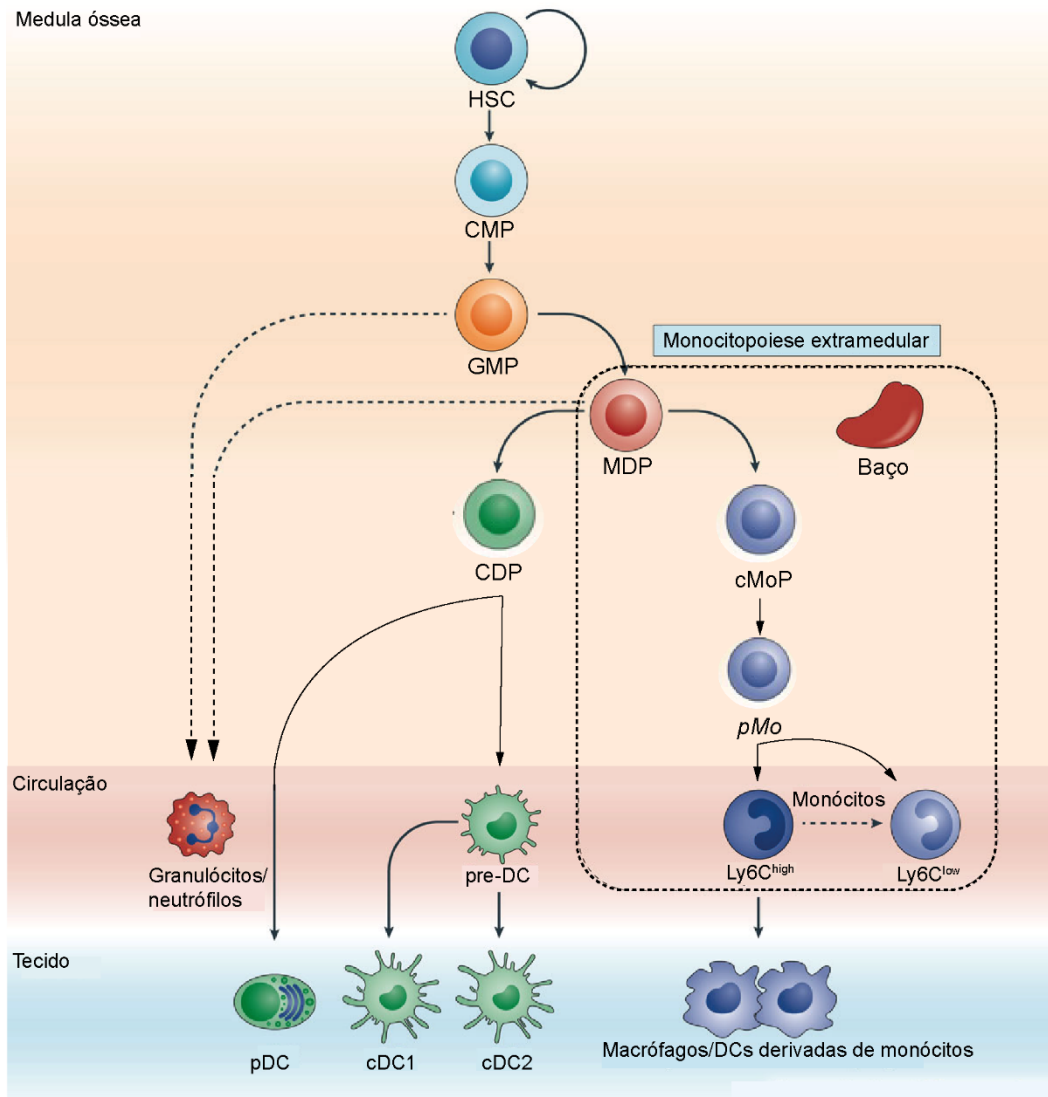
Os monócitos exercem papéis cruciais durante a homeostase, defesa do hospedeiro, desenvolvimento da resposta imune, resolução da inflamação, cicatrização e no reparo tecidual (HUME; IRVINE; PRIDANS, 2019). Os monócitos são uma população de leucócitos conservada evolutivamente e presente em todos os vertebrados, podendo ter sua origem durante o desenvolvimento do fígado fetal (em camundongos nos dias da embriogênese E11.5 e E12.5), colonizando diversos

órgãos, e se diferenciam em populações macrófagos residentes, como macrófagos alveolares no pulmão e células de Kupffer no fígado (ZHAO et al., 2018b). Após o nascimento, os monócitos circulantes são oriundos de células-tronco hematopoiéticas (do inglês: Hematopoietic Stem Cells – HSCs) (HETTINGER et al., 2013; YÁÑEZ et al., 2017), e seu desenvolvimento ocorre por meio de estágios sequenciais de diferenciação: progenitor mielóide comum (do inglês: common myeloid progenitor – CMP), progenitor monócito-granulócito (do inglês: granulocyte-monocyte progenitor – GMP), progenitor comum monócito-DC (do inglês: monocyte-dendritic cells progenitor – MDP), progenitor comum de monócito (do inglês: common monocyte progenitor - cMoP) e por fim, monócitos em proliferação (do inglês: proliferating monocytes - pMo), que se transformam em subtipos distintos de monócitos maduros na medula óssea e no baço (hematopoese extramedular) **Figura 2** (HETTINGER et al., 2013). Os monócitos maduros representam cerca de 4% em camundongos e 10% em humanos dos leucócitos totais circulantes durante a homeostase (KAWAMURA; OHTEKI, 2018).

Quando maduros, os monócitos são classificados como: monócitos inflamatórios (clássico) (camundongo: Ly6C<sup>high</sup> CCR2<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup>; humano CD14<sup>high</sup> CD16<sup>-</sup>), que são abundantemente recrutados para locais de inflamação (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003), mas retornam à medula óssea após 3 dias sob estado estacionário (VAROL et al., 2007); e os monócitos patrulheiros (não clássicos) (camundongo: Ly6C<sup>low</sup> CCR2<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup>; humano CD14<sup>low/-</sup> CD16<sup>high</sup>), que patrulham os vasos sanguíneos e permanecem na circulação por até 7 dias (AUFRAY et al., 2007). A manutenção e sobrevivência destas populações de monócitos são dependentes de uma variedade de fatores celulares (FRIEDMAN, 2007). Sabe-se, que os fatores de transcrição *PU.1*, *IRF8* (ZHAO et al., 2018a) e *KLF4* (KUROTAKI et al., 2013) controlam o desenvolvimento e manutenção de monócitos inflamatórios, enquanto que *Nr4a1* (HANNA et al., 2011) de monócitos patrulheiros.

Os monócitos estão associados com a resistência durante a esquistossomose (NASCIMENTO et al., 2014; TURNER et al., 2014; DE SOUZA et al., 2019). Após a infecção por *S. mansoni*, a depleção de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> está associada a perda de peso significativa e afeta a resposta Th2 protetora (NASCIMENTO et al., 2014). Monócitos intermediários (CD14<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup>) de paciente com esquistossomose são capazes de interagir de modo eficiente com ligantes E/S de cercárias quando comparados a indivíduos saudáveis, indicando um papel dos

monócitos no reconhecimento do parasita (TURNER et al., 2014). Além disso, a transferência adotiva de monócitos da medula óssea ( $CD14^+CD11b^+$ ) para camundongos infectados com *S. mansoni* reduz a expressão gênica de TGF- $\beta$ 1, a deposição de colágeno e a fibrose hepática (DE SOUZA et al., 2019).



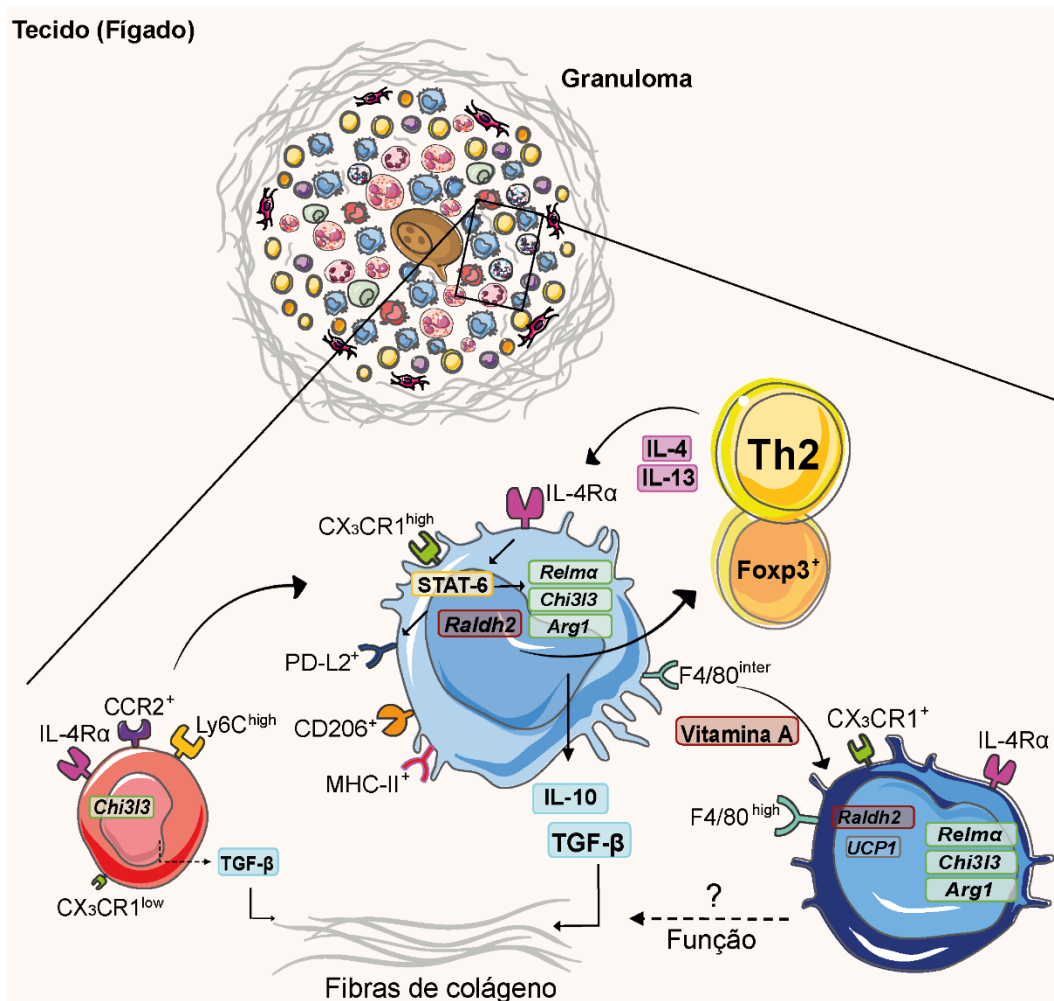
**Figura 2. Hematopoiese de células mielóides na medula óssea e baço.**

Após o nascimento, a hematopoiese definitiva ocorre na medula óssea através das células-tronco hematopoiéticas (HSC) que se autorrenovam gerando progenitores constantes. A linhagem mielóide origina-se do progenitor mielóide comum (CMP), que dá origem ao progenitor monócito-granulócito (GMP), que se desenvolve em outros progenitores (não destacados) originando os granulócitos/neutrófilos que são encontrados na circulação. Por outro lado, os GMP também dão origem ao progenitor comum monócito-DC (MDP), que originam o progenitor de células dendríticas comuns (CDP) que dão origem às células dendríticas plasmocitoides (pDC), ou se desenvolvem em pré-DCs que originam as células dendríticas convencionais (cDC1 e cDC2) no tecido. Os MDPs também dão origem ao progenitor comum de monócitos (cMoP), seguido do progenitor de monócitos em proliferação (pMo) que por fim originam os subtipos de monócitos: monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high}$  e monócitos patrulheiros  $Ly6C^{low}$  (HETTINGER et al., 2013). Ainda, uma parte dos monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high}$  podem se converter em monócitos patrulheiros  $Ly6C^{low}$  (LESSARD et

al., 2017). O baço é o local da monocitopoese extramedular que tem início com o progenitor MDP resultando nos monócitos maduros. Após a entrada no tecido, os monócitos podem se diferenciar em macrófagos e/ou células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos. Adaptado de (UDALOVA; MANTOVANI; FELDMANN, 2016).

Por outro lado, os monócitos também induzem fibrose durante a esquistossomose (FERNANDES et al., 2014; YONG et al., 2019; WOLDE et al., 2020). Durante a infecção por *S. japonicum*, células B1 secretam altos níveis de IL-10 que inibe a produção da quimiocina CCL2 (ligante CCR2) e conseqüentemente reduz o recrutamento de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> e a fibrose no fígado (YONG et al., 2019). Em pacientes com esquistossomose, os monócitos CD14<sup>high</sup> CD16<sup>-</sup> e CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>high</sup> aumentam a expressão gênica de TGF-β, que está associada à fibrose hepática (FERNANDES et al., 2014). Além disso, o antígeno solúvel do ovo (SEA) de *S. mansoni* induz a produção de TGF-β por monócitos (WOLDE et al., 2020) **Figura 3**. Curiosamente, a falta de CX<sub>3</sub>CR1 e, portanto, os monócitos patrulheiros, reduz o peso do fígado e a formação de granuloma durante a infecção por *S. japonicum*, sugerindo um papel diferencial para o subtipos de monócitos (RAN et al., 2015).

Ao migrar da circulação para um tecido, os monócitos adquirem novos programas moleculares que favorecem sua diferenciação em células dendríticas derivadas de monócitos (MDCs) ou macrófagos derivados de monócitos (MDMs) (YANG et al., 2014). Durante a infecção experimental por *S. japonicum*, as MDCs são eficientes em produzir altas concentrações de IL-4, citocina capaz de amplificar a resposta imune do tipo Th2 no fígado (MA et al., 2015). Essas células são classificadas pela expressão de CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, MHC-II<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> e Ly6C<sup>high</sup> em sua superfície (HESPEL; MOSER, 2012). Já os MDMs são caracterizados pela expressão de CD11b<sup>+</sup>, MHC-II<sup>+</sup>, F4/80<sup>high</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> e CD206<sup>-</sup> em sua superfície (GUNDRA et al., 2017). Durante a infecção por *S. mansoni*, monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> são recrutados para o fígado através do eixo CCL2/CCR2, e o aumento dessas células promove o acúmulo de MDMs, que em um ambiente Th2 adquire o perfil alternativamente ativados (MAA) conferindo resistência à infecção (NASCIMENTO et al., 2014) **Figura 3**.



**Figura 3. Monócitos e macrófagos em resposta ao granuloma de *S. mansoni*.**

No fígado, os monócitos inflamatórios que são recrutados do sangue periférico produzem TGF- $\beta$  que favorece a deposição de colágeno e, uma parte se diferencia em macrófagos derivados de monócitos (MDMs). A diversidade de células presentes no granuloma é responsável pela formação do microambiente do tipo 2, em que as células T produzem IL-4 e IL-13 que induzem a ativação alternativa de macrófagos via IL-4R $\alpha$ . O eixo IL-4/IL-13 – IL-4R $\alpha$  leva a transcrição de retinaldeído desidrogenase 2 (*Raldh2*) (enzima catalisadora da vitamina A) e ativação/fosforilação de STAT6 que regula positivamente a transcrição de *Arg1*, *Relma* e PD-L2, que desencadeiam a produção de TGF- $\beta$  e deposição de colágeno. Ainda, *Raldh2* coordena a ação das células Treg que auxiliam na manutenção dos MAA. Por fim, a vitamina A controla a conversão de MAA derivados de monócitos F4/80<sup>int</sup> CD206<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> em MAA residentes F4/80<sup>high</sup> CD206<sup>-</sup> PD-L2<sup>-</sup> MHC-II<sup>-</sup> UCP1<sup>+</sup>, cuja função ainda precisa ser elucidada. Adaptado de (SOUZA et al., 2020).

### 1.1.1.2. Macrófagos alternativamente ativados durante a esquistossomose

Durante a esquistossomose, a maioria dos macrófagos no sítio inflamatório são derivados de monócitos sanguíneos (ROLOT et al., 2019; RÜCKERL; COOK, 2019). Dependendo do microambiente, os monócitos que se diferenciam em macrófagos assumem perfis moleculares distintos (DAS et al., 2015). Dois programas



moleculares de ativação são amplamente estudados: macrófagos ativados classicamente (M1), que são induzidos por IFN- $\gamma$  + LPS e os macrófagos ativados alternativamente (MAAs/M2), que são induzidos por IL-4 + IL-13 (MARTINEZ; GORDON, 2014). A sinalização de IL-4/IL-13 via IL-4R $\alpha$  ativa STAT6, que regula positivamente a expressão de arginase-1 (Arg1), proteína 3 semelhante a quitinase (Chi3I3), resistina semelhante à alfa (Relm $\alpha$ ) e receptor de manose do tipo C (CD206) (GORDON, 2003; GORDON; MARTINEZ, 2010; ROLOT; DEWALS, 2018). Embora a sinalização de IL-4R $\alpha$  induza o fenótipo alternativo em macrófagos residentes (JENKINS et al., 2011) e MDMs durante infecções por helmintos (GUNDRA et al., 2017; ROLOT; DEWALS, 2018), estas células tem assinaturas transcricionais e funções distintas. Ambos os MAAs, residentes ou derivados de monócitos, expressam altos níveis de *Arg1*, *Chi3I3* e *Relma*, mas apenas MAAs derivados de monócitos expressam *Raldh2* e PD-L2 (GUNDRA et al., 2014) **Figura 3**.

O microambiente do tipo 2 desenvolvido em resposta aos ovos de *Schistosoma* favorece a ativação alternativa de macrófagos. Sabe-se que os basófilos detectam a glicoproteína IPSE/alfa-1 do ovo, produzem IL-4 e IL-13 que desencadeiam a ativação alternativa de monócitos humanos, confirmada pela expressão aumentada de CD206<sup>+</sup> e CD209<sup>+</sup> (KNUHR et al., 2018). A infecção por *S. mansoni* induz o recrutamento de monócitos Ly6C<sup>high</sup> para o fígado, que se diferenciam em MAAs CD206<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup>, a manutenção destas células é dependente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (GIRGIS et al., 2014). Macrófagos J774A.1 estimulados com SEA aumentam a expressão de marcadores M2 (*Arg1*, CD206, IL-10 e TGF- $\beta$ ) e fosforilação de STAT6 (TANG et al., 2017). Ainda, a lisofosfatidilcolina (LPC) de *S. mansoni* induz maior expressão de *Arg1* e CD206, aumentando liberação de IL-10, TGF- $\beta$  e prostaglandina (PG)-E2 por macrófagos peritoneais (ASSUNÇÃO et al., 2017).

Como mencionado acima, os macrófagos são essenciais para o reparo tecidual durante a esquistossomose (HERBERT et al., 2004; BORTHWICK et al., 2016). A sinalização de IL-4R $\alpha$  em MAAs induz a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , promovendo a cicatrização que minimiza o dano tecidual proveniente da formação do granuloma (BARRON; WYNN, 2011). Após a infecção por *S. mansoni*, camundongos *LysM<sup>cre</sup>IL-4R $\alpha$ <sup>-flox</sup>* falham em orquestrar a resposta imune protetora Th2, resultado na inflamação exacerbada do fígado e aumento da mortalidade devido aos altos níveis de IFN- $\gamma$  (HERBERT et al., 2004). É importante ressaltar que a depleção de

macrófagos F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> após a injeção de ovos de *S. mansoni* reduz o tamanho dos granulomas e diminui a expressão de *IL13ra2* (IL-13R $\alpha$ 2), *Retnla* e *Chi3l3* afetando as respostas mediadas por células CD4<sup>+</sup> Th2 no pulmão (BORTHWICK et al., 2016). Curiosamente, a polarização de MAAs via IL-4R $\alpha$  induz hiporesponsividade de células T CD4<sup>+</sup>; mediada por IL-10, no sdLN após exposições repetidas às cercárias (PRENDERGAST; SANIN; MOUNTFORD, 2016). Também na infecção por *S. haematobium*, os macrófagos são cruciais para o recrutamento de eosinófilos, células T e células B para o granuloma e auxiliam no reparo tecidual da bexiga (FU; ODEGAARD; HSIEH, 2015). Esses eventos se correlacionam com o aumento da expressão dos genes *Il4*, *Arg1*, *MMP* e colagenases (RAY et al., 2012).

As moléculas que caracterizam os MAAs apresentam diversas funções durante a esquistossomose. Por exemplo, animais deficientes para Relm $\alpha$  (*Retnla*<sup>-/-</sup>), após a injeção de ovos de *S. mansoni*, apresentam inflamação pulmonar intensa, com deposição desorganizada de fibras de colágeno ao redor do granuloma (NAIR et al., 2009). Animais *Arg1*<sup>-/-</sup> infectados com *S. mansoni* produzem menos IL-10 e TGF- $\beta$ , perdem mais peso, apresentam maior carga intestinal de ovos e sucumbem pela doença (HERBERT et al., 2010). É importante ressaltar que animais *LsyM<sup>cre</sup>Arg<sup>-flox</sup>* são altamente suscetíveis à infecção por *S. mansoni* por exibirem inflamação granulomatosa exacerbada, fibrose hepática e hipertensão portal. A susceptibilidade destes animais está intimamente relacionada com a função de macrófagos, porque MAAs de camundongos *LsyM<sup>cre</sup>Arg<sup>-flox</sup>* inibem a proliferação de células T independente de IL-10 e TGF- $\beta$  (PESCE et al., 2009). Macrófagos peritoneais estimulados com o verme *S. japonicum* ou SEA aumentam a expressão de CD206, IL-10 e *Arg1* e diminuem a expressão de CD16/CD32 (M1) (ZHU et al., 2014). Curiosamente, o aumento da expressão de *Chi3l3* e *Arg1* em MAAs de camundongos infectados com *S. japonicum* foi associada ao aumento da fibrose hepática (YE et al., 2020). Durante a infecção por *S. mansoni*, a IL-10 desempenha um papel fundamental na manutenção de MAAs e no controle de danos ao fígado na ausência da sinalização via IL-4R $\alpha$  (DEWALS et al., 2010), além de regular o processo anti-fibrótico (KAMDEM et al., 2018), ao passo de que níveis baixos de IL-10 estão associados a fibrose hepática grave em pacientes com esquistossomose (MUTENGO et al., 2018). A cooperação de macrófagos e células T CD4<sup>+</sup> para produção de IL-10, foi associada a redução da mortalidade durante a esquistossomose experimental (HESSE et al., 2004). Embora a deficiência de IL-10 leve ao aumento do tamanho dos granulomas

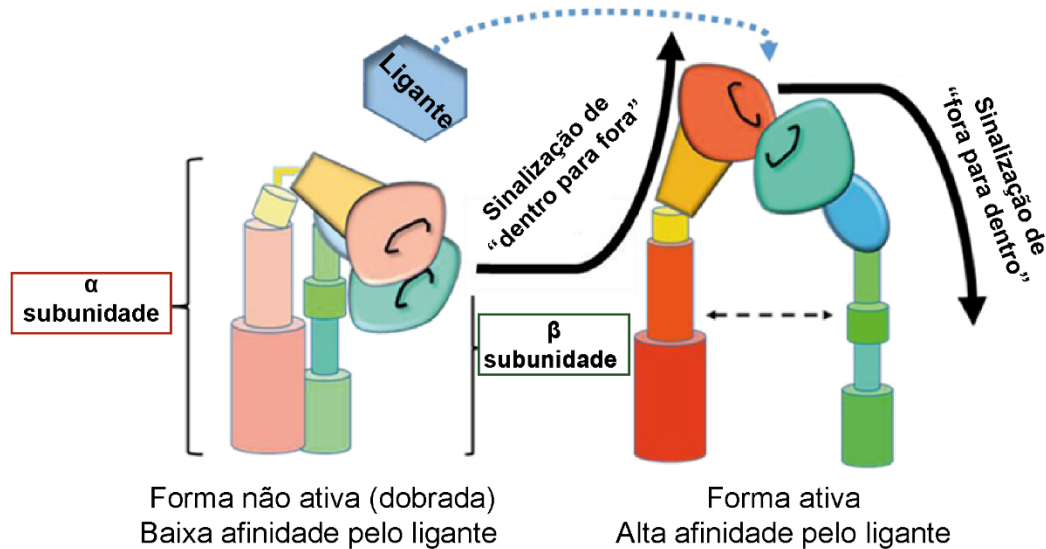
na infecção por *S. mansoni* (SADLER et al., 2003), essa citocina não é capaz de compensar os efeitos prejudiciais da ausência de MAAs dependentes de IL-4R $\alpha$  (HERBERT et al., 2004). Sabe-se que a vitamina A também é um sinal importante para a diferenciação e polarização de MAAs durante a esquistossomose (BROADHURST et al., 2012; GUNDRA et al., 2017). Camundongos infectados com *S. mansoni* aumentam a expressão de *Raldh2* e *Raldh3* no fígado, enquanto que os MAAs induzem a diferenciação de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> via metabolismo do ácido retinóico (BROADHURST et al., 2012). Ainda, camundongos com deficiência de vitamina A possuem uma redução drástica na população de MAA, que resulta no aumento do dano hepático (BROADHURST et al., 2012) e suscetibilidade a infecção por *S. mansoni* (GUNDRA et al., 2017). A vitamina A é necessária para a conversão de macrófagos F4/80<sup>int</sup> CD206<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> derivados de monócitos em células que assumem um fenótipo residente F4/80<sup>high</sup> CD206<sup>-</sup> PD-L2<sup>-</sup> MHC-II<sup>-</sup> UCP1<sup>+</sup> (GUNDRA et al., 2017), cuja função durante a infecção e/ou resolução da inflamação ainda precisa ser elucidada **Figura 3**.

### 1.3. Integrinas

Em 1987, pela primeira vez utilizou-se o termo integrina para classificar um grupo de moléculas semelhantes entre si, cuja função estava associada com a interação células-células e células-matriz extracelular (HYNES, 1987). A família de integrinas é composta por 24 dímeros  $\alpha\beta$ , sendo 16 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  (HYNES, 1987; SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017). As integrinas são proteínas de adesão transmembrana e heterodiméricas, que promovem adesão e migração trans-endotelial de leucócitos. Essas estruturas são formadas através de ligações não covalente de uma  $\alpha$ -subunidade a uma  $\beta$ -subunidade (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017; FAGERHOLM et al., 2019; SUN et al., 2021)

Na ausência de estímulos, as integrinas ( $\alpha\beta$ -subunidades) encontram-se em sua forma inativa (dobrada) e de baixa afinidade com o ligante. Com o início da resposta imune e a formação do microambiente inflamatório ocorrem sinais de “dentro para fora” que alteram a estrutura das integrinas na superfície dos leucócitos, permitindo a interação com os ligantes extracelulares (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017; FAGERHOLM et al., 2019; SUN et al., 2021). Esta modificação é controlada pela sinalização de talina (TADOKORO et al., 2003) e kindlin (MOSER et

al., 2008) no domínio intracelular  $\beta$ , resultando no aumento da afinidade (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017), e permitindo assim o contato com o ligante, fato que desencadeia a sinalização de “fora para dentro” **Figura 4**.



**Figura 4. Ativação de integrinas.**

Na ausência de estímulo inflamatório, as integrinas encontram-se em estado de repouso ou forma não ativa (dobrada) de baixa afinidade. Após a ativação do sistema imune, a sinalização de dentro para fora controlada pela subunidade  $\beta$  induz uma mudança estrutural na integrina levando-a ao seu estado ativo de alta afinidade que permite a ligação com o ligante extracelular. Após a interação com os ligantes, as integrinas ativas transmitem sinais de fora para dentro conhecido como cascatas de sinalização intracelular, que controla as respostas imunes. Adaptado de (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017).

### 1.1.3. Integrinas $\beta_2$

As integrinas  $\beta_2$  são constituídas pela subunidade funcional  $\beta$  (CD18), que interage com as diferentes subunidades  $\alpha$  ( $\alpha$ L—CD11a,  $\alpha$ M—CD11b,  $\alpha$ X—CD11c e  $\alpha$ D—CD11d), formando moléculas específicas. Por exemplo, o par de subunidades CD11a/CD18 é conhecido como antígeno associado à função leucocitária 1 (LFA-1) que é expresso principalmente em linfócitos, enquanto que CD11b/CD18 é chamado de antígeno de macrófago-1/receptor de complemento 3 (MAC-1/CR3) e CD11c/CD18 conhecido como CR4, sendo ambos expressos principalmente em macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017).

O metabolismo celular está intimamente associado com a formação das integrinas  $\beta_2$ . Neste contexto, foi descrito que o ácido linoleico conjugado (ALC) é capaz de modular o recrutamento de monócitos/macrófagos de modo dependente

PPAR- $\gamma$  diminuindo a transcrição de CD18 e seu posterior transporte para a membrana, ou de forma independente de PPAR- $\gamma$  inibindo o eixo CXCR4-CXCL12 afetando a interação do CD18 com as subunidades  $\alpha$ L—CD11a e  $\alpha$ M—CD11b, que formam os complexos LFA-1 e MAC-1, respectivamente (DE GAETANO et al., 2013)

Os ligantes de integrinas mais bem estudados são as moléculas de adesão intracelular (ICAM 1, 2, 3, e 5), e os fragmentos originados da cascata de ativação do sistema complemento (iC3b e C4b), que são expressos e/ou liberados por leucócitos e células endoteliais (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017). A interação com os diferentes ligantes leva a ativação de funções específicas de células imunes, como a adesão no endotélio ou mesmo a sinalização celular, que desencadeia diversos efeitos imunológicos que podem contribuir para o desenvolvimento de uma variedade de condições autoimunes e inflamatórias (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017; SUN et al., 2021). Por exemplo, após a infecção por *S. mansoni*, células endoteliais pulmonares aumentam a expressão de ICAM-1 que interage com o CD18 favorecendo a adesão celular e o recrutamento leucócitos para o sítio inflamatório (TROTTEIN et al., 1999). CD18 é crucial para a adesão eficiente de eosinófilos e neutrófilos nos capilares pulmonares (TEIXEIRA et al., 1994), além de contribuir para a manutenção de macrófagos no pulmão após estímulos com extratos proteicos ou de ovos de *S. mansoni* (TROTTEIN et al., 1999).

É importante ressaltar que mutações no gene ITGB2 que codifica a subunidade  $\beta$  em humanos, está associada com doenças genéticas raras, como a deficiência de adesão de leucócitos tipo I e tipo III (LAD-I e LAD-III) (FAGERHOLM et al., 2019). Esses indivíduos apresentam infecções recorrentes (ETZIONI et al., 1992) devido a falha no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório desencadeando leucocitose grave (VÁSQUEZ-DE KARTZOW et al., 2012), que é revertida com o transplante de células-tronco hematopoiéticas (FAGERHOLM et al., 2019).

#### 1.1.1.3. Impacto do CD18 durante a hematopoese

A família das integrinas  $\beta$ 2 é uma forte candidata para a identificação dos estágios de desenvolvimento de células mieloides (GOMEZ; DOERSCHUK, 2010; ZHANG et al., 2019) e linfoides (MCINTYRE et al., 2020). Na medula óssea, o CD18 é crucial para a interação de HSCs com o estroma auxiliando a proliferação, diferenciação em células maduras e auto renovação (TSUJI et al., 1998; MEI et al.,

2020). Quando silenciado o RNA mensageiro (mRNA) de *Itgb2* em células humanas de linhagem eritroleucêmica (do inglês: human erythroleukemia cell line – HEL), que podem diferenciar em células semelhantes aos macrófagos, foi observado uma redução drástica da diferenciação e proliferação destas células, sugerindo que a sinalização do CD18 estimula o crescimento e a diferenciação (TSUJI et al., 1998). Por outro lado, animais deficientes de integrina  $\beta 2$  ( $\beta 2^{-/-}$ ) aumentam a expressão de GATA2 que induz Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  nos progenitores GMP. A ligação de IgE via Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  desencadeia a fosforilação de JNK que promove a proliferação de GMP (ZHANG et al., 2019), levando ao acúmulo de neutrófilos na medula óssea (GOMEZ; DOERSCHUK, 2010; ZHANG et al., 2019)

Distúrbios metabólicos associados com a infecção por *Schistosoma spp.* estão correlacionados à falhas durante a hematopoese (CORTES-SELVA et al., 2021). Por exemplo, animais infectados com *S. mansoni* que são submetidos a dieta rica em gordura (do inglês: high fat diet - HFD) apresentam menor proliferação e diminuem a quantidade de células presentes no estágio CMP e GMP na medula óssea (CORTES-SELVA et al., 2021). Níveis elevados de LDL induzem o aumento da expressão de CD18 em células hematopoiéticas, e a adesão dependente de MAC-1 coordena o recrutamento, proliferação e diferenciação de células mieloides no tecido inflamatório (WANG et al., 2015). Curiosamente, a expressão dos níveis de mRNA de CD11b/CD18 apresentam mudanças drásticas de padrão durante o estágio CMP afetando assim a expressão de genes relacionados com a mieloperoxidase (ROSMARIN et al., 1989). Durante a monocitopoese, as principais diferenças na expressão de *Itgb2* ocorrem inicialmente no estágio cMoP, mas as alterações mais evidentes acontecem em monócitos maduros (HETTINGER et al., 2013). Animais CD18<sup>HYP</sup> (camundongos hipomórfico para CD18; essa mutação resulta em sintomas semelhantes a de pacientes com LAD-I moderada: neutrófila leve, hiperplasia leve do baço e medula óssea e resposta inflamatória prejudicada) falham em expandir as HSCs (LEON-RICO et al., 2014), o que pode impactar no desenvolvimento de monócitos durante processos inflamatórios.

## *2. Justificativa e Objetivos*

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2.1. Justificativa

A esquistossomose é uma doença negligenciada de importância clínica pois leva milhões de pessoas à morte todos os anos ao redor do mundo (“Schistosomiasis (Bilharzia)”, [s.d.]). Muito se conhece sobre a resposta imune nessa parasitose, no entanto, pouco se sabe sobre o papel do CD18 na defesa do hospedeiro nesse processo. Considerando o potencial do CD18 em controlar a hematopoese de células mieloides (LEON-RICO et al., 2014; ZHANG et al., 2019; MEI et al., 2020), as quais são essenciais para a resposta imune protetora durante a esquistossomose (SOUZA et al., 2020), ponderamos qual seria o papel dessa molécula nessa parasitose. Assim, nesse projeto investigamos como o CD18 coordena o desenvolvimento de monócitos, sua diferenciação em macrófagos assim como sua influência sobre as funções efetoras de monócitos/macrófagos ao longo da infecção experimental por *S. mansoni*, uma vez que essas informações parecem desconhecidas. Elucidar os mecanismos controlados pelo CD18 durante a infecção por *S. mansoni* contribuirá para a elaboração de novas estratégias terapêuticas.

### 2.2. Objetivo Geral

Determinar o papel biológico do CD18 em monócitos e macrófagos durante a infecção experimental por *Schistosoma mansoni*.

#### 2.1.2. Objetivos específicos

Nos tempos de 0, 3 dias, 1 e 7 semanas após a infecção de camundongos com *S. mansoni*, investigamos o papel da molécula CD18:

- a. No controle da carga parasitária e desenvolvimento da resposta granulomatosa.



- b. Na diferenciação de monócitos e nos subtipos de monócitos maduros na medula óssea.
- c. Na expressão de fatores de transcrições necessários para o desenvolvimento de monócitos na medula óssea.
- d. No recrutamento dos diferentes subtipos de monócitos da medula óssea para o sangue periférico.
- e. No acúmulo de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros nos capilares pulmonares e, na posterior entrada destas células no pulmão nos primeiros dias de infecção.
- f. Na plasticidade de monócitos em MDMs e MDCs no pulmão.
- g. Na manutenção de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros no fígado durante a infecção crônica.
- h. Na expressão de genes relacionados com a ativação alternativa de macrófagos e manutenção de MAAs no fígado.

### *3. Material e Métodos*

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais experimentais

Camundongos entre 12-15 semanas de vida (22 – 26g) selvagens C57BL/6 (WT) e homocigotos *CD18<sup>low</sup>* no mesmo “background” dos selvagens foram obtidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Os camundongos *CD18<sup>low</sup>* (B6.129S-Itgb2.<sup>tm1bay</sup>) foram adquiridos do “The Jackson Laboratory”. Esses camundongos expressam baixos níveis de CD18, assemelhando-se, portanto, a humanos com deficiência moderada de ITGB2 (WILSON et al., 1993). Para obtenção dos camundongos *CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/+</sup>*, cruzamos os animais *CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>* e C57BL/6. Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA-FCFRP) (Número dos Protocolos: 14.1.607.53.9 e 19.1.46.60.4, **anexo 1 – 2**) e realizados de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 3.2. Manutenção do *S. mansoni* e infecção experimental

Para manutenção e infecção dos animais, contamos com a colaboração do laboratório do Prof. Dr. Vanderlei Rodriguez da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). A cepa de *Schistosoma mansoni* LE foi mantida por passagem de rotina em caramujos *Biomphalaria glabrata* e camundongos BALB/c. Para a recuperação das cercárias, os caramujos infectados foram induzidos a eliminar as cercárias por exposição à iluminação artificial à 30° C em banho de água sem cloro por 1 hora.

Para infecção, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com quetamina (75mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) diluída em solução salina de 50 µL /10g de peso corpóreo do animal. Em seguida, 80 ou 200 cercárias por animal foram injetadas via subcutânea (s.c) com auxílio de seringa e agulha estéreis (22G x 1”). Nos tempos de 0, 3 dias, 1 semana e 7 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica (via intravenosa – i.v.) para coleta de:

medula óssea, sangue, pulmão, fígado e intestino. As fezes foram coletadas 7 semanas após à infecção para contagem de ovos. Para análise da sobrevivência, os animais foram infectados com 200 cercárias s.c e acompanhados diariamente por 70 dias.

### **3.3. Quantificação da carga parasitária, viabilidade intestinal do ovo e quantificação de ovos fecais.**

A recuperação dos vermes adultos de *S. mansoni* foi realizada por perfusão portal com tampão de perfusão [14,9 g de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  e 8,4 g de NaCl] à 37°C (20mL/animal). Os vermes foram lavados em PBS 1X e contados usando microscópio de dissecação. A viabilidade dos ovos intestinais foi avaliada em fragmentos do intestino (íleo terminal), conforme descrito anteriormente (ESPÍNDOLA et al., 2014). Resumidamente, os fragmentos de intestino foram examinados em microscópio óptico (aumento 100 x) e 200 ovos/animal foram contados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento: (i) ovos imaturos viáveis (1º ao 4º estágio), (ii) ovos maduros viáveis e (iii) ovos mortos. A porcentagem de ovos em cada estágio de ovo foi calculada. Os ovos fecais foram recuperados de amostras de fezes pela técnica de Kato-Katz, previamente descrita (TARAFDER et al., 2010).

### **3.4. Análise histopatológica**

Animais de cada grupo experimental foram eutanasiados após 7 semanas de infecção para coleta do fígado. Fragmentos do fígado foram fixados em formol tamponado e, após 24 horas, incluídos em parafina. Cortes de 5 µM de espessura foram obtidos com auxílio do micrótomo. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e picrossirius para avaliação do infiltrado inflamatório e fibrose, respectivamente. As imagens foram capturadas com câmera de vídeo digital (Leica® Microsystems, Hebrugg, Suíça) adaptada para microscópio DMR (Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram processadas no software Leica QWin. O infiltrado inflamatório e a deposição de colágeno foi mensurada através do software Image J (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

### **3.5. Obtenção de leucócitos**

#### **3.1.5. Medula óssea**

As células precursoras da medula óssea de camundongos não infectados ou infectados foram obtidas após a lavagem interna de 2 fêmures e 2 tíbias usando RPM com auxílio de seringa e agulha (26G x ½”). A suspensão celular obtida foi centrifugada à 200 g, 4 °C por 5 minutos.

#### **3.2.5. Sangue Periférico**

As amostras de sangue foram coletas em 100 µL de heparina por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado à 3000 g, 25 °C durante 5 minutos para retirada do plasma e obtenção da suspensão celular.

#### **3.3.5. Pulmão**

O lóbulo esquerdo do pulmão foi coletado em 1mL de RPMI-incompleto e posteriormente fragmentado com tesoura. Para digestão, o tecido foi incubado com 0,05 mg/mL de Colagenase IV e 1 mg/mL de DNase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) à 37 °C durante 45 minutos sob agitação de 150 rpm. Após esse período, o conteúdo foi filtrado através do filtro *Filcon* 50 µM (Corning), e a suspensão celular centrifugada à 200 g, à 4 °C por 5 minutos.

#### **3.4.5. Fígado**

O tecido hepático foi coletado em 2 mL de RPMI e fragmentado com bisturi em placa de Petri para a digestão enzimática. Para digestão, o tecido foi incubado com 0,05% de colagenase II e 1 mg/mL de DNase (Sigma Aldrich) à 37 °C durante 45 minutos sob agitação de 200 rpm. Após este período, a digestão enzimática foi interrompida com 100 µL de Soro Fetal Bovino (SFB) e os fragmentos de tecido foram macerados e filtrados com *cell strainer* 100 µm e 70 µm, respectivamente (BD Biosciences). A suspensão foi centrifugada à 200 g, 4 °C por 5 minutos. As células foram suspensas em solução isotônica de Percoll à 40% e centrifugado a temperatura ambiente durante 30 minutos à 1,500 g. O sobrenadante foi descartado com pipeta sorológica e a suspensão células lavada em RPMI-incompleto.

Após a obtenção da suspensão celular da medula óssea, sangue periférico pulmão e fígado, as hemácias presentes foram lisadas com o tampão de lise cloreto de amônio – potássio (ACK) [8,02 g NH<sub>4</sub>CL; 1g KHCO<sub>3</sub> e 37mg Na<sub>2</sub>EDTA (pH 7.2)]. Nos leucócitos da medula óssea, pulmão e fígado foram adicionados 2 mL de tampão de lise por 2 minutos à temperatura ambiente. Para as amostras de sangue periférico, foi utilizado 50 mL de tampão de lise por 5 minutos em banho maria à 37 °C. Após este período, a lise das hemácias foi interrompida com a adição de 10 mL de PBS contendo 5% SFB e as células centrifugadas à 200 g, 4 °C por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 2 mL de RPMI contendo 10% SFB na suspensão celular. Alíquotas das células foram diluídas em azul de Tripán ou Turkey e a contagem de leucócitos efetuada em câmara de Neubauer empregando microscópio de luz clara.

### **3.6. Citometria de Fluxo**

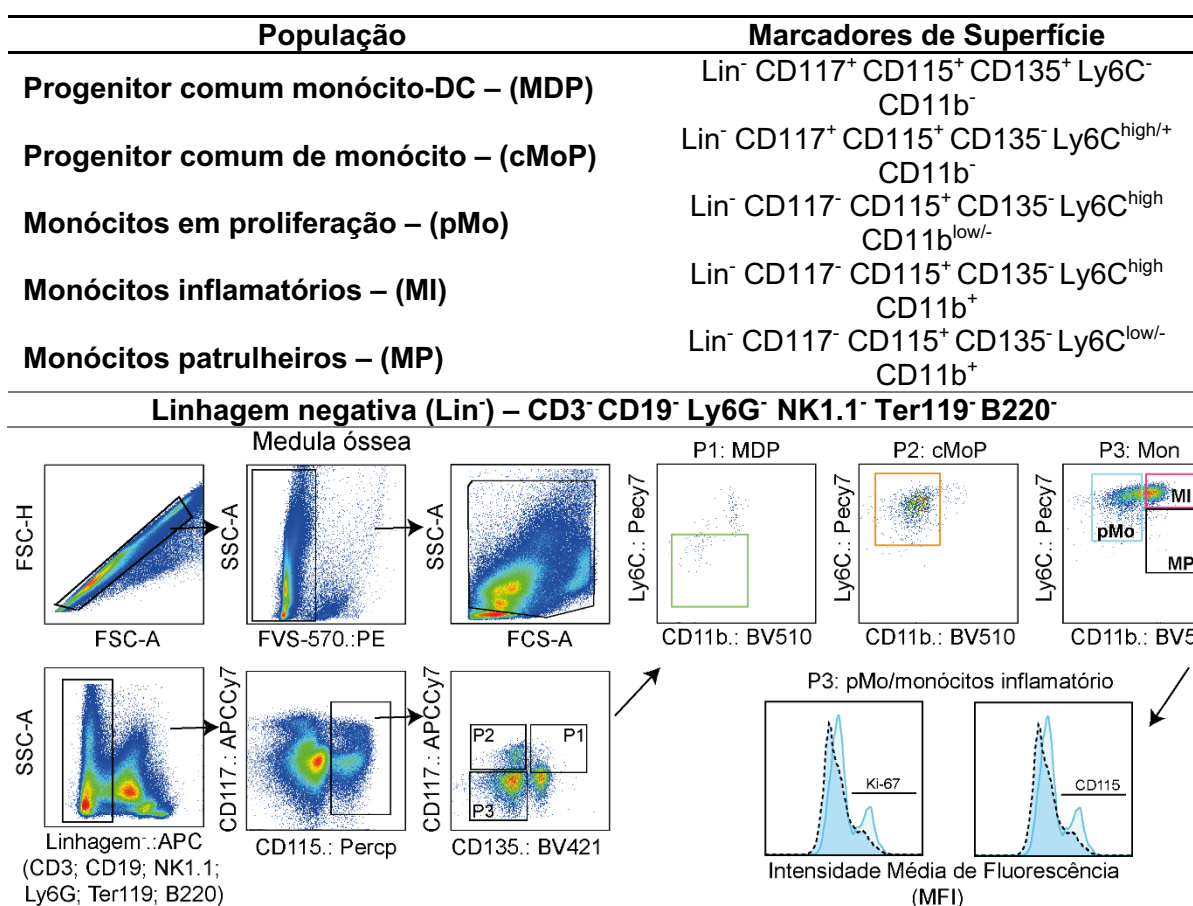
#### **3.1.6. Marcação extracelular**

A análise da expressão de marcadores de superfície foi realizada em uma suspensão de pelo menos 1x10<sup>6</sup> leucócitos/animal obtidos da medula óssea, sangue periférico, pulmão e fígado. As células foram submetidas ou não a fixação com PBS contendo 4% formol por 11 minutos e posteriormente lavadas. Após 20 minutos de bloqueio das ligações inespecíficas com anti-CD16/CD32 (FC block – 1:1), os anticorpos anti moléculas de superfícies foram adicionados nas amostras conforme painéis (**Tabela 1 – 7**) e estratégias (**Figura 5 – 11**). Foram utilizados os anticorpos: CD3 (1:100 ; clone: 17A2); CD19 (1:100 ; clone: 1D3 ); Ly6G (1:100 ; clone: 1A8); NK1.1 (1:100 ; clone: PK136) ; Ter-119 (1:100 ; clone: TER-119) CD45R/B220 (1:100 ; clone: RA3-6B2 ) ; CD117/c-Kit (1:100 ; clone: 2B8 ) ; CD135 (1:100 ; clone: A2F10 ) ; CD115 (1:200 ; clone: CSF-1R ) ; Ly6C (1:100 ; clone: AL-21 ou HK1.4 ) ; CD11a (1:100 ; clone: 2D7 ) ; CD11b (1:100 ; clone: M1/70) ; CD11c (1:100 ; clone: HL3), Ki-67 (1:200 ; clone B56); CD45 (1:100 ; clone: 30-F11) ; CX<sub>3</sub>CR1 (1:200 ; clone: AS011F11) ; CCR2 (1:200 ; clone AS203G11) ; F4/80 (1:100 ; clone: BM8); MHC-II (1:100 ; clone: M5/144.15.2) ; CD206 (1:100 ; clone: C068C2 ) e CD273 (PD-L2) (1:100 ; clone: TY25). Para viabilidade foi utilizado a sonda FVS-570 (1: 100). Todos os anticorpos e sonda de viabilidade utilizados foram adquiridos da BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, EUA) e Biolegend (San Diego, CA), respectivamente. A

aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (LSR-FORTESSA) e as análises foram feitas com o auxílio do programa *FlowJo* (Flow Cytometry Analysis Software v10.7.0).

a) **Análise fenotípica de progenitores de monócitos e subtipos de monócitos maduros na medula óssea.**

**Tabela 1.** Marcadores de superfície de progenitores de monócitos e monócitos maduros na medula óssea.



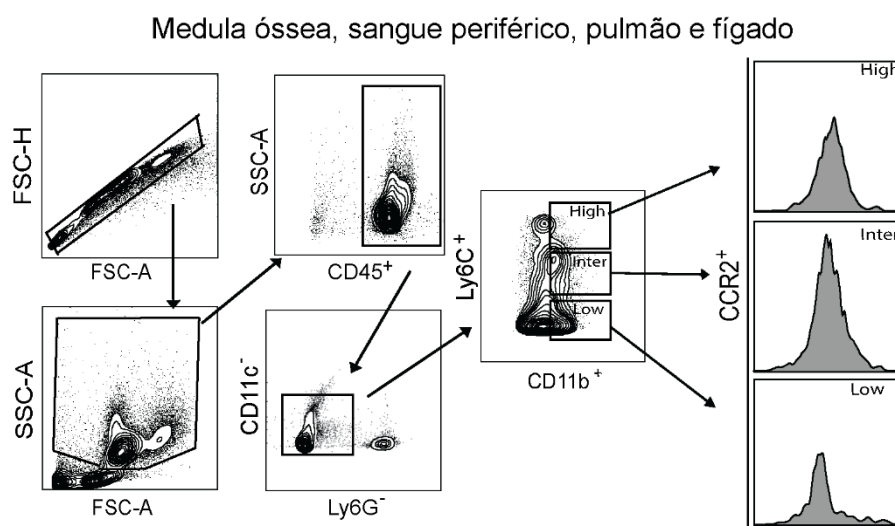
**Figura 5.** Estratégia para determinar os estágios sequenciais de diferenciação de monócitos na medula óssea.

Os gráficos de pontos representam a estratégia utilizada em células da medula óssea para determinar os estágios sequenciais de diferenciação de monócitos, seguido de FSC-H/FSC-A; SSC-A/FSC-A; SSC-A/Lin<sup>-</sup> (linhagem negativa: CD3, CD19, B220, Ter-119 e NK1.1), CD117<sup>+/+</sup>/CD115<sup>+</sup>, **MDP** (P1: Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>), **cMoP** (P2: Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high/+</sup> CD11b<sup>-</sup>), **pMo** (P3: Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>low/-</sup>) e **monócitos inflamatórios – MI** (P3: Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup>) e **monócitos patrulheiros – MP** (R3: Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup>). Dentro de todas as populações de progenitores de monócitos e monócitos maduros foi analisado a intensidade média de fluorescência (MFI) de ki-67, e dentro do progenitor **pMo** e **MI** foi analisado o MFI de CD115.

b) **Análise fenotípica de monócitos Ly6C<sup>high</sup>, Ly6C<sup>inter</sup> e Ly6C<sup>low</sup> na medula óssea, sangue periférico, pulmão e fígado.**

**Tabela 2.** Classificação dos subtipos de monócitos pela expressão diferencial de Ly6C.

População	Marcadores de Superfície
<b>Monócitos Ly6C<sup>high</sup></b>	CD45 <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>high</sup> CD11b <sup>+</sup> CCR2 <sup>high</sup>
<b>Monócitos Ly6C<sup>inter</sup></b>	CD45 <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>inter</sup> CD11b <sup>+</sup> CCR2 <sup>inter</sup>
<b>Monócitos Ly6C<sup>low</sup></b>	CD45 <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>low</sup> CD11b <sup>+</sup> CCR2 <sup>low</sup>



**Figura 6.** Estratégia para determinar os subtipos de monócitos Ly6C na medula óssea, sangue periférico, pulmão e fígado.

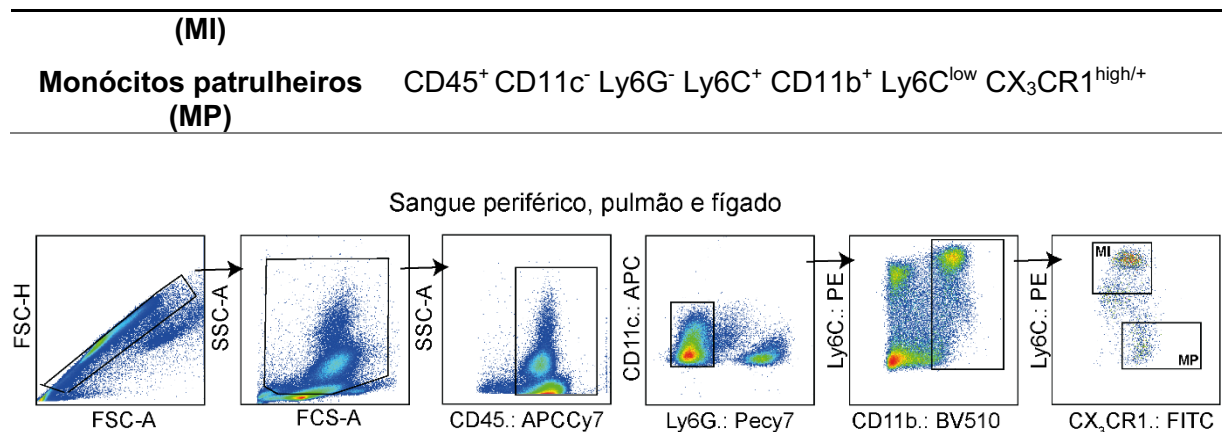
Gráficos de contorno mostram a estratégia utilizada para determinar as subpopulações de monócitos, através da análise de FSC-H/FSC-A, SSC-A/FSC-A seguido de CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, Ly6G<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>high</sup>, Ly6C<sup>inter</sup>, Ly6C<sup>low</sup> e subsequente o MFI de CCR2 foi calculado para cada subtipo de monócito.

c) **Análise de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros, classificados por CX<sub>3</sub>CR1.**

**Tabela 3.** Marcadores de superfície de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros, com inclusão de CX<sub>3</sub>CR1.

População	Marcadores de Superfície
<b>Monócitos inflamatórios</b>	CD45 <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> Ly6C <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Ly6C <sup>high</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>low/-</sup>



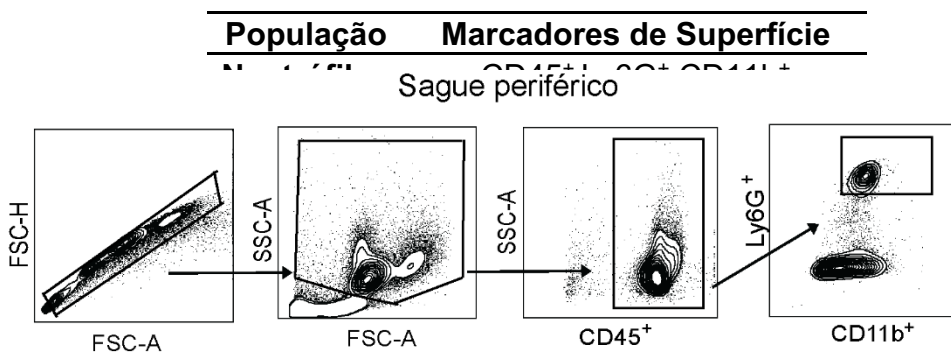


**Figura 7. Estratégia para determinar monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros, com inclusão de CX3CR1.**

Gráficos de pontos representam a estratégia utilizada em células da medula óssea, sangue periférico e pulmão para quantificar os **monócitos inflamatórios – MI** (SSC-A/CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>/Ly6G<sup>-</sup>, Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup>) e **monócitos patrulheiros – MP** (SSC-A/CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>/Ly6G<sup>-</sup>, Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>; Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup>).

**d) Análise fenotípica de neutrófilos no sangue periférico.**

**Tabela 4.** Marcadores de superfície de neutrófilos.



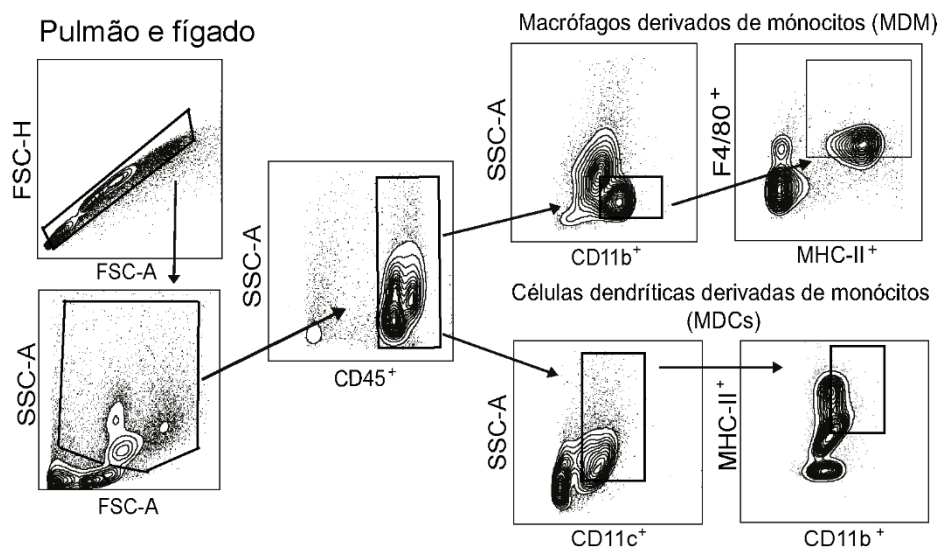
**Figura 8. Estratégia para determinar neutrófilos.**

Gráficos de contorno mostram a estratégia representativa utilizada em células do sangue periférico para determinar a população de neutrófilos, iniciando por FSC-H/FSC-A, SSC-A/FSC-A seguido de CD45<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>.

**e) Análise de macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos no pulmão e fígado.**

**Tabela 5.** Marcadores de superfícies de macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos.

População	Marcadores de Superfície
<b>Macrófagos derivados de monócitos (MDMs)</b>	CD45 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup>
<b>Células Dendríticas derivadas de monócitos (MDCs)</b>	CD45 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>



**Figura 9. Estratégia para determinar macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos no pulmão e fígado.**

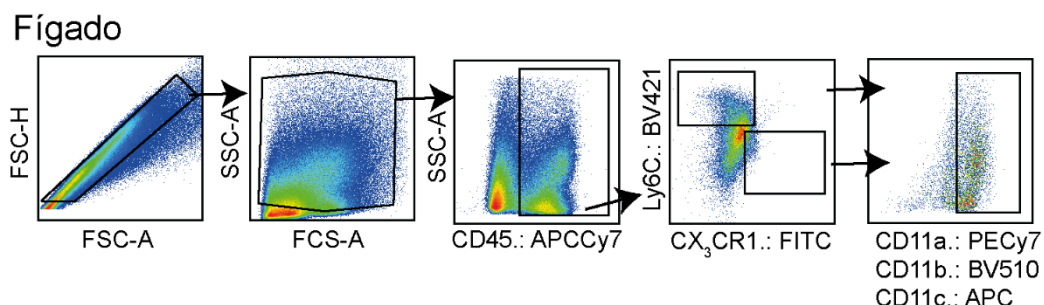
Os gráficos de contorno mostram a estratégia utilizada para determinar **macrófagos (MDMs)** (CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) e **células dendríticas (MDCs)** (CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) derivadas de monócitos no pulmão e fígado.

f) **Estratégia para análise das subunidades α de integrinas em monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiro no fígado.**

**Tabela 6.** Marcadores de superfície para classificação de subtipos de monócitos, com inclusão das α-subunidades de integrinas.

População	Marcadores de Superfície
<b>Monócitos inflamatórios (MI) (CD11a)</b>	CD45 <sup>+</sup> Ly6C <sup>high</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>low/-</sup> CD11a <sup>+</sup>
<b>Monócitos patrulheiros (MP) (CD11a)</b>	CD45 <sup>+</sup> Ly6C <sup>low</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>high/+</sup> CD11a <sup>+</sup>
<b>Monócitos inflamatórios (MI) (CD11b)</b>	CD45 <sup>+</sup> Ly6C <sup>high</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>low/-</sup> CD11b <sup>+</sup>
<b>Monócitos patrulheiros (MP) (CD11b)</b>	CD45 <sup>+</sup> Ly6C <sup>low</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>high/+</sup> CD11b <sup>+</sup>

<b>Monócitos inflamatórios (MI) (CD11c)</b>	CD45 <sup>+</sup> Ly6C <sup>high</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>low/-</sup> CD11c <sup>+</sup>
<b>Monócitos patrulheiros (MP) (CD11c)</b>	CD45 <sup>+</sup> Ly6C <sup>low</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>high/+</sup> CD11c <sup>+</sup>



**Figura 10. Estratégia para avaliar subunidades  $\alpha$  de integrinas em monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros no fígado.**

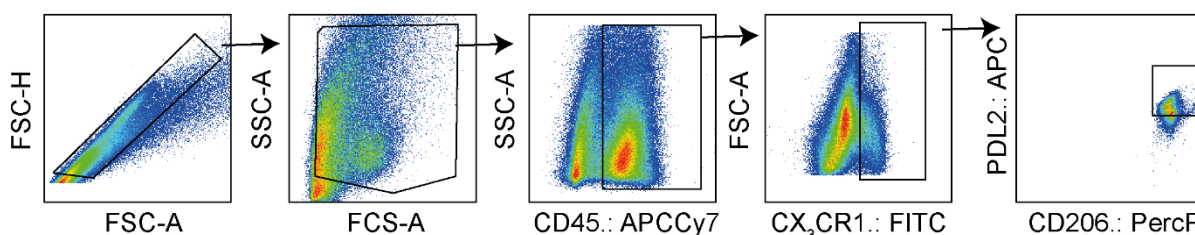
Os gráficos de pontos representam a estratégia utilizada para avaliar a frequência de CD11a<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> em **monócitos inflamatórios – MI** (CD45<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup>) e **monócitos patrulheiros – MP** (CD45<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup>) no fígado.

**g) Análise de macrófagos alternativamente ativados (MAAs) no fígado.**

**Tabela 7. Marcadores de superfície de macrófagos alternativamente ativados (MAAs).**

População	Marcadores de Superfície
<b>Macrófagos Alternativamente Ativados (MAAs)</b>	CD45 <sup>+</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> PD-L2 <sup>+</sup> CD206 <sup>+</sup>

Pulmão e Fígado

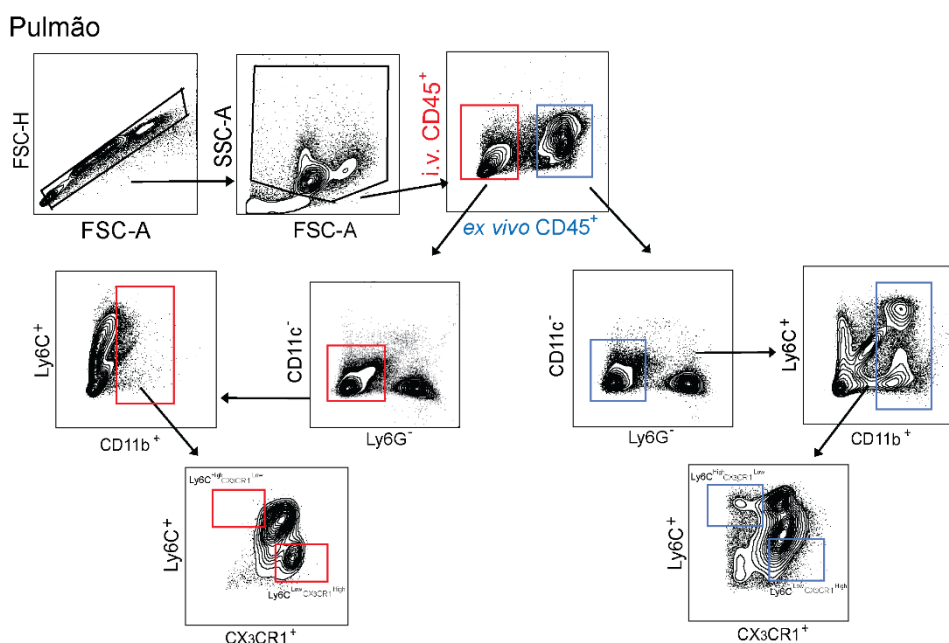


**Figura 11. Estratégia para análise de macrófagos alternativamente ativados (MAAs) no fígado.**

Gráficos de pontos mostram a estratégia utilizada para avaliar macrófagos derivados de monócitos (**MAAs**) no fígado iniciando por FSC-H/FSC-A; SSC-A/FSC-A seguido de CD45<sup>+</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>, PD-L2<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>.

### 3.2.6. Marcação intravascular

A marcação intravascular *in vivo* foi previamente descrita por (ANDERSON et al., 2014). Resumidamente, com auxílio de seringa acoplada à agulha (30G x 5/16”, BD-Ultra-Fine II ®) inoculamos por via intravenosa (i.v - plexo orbita) 3µg de anticorpo anti-CD45 (Pacific Blue® ; clone 30-F11) por animal 3 minutos antes da eutanásia. O pulmão foi processado para obtenção de leucócitos e marcação de citometria de fluxo (*ex vivo*) usando um segundo anticorpo anti-CD45 (APCcy7; 1:100; clone 30-F11), seguido de: CD11b (1: 100; clone: M1 / 70); CD11c (1: 100; clone: HL3); Ly6C (1:100; clone: HK1.4); Ly6G (1:100; clone: RB6-8C5) e CX3CR1 (1:200; clone: SA011F11). A aquisição de dados foi realizada em citômetro de fluxo FACS-Canto II.



**Figura 12. Estratégia para diferenciação de leucócitos intravasculares.**

Gráficos de contorno mostram a estratégia utilizada para avaliar os monócitos inflamatórios ( $CD45^+$ ,  $CD11c^-$ ,  $Ly6G^-$ ,  $Ly6C^+$ ,  $CD11b^+$ ,  $Ly6C^{high}$ ,  $CX_3CR1^{low}$ ) e monócitos patrulheiros ( $CD45^+$ ,  $CD11c^-$ ,  $Ly6G^-$ ,  $Ly6C^+$ ,  $CD11b^+$ ,  $Ly6C^{low}$ ,  $CX_3CR1^{high}$ ) presentes nos capilares pulmonares (vermelho) e no parênquima (azul).

### 3.7. Seleção de células por citometria de fluxo (FACS-cell sorting).

#### 3.1.7. Seleção de progenitor de monócito em proliferação (pMo) e monócitos inflamatórios (IM):

Células precursoras da medula óssea provenientes de grupos com 3 camundongos (6 fêmures e 6 tíbias) WT e  $CD18^{low}$  não infectados ou infectados com *S. mansoni* foram lavados em RPMI. A suspensão celular obtida foi centrifugada à

200 g, à 4 °C por 5 minutos. As células foram marcadas com FVS-520 (sonda de viabilidade) (1: 1000) (BD Horizon™) por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida incubadas com os anticorpos anti CD3 (1: 100; clone: 17A2), CD19 (1: 100; clone: 1D3), NK1.1 (1: 100; clone: PK136) Ly6G (1: 100; clone A18), CD117 (1 : 200; clone: 2B8), CD115 (1: 200; clone: CSF-1R), Ly6C (1: 200; clone: AL-21) e CD11b (1: 200; clone M1 / 70) por 30 minutos à 4°C. Por fim, as células foram lavadas e mantidas em RPMI-10% SFB suplementado com 2% de antibiótico (Penicilina G potássica e estreptomicina) e isolados através do BD-FACSMelody™ Cell Sorter. Duas populações foram separadas: progenitor pMo (FVS<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>) e monócitos inflamatórios (IM) (FVS<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup>).

### **3.2.7. Seleção de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros da medula óssea de animais $CX_3CR1^{gfp/+}$**

Células precursoras da medula óssea provenientes de grupos com 3 camundongos (6 fêmures e 6 tíbias)  $CX_3CR1^{gfp/+}$  não infectados foram lavadas em RPMI-incompleto. A suspensão celular obtida foi centrifugada à 200 g, à 4 °C por 5 minutos. Em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-Ly6G (1:200; clone 1A8) e anti-Ly6C (1:200; clone AL-21) por 30 minutos à 4°C. Após a incubação as células foram lavadas e mantidas em RPMI-10% SFB suplementado com 2% de antibiótico (Penicilina G potássica e estreptomicina) e isolados com auxílio do BD-FACSMelody™ Cell Sorter. Duas populações foram separadas: monócitos inflamatórios (MI) (Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup>  $CX_3CR1^{gfp/low}$ ) e monócitos patrulheiros (MP) (Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>low</sup>  $CX_3CR1^{gfp/+}$ ).

### **3.8. Transferência adotiva de monócitos**

Monócitos inflamatórios ( $2,5 \times 10^5$ ) e monócitos patrulheiros ( $1,5 \times 10^5$ ) previamente isolados da medula óssea de animais  $CX_3CR1^{gfp/+}$  foram transferidos adotivamente por via i.v. (plexo ortibal) para camundongos  $CD18^{low}$  infectados com *S. mansoni* em diferentes dias da infecção, conforme delineamento mostrado na **Figura 26A**, para avaliação de parâmetros parasitológicos e histológicos.

### **3.9. Extração de RNA total**

Fígado e medula óssea de animais WT e *CD18<sup>low</sup>* não infectados e infectados com *S. mansoni* foram coletados e armazenados em 500µL Trizol® (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) ou 200µL RNA/later® (Sigma-Aldrich) à -20°C até o momento da extração do RNA total, respectivamente. As amostras de tecido foram homogeneizadas com o auxílio de uma haste de trituração autoclavada e tratada com dimetilpirocarbonato (DEPC), para eliminação de RNase. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio nas células da medula óssea e 400 µL de clorofórmio no homogenato do fígado. Após centrifugação (12.000g, 15 minutos, 4°C), a fase aquosa contendo o RNA foi cuidadosamente coletada, transferida para outro tubo contendo 200 µL de etanol 70%. Para a purificação do RNA do fígado e células da medula óssea foi utilizado o kit SV total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) e o kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™), respectivamente, conforme recomendação dos fabricantes. O RNA foi quantificado a 260 nm de absorvância (A260) em *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V 3.7.1* (Thermo Scientific) e armazenado a -70°C até a síntese do DNA complementar (cDNA).

### 3.10. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total, utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Uma mistura contendo 10x *RT Buffer*, 25x *dNTP Mix* (100mM), 0,05µg/µL de Oligo (dT) a 50µM, *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e 1µg de RNA foi colocada no termociclador (Modelo PTC-100, M Research, Watertown, MA, EUA) cujas temperaturas e tempos de incubação foram de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 10°C até a retirada da amostra. Posteriormente, a mistura foi diluída em 160 µL de água livre de endonuclease e armazenada à -20°C até o uso.

### 3.11. Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)

A avaliação dos transcritos foi realizada em amostras do fígado e em células da medula óssea utilizando-se o sistema SYBR® Green e o *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Esse sistema realiza reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras através da expressão normalizada com base

no controle endógeno/constitutivo *Gapdh*. O cDNA de cada amostra (5 µL) foi adicionado a 0,5 µL dos *primers* (sense/anti-sense) e a 2,5 µL de água livre de endonucleases. A amplificação das sequências dos genes alvos e controle interno (*Gapdh*) foi avaliada através da curva exponencial gerada após a incubação do material a 50°C por 2 minutos, a 95°C por 2 minutos (para desnaturação), 40 ciclos de repetição de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos (para anelamento das sequências iniciadoras), 72°C por 30 segundos e, finalmente, 72°C por 30 segundos.

A positividade da reação foi determinada baseando-se em controles negativos, obtidos de animais não infectados. A expressão gênica foi analisada e quantificada com base no valor da linha de corte Ct (*quantification Cycle*), definido após o término da reação, ou seja, a partir do ciclo em que a amplificação atingiu um limiar. Os cálculos, para determinação da expressão relativa dos genes alvo, foram realizados de acordo com as instruções contidas no folheto *User's Bulletin* (P/N 4303859, Applied Biosystems), sendo que os dados foram normalizados em relação à expressão constitutiva de *Gapdh* em cada amostra. Em resumo, foram obtidos os valores de  $\Delta Ct$  para cada amostra avaliada, sendo que  $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene controle (Gapdh)}}$ . Assim, quanto menor o valor de  $\Delta Ct$ , maior a expressão do gene de interesse em relação ao gene controle. A expressão de mRNA amostral, em relação ao grupo controle de animais não infectados, foi calculada através da fórmula: Expressão relativa =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo que  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{animal infectado}} - \Delta Ct_{\text{grupo controle}}$ . Os *primers* e sequências utilizadas estão descritos na **Tabela 8**. Todos os *primers* foram projetados usando o pacote de software Primer Express v2.0 (Applied Biosystems), com base nas sequências de referências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados GenBank.

**Tabela 8.** Sequência de iniciadores (*primers*) murinos utilizados na reação de qPCR

Gene	Sequências sence (F) 5' – 3'	Sequências anti-sence (R) 3' – 5'
<i>Gapdh</i>	CGA AGG TGG AAG AGT GGG AG	TGA AGC AGG CAT CTG AGG G
<i>Irf8</i>	CAG ATC CTC CCT GAC TGG TG	GCT TGC CCC CGT AGT AGA AG
<i>Klf4</i>	GAG GCT GTG GCA AAA CCT AT	CGG TAG TGC CTG GTC AGT TC
<i>Nr4a1</i>	AGC TTG GGT GTT GAT GTT CC	AAT GCG ATT CTG CAG CTC TT
<i>Il4</i>	AAG AGC ATC ATG CAA ATG GA	TTA AAG CAT GGT GGC TCA GTA C
<i>Chi3l3</i>	AGA AGG GAG TTT CAA ACC TGG T	GTC TTG CTC ATG TGT GTA AGT GA
<i>Arg1</i>	CTC CAA GCC AAA GTC CTT AGA G	AGG AGC TAT CAT TAG GGA CAT C

### 3.12. Obtenção do homogenato de pulmão e fígado

Fragmentos de pulmões e fígados foram coletados e pesados em eppendorfs de 2,0 mL contendo 1 mL de solução inibidora de protease (Complete®, Rocher, Mannheim, Alemanha) preparada conforme recomendação do fabricante. Em seguida, os tecidos foram lisados por homogeneização com triturador mecânico (IKA®- Werke; Alemanha), e posteriormente foram centrifugados à 200 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de citocinas.

### **3.1.12. Dosagens de citocinas por ELISA**

As concentrações das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 e IL-10 no homogenato do pulmão; e IL-10 no homogenato de fígado foram mensuradas por ELISA conforme instruções do fabricante. Brevemente, placas de poliestireno de 96 poços (Costar, Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas a temperatura ambiente ou 4°C por 16 horas com tampão de ligação contendo anticorpo de captura (100 $\mu$ L/poço). Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20® e os sítios não específicos foram bloqueados, por 1 hora a temperatura ambiente, com 100  $\mu$ L/poço de tampão de bloqueio específico. Posteriormente, diluições dos padrões (curva padrão) e das amostras foram adicionadas à placa (50  $\mu$ L/poço). Após 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e anticorpos de detecção biotinizados, diluídos segundo orientações do fabricante, foram adicionados (50 $\mu$ L/poço). Solução contendo substrato cromógeno da peroxidase, *treta-methyl-benzidine* (TMB, KPL, Gaithersburg, MA, EUA) foi adicionado em cada poço por até 20 minutos, quando a reação foi finalizada pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A densidade óptica de cada amostra foi mensurada por meio do leitor de ELISA (eMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) em filtro com comprimento de onda de 450nm e a quantificação foi realizada conforme curva padrão obtida.

### **3.13. Análises estatísticas**

Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Primeiramente, a distribuição dos dados foi verificada pelos testes de normalidade D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk. Para comparação entre dois grupos foi realizado o teste *t* de Student ou Mann-



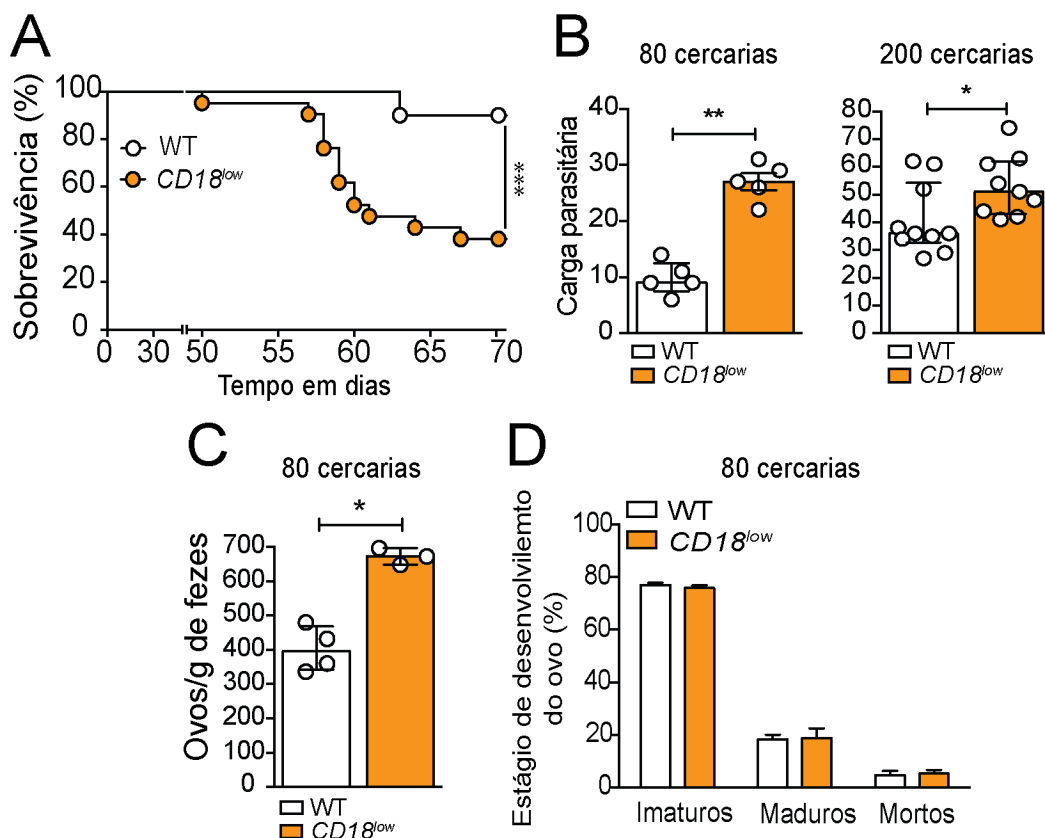
Whitney, e para diferenças significativas entre os grupos experimentais ao longo da infecção foram utilizados os testes Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de *Dunn* ou One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni. O teste de log-rank (Mantel-Cox) foi usado para avaliar as curvas de sobrevivência. As barras de erro representam a medianas  $\pm$  intervalo interquartil (IR) ou média  $\pm$  desvio padrão (SD). Os valores de  $p \leq 0.05$  foram considerados significativos. As comparações estatísticas referem-se aos animais *CD18<sup>low</sup>* em relação a animais WT nos mesmos tempos de infecção.

## *4. Resultados*

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CD18 confere resistência à infecção experimental por *S. mansoni*

Com o intuito de investigar a importância biológica do CD18 durante a infecção experimental por *S. mansoni*, camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* foram infectados com 200 cercárias e a sobrevivência foi monitorada durante 70 dias. A baixa expressão de CD18 diminuiu a taxa de sobrevivência de animais infectados com *S. mansoni*, uma vez que 61,9% dos animais sucumbiram em 70 dias após a infecção (dpi), em comparação com 10% dos camundongos WT (**Figura 13A**). Para confirmar se a suscetibilidade dos animais *CD18<sup>low</sup>* era independente do inóculo inicial do parasita, camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* foram infectados com duas quantidades diferentes de cercárias (80 e 200), e após 7 semanas de infecção os animais foram eutanasiados para quantificar a carga parasitária no sistema porta hepático. Independentemente do inóculo inicial de parasita, camundongos *CD18<sup>low</sup>* tiveram cargas de vermes aumentadas no fígado quando comparados aos animais WT (**Figura 13B**). Em seguida, fomos avaliar a deposição e a viabilidade dos ovos no intestino e nas fezes dos animais de ambos os grupos infectados com 80 cercárias de *S. mansoni*. Animais *CD18<sup>low</sup>* exibiram aumento do número de ovos liberados nas fezes após 7 semanas de infecção (**Figura 13C**). No entanto, não houve diferença nos estágios de maturação e viabilidade do ovo (**Figura 13D**). Em conjunto, nossos dados demonstram que a baixa expressão de CD18 está associada a desfechos fatais da doença ocasionados pelo aumento da carga parasitária e aumento da deposição de ovos de *S. mansoni*.

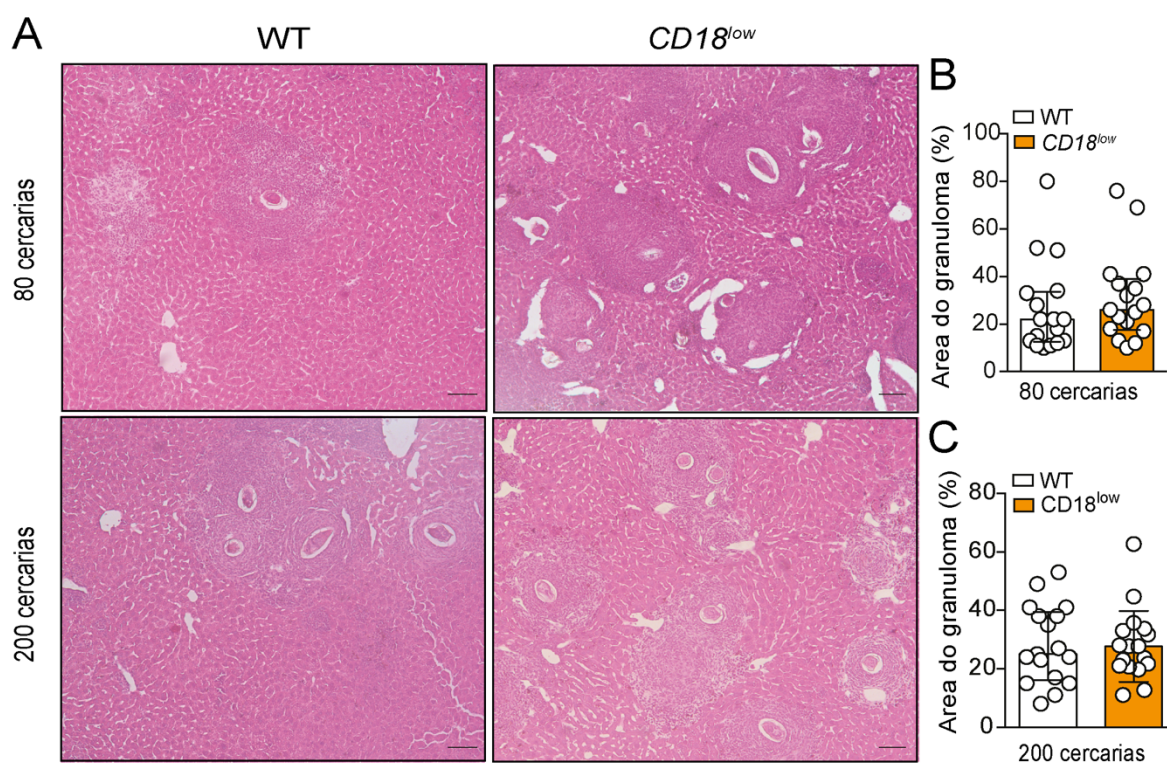


**Figura 13. A baixa expressão de CD18 confere suscetibilidade à infecção por *S. mansoni*.**

(A) O gráfico de linha mostra a sobrevivência de camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* infectados via subcutânea com 200 cercárias de *S. mansoni* e monitorados diariamente por 70 dias ( $n = 13$  animais por grupo) \*\*\* $p < 0,001$  usando o teste log-rank. (B) Gráficos de barras com pontos mostram a carga parasitária (vermes) determinada por perfusão do sistema porta hepático após 7 semanas de infecção com 80 ( $n = 5$  animais por grupo) e 200 ( $n = 10$  WT e  $n = 9$  *CD18<sup>low</sup>*) cercárias. (C) Gráfico de barras com pontos representam a média  $\pm$  SEM de ovos/g de fezes de animais WT e *CD18<sup>low</sup>* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* após 7 semanas ( $n = 4$  WT e  $n = 3$  *CD18<sup>low</sup>*). (D) Gráficos de barras mostram a porcentagem de ovos imaturos, maduros ou mortos de *S. mansoni* no intestino de camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* após 7 semanas ( $n = 3$  animais por grupo). Os ovos intestinais foram identificados pela metodologia de oograma. Os dados representam as medianas  $\pm$  intervalo interquartil de um experimento representativo de dois experimentos independentes. Os resultados foram analisados com o teste de Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  comparado ao WT)

#### 4.2. A baixa expressão de CD18 resulta no aumento do processo inflamatório no fígado após a infecção por *S. mansoni*

Durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*, granulomas se desenvolvem no fígado para conter os ovos que chegam da circulação (SCHWARTZ; FALLON, 2018). Para avaliar o papel do CD18 na resposta granulomatosa, secções do fígado de animais WT e  $CD18^{low}$  foram coletadas após 7 semanas de infecção com 80 ou 200 cercárias e os tecidos foram corados com H&E. Independentemente da carga parasitaria, animais  $CD18^{low}$  apresentaram maior número de granulomas ao redor dos ovos espalhados por todo tecido hepático (**Figura 14A**). No entanto, o diâmetro (área) dos granulomas foram semelhantes entre os grupos experimentais (**Figura 14B e C**). Esses dados confirmam a maior deposição de ovos **Figura 13C** e consequentemente o aumento do infiltrado inflamatórios em animais  $CD18^{low}$  infectados com *S. mansoni*.

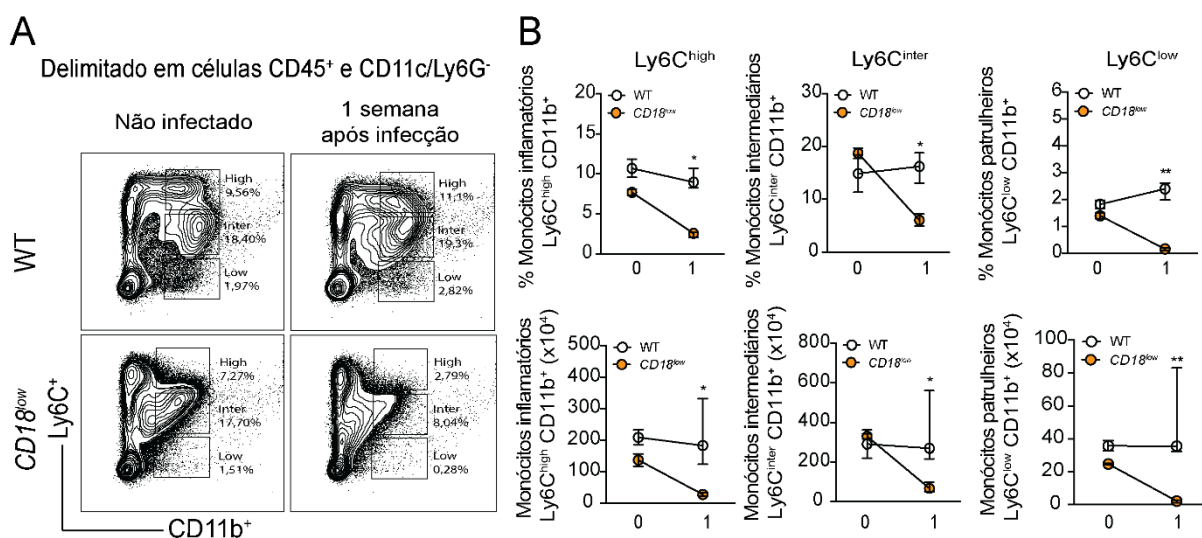


**Figura 14. A baixa expressão de CD18 está associada ao aumento de granulomas no fígado.**

Fragments de fígado foram obtidos de camundongos WT e  $CD18^{low}$  infectados com 80 ou 200 cercárias à 7 semanas (**A**) Fotomicrografias (aumento de 100x) do fígado coradas com H&E. (**B – C**) Gráficos de barras com pontos mostram a área (%) de marcação dos granulomas hepáticos. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

#### 4.3. A baixa expressão de CD18 diminui os subtipos de monócitos na medula óssea nos momentos iniciais da infecção por *S. mansoni*

Mutações no gene *Itgb2* estão associadas à falhas na hematopoese (LEONRICO et al., 2014; WANG et al., 2015), no recrutamento de células (FAGERHOLM et al., 2019) e na manutenção de macrófagos no tecido (TROTTEIN et al., 1999), o que pode impactar no desenvolvimento da resposta imune durante a esquistossomose (TROTTEIN et al., 1999). Curiosamente no fígado, a maior parte dos macrófagos são derivados de monócitos durante a infecção por *S. mansoni* (ROLOT et al., 2019). Neste sentido, investigamos se o CD18 é necessário para manutenção de monócitos na medula óssea no início da infecção. Para isso, animais WT e *CD18<sup>low</sup>* foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* e empregando citometria de fluxo, avaliamos as populações de monócitos, as quais são sub classificadas pelos diferentes níveis de expressão de Ly6C: Ly6C<sup>high</sup> (monócitos inflamatórios), Ly6C<sup>inter</sup> (monócitos intermediários) e Ly6C<sup>low</sup> (monócitos de patrulha) na medula óssea após uma semana de infecção (**Figura 6**). Comparado aos animais WT, a porcentagem e os números absolutos de todos os subtipos monócitos foram reduzidos na medula óssea de camundongos *CD18<sup>low</sup>* (**Figura15 A e B**). Assim, nossos dados sugerem que a baixa expressão de CD18 altera os subtipos de monócitos na medula óssea nos momentos iniciais da infecção por *S. mansoni*.



**Figura 15. A baixa expressão de CD18 afeta a hematopoese de monócitos nos primeiros dias da infecção por *S. mansoni*.**

A medula óssea de camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* não infectados e infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* após uma semana de infecção (1) foram analisadas por citometria de fluxo. (**A**)

Os gráficos de contorno mostram os dados representativos de subtipos de monócitos CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> na medula óssea. **(B)** Os gráficos de linha mostram a porcentagem (painel superior) e os números absolutos (painel inferior) dos subtipos de monócitos Ly6C<sup>high</sup>, Ly6C<sup>inter</sup>, Ly6C<sup>low</sup> na medula óssea. Os dados representam as medianas  $\pm$  intervalo interquartil de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (n= 2 controles não infectados e 5-6 camundongos infectados por grupo). Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. (\* p<0,05, \*\* p< 0,01 comparado ao WT em cada tempo)

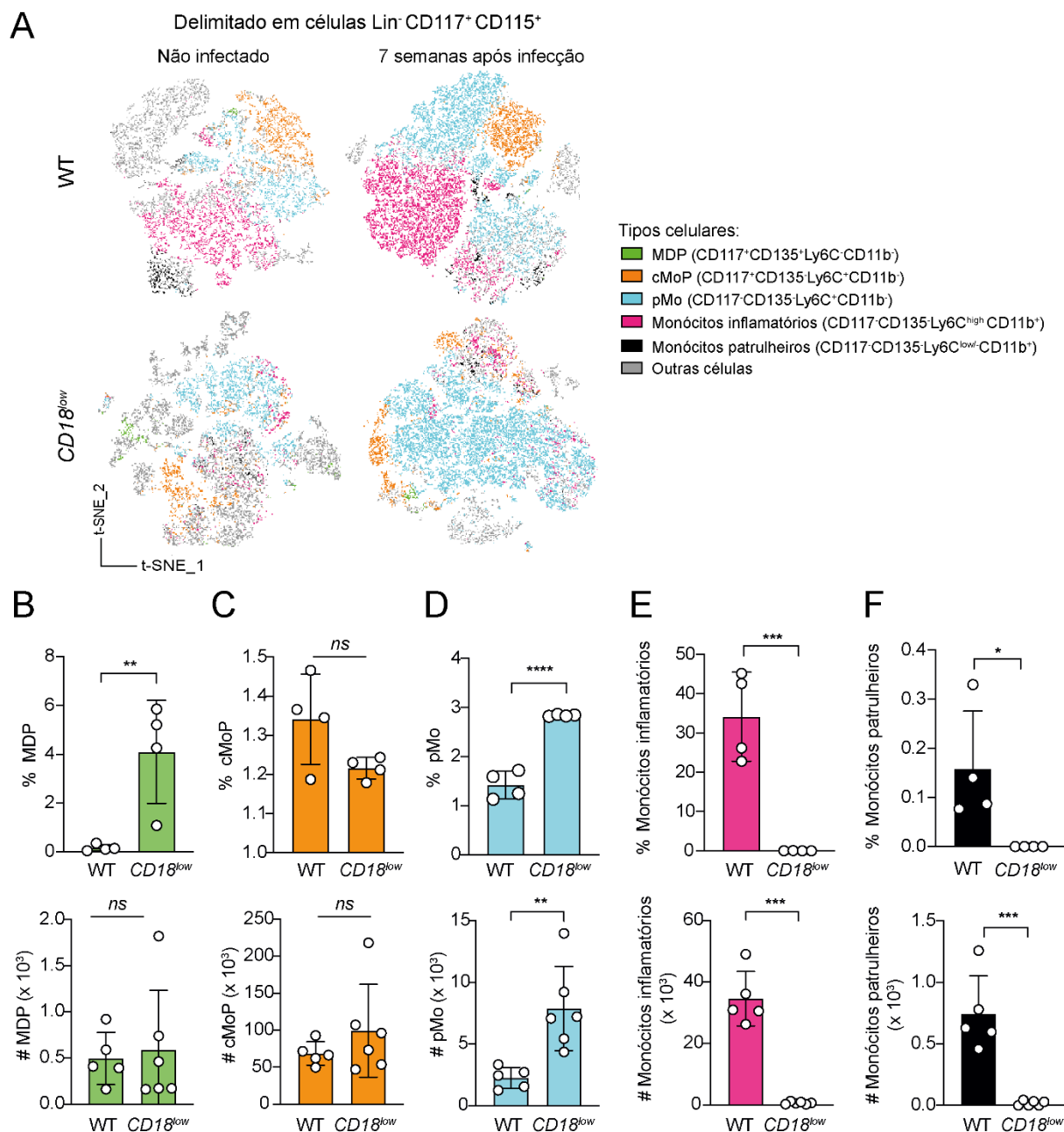
#### 4.4. A baixa expressão de CD18 leva ao acúmulo do progenitor de monócitos em proliferação (pMo) na medula óssea durante a esquistossomose crônica.

A monocitopoese inicia-se após a diferenciação do progenitor comum monócito-DCs – MDP (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>), seguido pelo progenitor comum de monócitos – cMoP (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high/+</sup> CD11b<sup>-</sup>) que dá origem ao progenitor de monócitos em proliferação – pMo (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>low/-</sup>) e, finalmente, os monócitos inflamatórios – MI (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup>) e monócitos patrulheiros – MP (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup>), que são caracterizados pela expressão dinâmica de receptores de superfícies, supracitados (HETTINGER et al., 2013). Para validar os resultados anteriores da **Figura 15**, e confirmar o papel do CD18 na monocitopoese durante a esquistossomose crônica, camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* foram infectados com 80 cercárias e os progenitores de monócitos foram caracterizados na medula óssea após 7 semanas de infecção (**Figura 5**).

Inicialmente, resumimos a complexidade celular de modo bidimensional e exibimos sua distribuição por pares de similaridade em relação à população total de linhagem negativa (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup> B220<sup>-</sup>) delimitadas em células CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup>, um mapa t-SNE (do inglês: t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) foi produzido de acordo com a combinação dos marcadores de superfície expressos por cada população (**Figura 16A**) e os dados normalizado em relação aos animais não infectados. Comparado aos animais WT, a porcentagem dos progenitores MDPs aumentou nos animais *CD18<sup>low</sup>* (**Figura 16B, painel superior**), mas não observamos diferenças significativas nos números absolutos deste progenitor entre os grupos experimentais (**Figura 16B, painel inferior**). Além disso, a baixa expressão de CD18 não afetou a porcentagem e os números absolutos do progenitor cMoP

**(Figura 16C).** No entanto, animais  $CD18^{low}$  exibiram aumento da porcentagem e dos números absolutos do progenitor pMo **(Figura 16D)**. O acúmulo do progenitor pMo na medula óssea de animais  $CD18^{low}$  se correlacionou com a menor porcentagem e diminuição dos números absolutos de monócitos inflamatórios **(Figura 16E)** e monócitos patrulheiros **(Figura 16F)** na medula óssea após 7 semanas de infecção com *S. mansoni*. Juntos nossos dados sugerem que a baixa expressão de CD18 leva ao acúmulo do progenitor de monócitos em proliferação (pMo) e, conseqüentemente, reduz os monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros na medula óssea durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*.



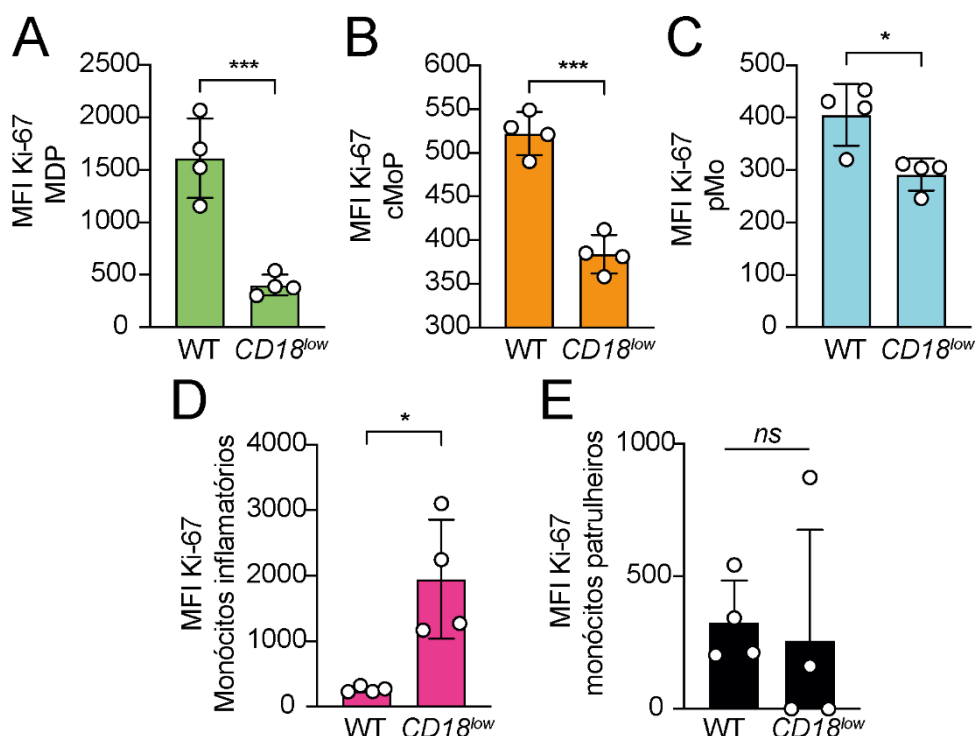


**Figura 16. A baixa expressão de CD18 afeta o progenitor de monócitos em proliferação (pMo) na medula óssea após 7 semanas de infecção por *S. mansoni*.**

A medula óssea de camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* não infectados e infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* foram analisadas por citometria de fluxo após 7 semanas de infecção. **(A)** Mapa t-SNE demonstra a distribuição por similaridade das populações de progenitores MDP (CD117<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>), cMoP (CD117<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high/+</sup> CD11b<sup>-</sup>), pMo (CD117<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high/+</sup> CD11b<sup>low/-</sup>), monócitos inflamatórios (MI) (CD117<sup>-</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup>) e monócitos patrulheiros (MP) (CD117<sup>-</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup>) delimitados em células viáveis de linhagem negativa (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup> B220<sup>-</sup>) e células CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup>. Gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem e os números absolutos de progenitores **(B)** MDP; **(C)** cMoP ; **(D)** pMo; **(E)** monócitos inflamatórios (MI); **(F)** monócitos patrulheiros (MP). Os dados representam a média ± SD de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (n= 5 – 6 WT e n= 6 *CD18<sup>low</sup>* por grupo). Os dados foram analisados com teste *t* de Student não pareado. (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, em comparação ao WT em cada tempo)

#### 4.5. A baixa expressão de CD18 diminui a proliferação dos progenitores de monócitos durante a infecção crônica por *S. mansoni*.

O CD18 está relacionado à atividade proliferativa de células hematopoiéticas (TSUJI et al., 1998; ZHANG et al., 2019). Neste contexto, avaliamos a intensidade média de fluorescência (do inglês: Mean Fluorescent Intensity – MFI) de Ki-67 (marcador de proliferação) nas populações de progenitores de monócitos e subpopulações de monócitos maduros presentes na medula óssea de animais WT e *CD18<sup>low</sup>* após 7 semanas de infecção com *S. mansoni* (Figura 5). Comparado aos animais WT, a expressão de Ki-67 estava reduzida em todos os progenitores de monócitos nos camundongos *CD18<sup>low</sup>* (Figura 17A e C). No entanto, a baixa expressão de CD18 aumentou a expressão de Ki-67 nos monócitos inflamatórios (Figura 17D). Não observamos diferenças significativas na expressão de Ki-67 nos monócitos patrulheiros (Figura 17E). Em conjunto, nossos dados demonstram que CD18 afeta a atividade proliferativa de progenitores de monócitos e monócitos inflamatórios durante a esquistossomose crônica.



**Figura 17. A baixa expressão de CD18 diminui o MFI de Ki-67 nos progenitores de monócitos após 7 semanas de infecção com *S. mansoni*.**

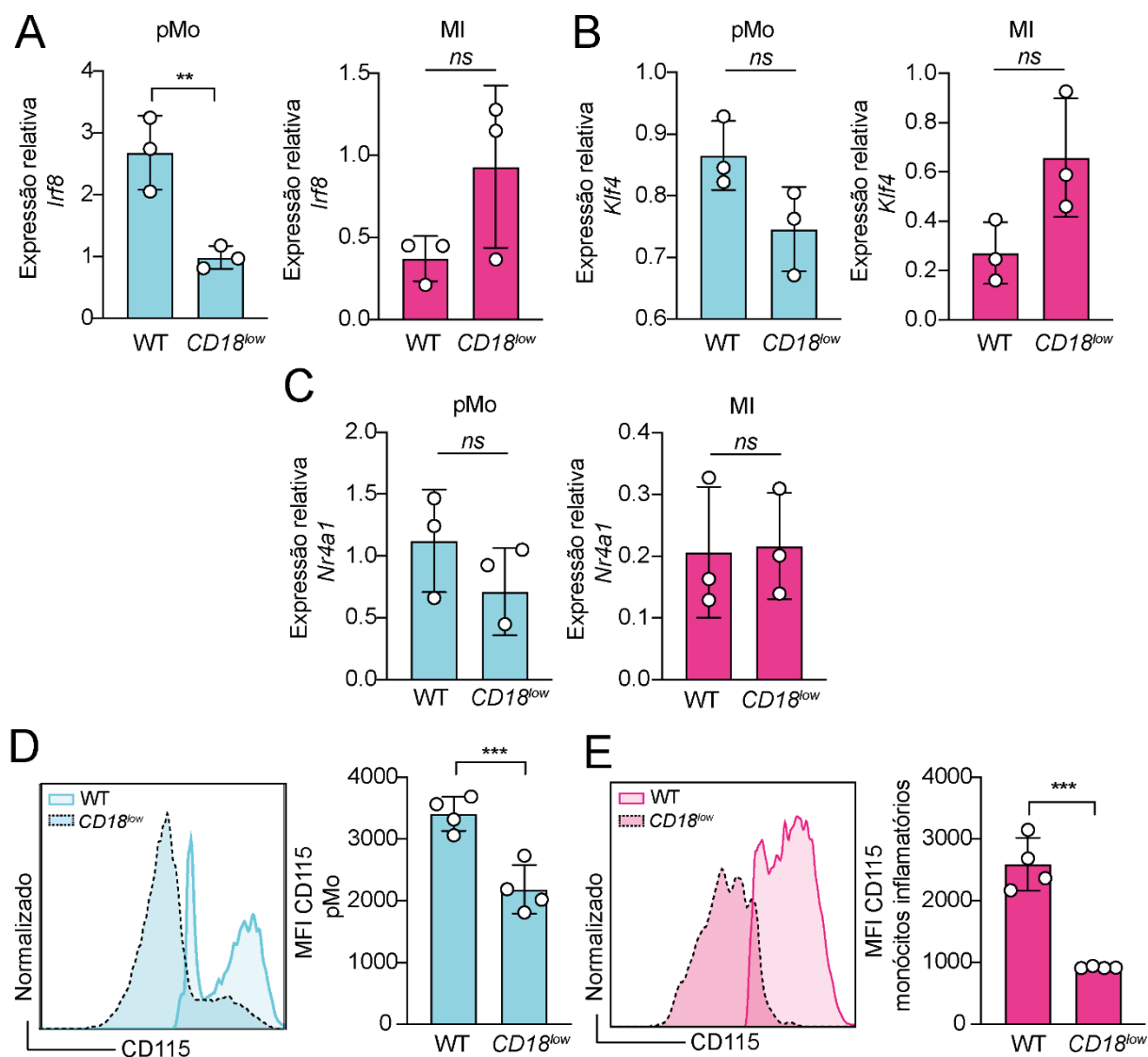
A medula óssea de camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* à 7 semana foram analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos de barras com pontos mostram a expressão de Ki-67 mensurada pelo MFI em progenitores (A) MDP (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>); (B) cMoP (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high/+</sup> CD11b<sup>-</sup>);

(C) pMo (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>low/-</sup>); (D) monócitos inflamatórios (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup>); (E) monócitos patrulheiros (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup>). Os dados representam a média ± SD de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (n= 4 WT e *CD18<sup>low</sup>* por grupo). Os dados foram analisados com teste *t* de Student não pareado. (\* *p* <0,05, \*\*\* *p* <0,001, em comparação ao WT em cada tempo)

#### 4.6. CD18 controla a expressão de IRF8 e CD115 no progenitor de monócitos em proliferação (pMo) durante a infecção crônica por *S. mansoni*.

A baixa expressão de CD18 diminuiu a proliferação do progenitor de monócitos em proliferação (pMo) **Figura 17C**, os quais conseqüentemente acumulam na medula óssea durante a infecção crônica por *S. mansoni* **Figura 16D**. Para elucidar a importância biológica do CD18 no progenitor pMo e nos monócitos inflamatórios (MI), infectamos animais WT e *CD18<sup>low</sup>* com 80 cercárias de *S. mansoni* e, após 7 semanas isolamos por FACS-*cell sorting* essas duas populações celulares da medula óssea, para avaliar os fatores de transcrições que controlam o desenvolvimento de monócitos. Comparado ao progenitor pMo de animais WT, a expressão de *Irf8* foi reduzida nestes progenitores provenientes de animais *CD18<sup>low</sup>* (**Figura 18A**). Não observamos diferenças significativas na expressão de *Irf8* nos monócitos inflamatórios de ambos os grupos (**Figura 18A**). Além disso, não houve diferenças significativas na expressão de *Klf4* (**Figura 18B**) e *Nr4a1* (**Figura 18C**) nos progenitores pMo e nos monócitos inflamatórios de animais WT e *CD18<sup>low</sup>*.

A sinalização de IRF8 induz o receptor do fator 1 estimulador de colônias (CFSR1; também conhecido como CD115), um potente indutor do desenvolvimento de monócitos e macrófagos (ZHAO et al., 2018a). Após 7 semanas de infecção, camundongos *CD18<sup>low</sup>* exibiram expressão reduzida de CD115 no progenitor pMo (**Figura 18D**) e nos monócitos inflamatórios (MI) (**Figura 18E**) quando comparados aos animais WT. Esses resultados demonstram que CD18 é necessário para a expressão de IRF8 e CD115 no progenitor de monócitos em proliferação (pMo) favorecendo o desenvolvimento de monócitos inflamatórios (MI).



**Figura 18. A baixa expressão de CD18 afeta a expressão de IRF8 e CD115 no progenitor de monócitos em proliferação (pMo) durante a esquistossomose crônica.**

Progenitor de monócitos em proliferação (pMo) ( $FVS^- Lin^- CD117^+ CD115^+ Ly6C^+ CD11b^-$ ) e monócitos inflamatórios (IM) ( $FVS^- Lin^- CD117^+ CD115^+ Ly6C^{high/+} CD11b^+$ ) foram purificados da medula óssea de animais WT e  $CD18^{low}$  não infectados e infectados com *S. mansoni* por 7 semanas. Gráficos de barras com pontos mostram a expressão relativa de *Irf8* (A); *Klf4* (B); *Nr4a1* (C) no progenitor pMo e nos monócitos inflamatórios (IM) mensurado por PCR em tempo real (qPCR). Os dados são representativos de um experimento independente. (n=3 camundongos não infectados e 3 camundongos infectados por grupo). Os dados representam a média  $\pm$  SD. As diferenças estatísticas foram avaliadas com teste t de Student não pareado. (\*\* $p < 0,01$  em comparação com progenitor pMo de animais WT). (D) Histograma representativo e gráfico de barras com pontos mostram a expressão de CD115 (CFSR1) no progenitor pMo ( $Lin^- CD117^- CD115^+ CD135^- Ly6C^{high} CD11b^{low/-}$ ) mensurada por MFI. (E) Histograma representativo e gráfico de barras com pontos mostram a expressão de CD115 nos MI ( $Lin^- CD117^- CD115^+ CD135^- Ly6C^{high} CD11b^+$ ) mensurada por MFI. Os dados representam a média  $\pm$  SD de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (n= 5 – 6 WT e n= 6  $CD18^{low}$  por grupo). Os dados foram analisados com teste t de Student não pareado. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , em comparação ao WT em cada tempo)

#### 4.7. A baixa expressão de CD18 reduz os subtipos de monócitos na circulação durante à infecção por *S. mansoni*

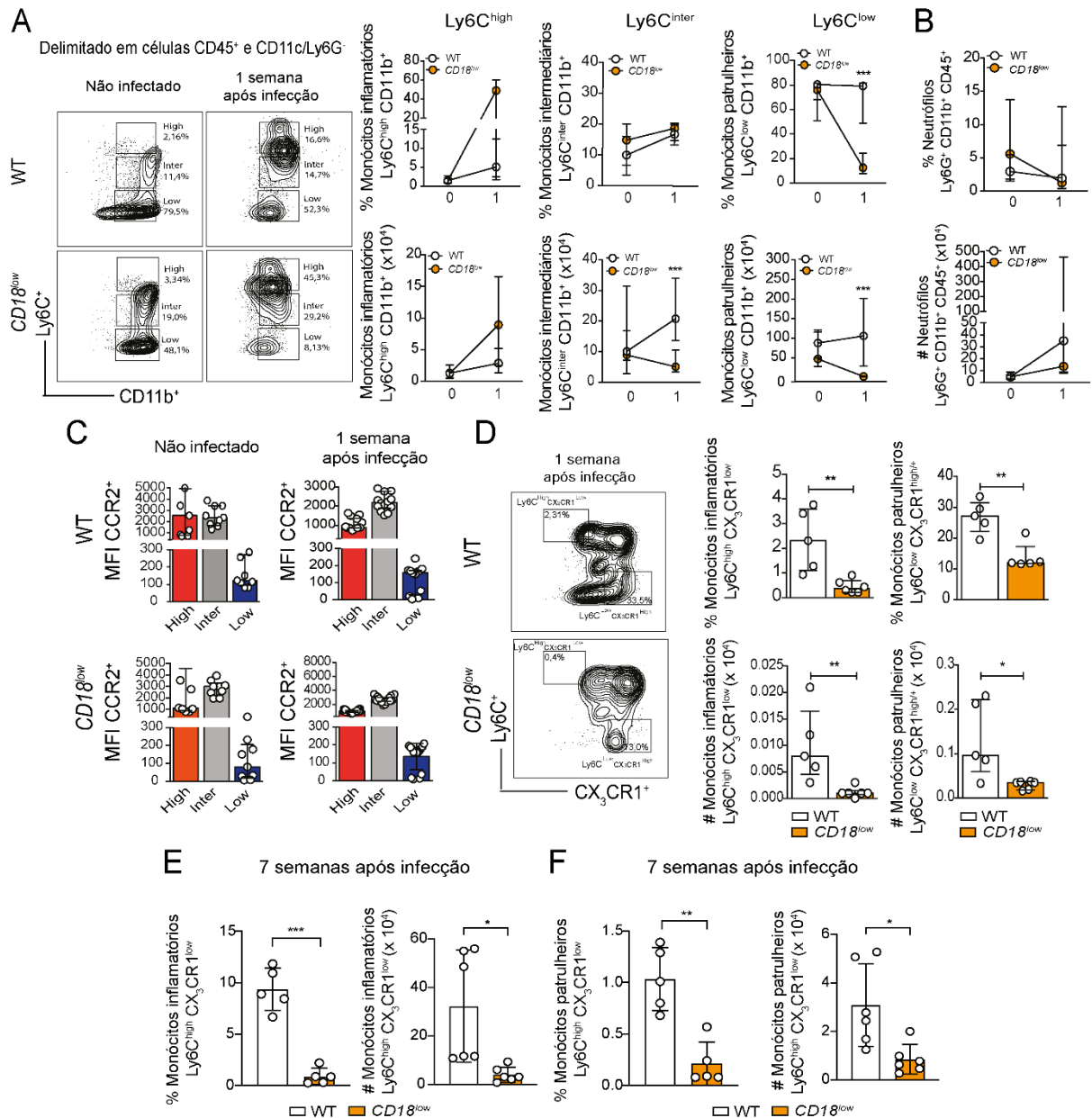
A redução dos subtipos de monócitos na medula óssea de camundongos  $CD18^{low}$ , vista nas **Figura 15 e 16**, sugere que deve ocorrer diminuição destas células na circulação. Assim, nós empregamos citometria de fluxo para analisar os monócitos  $Ly6C^{high}$ ,  $Ly6C^{inter}$  e  $Ly6C^{low}$  no sangue periférico de animais WT e  $CD18^{low}$  infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* após 1 semana (**Figura 6**). Não observamos diferenças significativas na porcentagem e nos números absolutos de monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high}$  entre ambos os grupos de animais (**Figura 19A**). No entanto, o número absoluto de monócitos intermediários  $Ly6C^{inter}$  e, a porcentagem e o número absoluto de monócitos patrulheiros  $Ly6C^{low}$  foram reduzidos no sangue periférico de animais  $CD18^{low}$  infectados. Para confirmar se a baixa expressão de CD18 afeta apenas os monócitos na circulação, avaliamos a população de neutrófilos após 1 semana de infecção com *S. mansoni* (**Figura 8**). A porcentagem e o número absoluto de neutrófilos foram semelhantes entre os animais de ambas as linhagens (**Figura 19B**), confirmando que a baixa expressão de CD18 impacta somente os monócitos durante a infecção por *S. mansoni*.

Cada receptor é expresso de diferentes formas conforme os compartimentos de sua localização. Por exemplo: o receptor  $CX_3CR1$ , que é um marcador fenotípico de monócitos, não é requerido para o desenvolvimento de monócitos na medula óssea, mas é crucial para a saída e manutenção destas células na circulação durante a homeostase (LANDSMAN et al., 2009). Além disso, os monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high}$  são caracterizados pela alta expressão CCR2 (KAWAMURA; OHTEKI, 2018), que auxilia no recrutamento destas células para o sitio inflamatório durante a esquistossomose (NASCIMENTO et al., 2014)

Neste sentido, para confirmar as subpopulações de monócitos presentes na circulação dos animais  $CD18^{low}$ , incluímos os marcadores CCR2 (**Figura 6**) e  $CX_3CR1$  (**Figura 7**) em nossas análises. Nossos resultados confirmam que a expressão de CCR2 é alta nos monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high}$  e monócitos patrulheiros  $Ly6C^{inter}$  (**Figura 19C**). Com a inclusão do  $CX_3CR1$ , confirmamos que os monócitos patrulheiros  $Ly6C^{low}$   $CX_3CR1^{high/+}$  estavam realmente reduzidos no sangue periférico após uma semana de infecção por *S. mansoni* (**Figura 19D**). No entanto, nossos

dados mostram que os monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low</sup> também foram reduzidos no sangue periférico (**Figura 19D**).

Por fim, avaliamos os monócitos circulantes na fase crônica da infecção. Comparados aos animais WT, a porcentagem e o número absoluto dos monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low</sup> (**Figura 19E**) e monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> (**Figura 19F**) estavam reduzidos no sangue periférico de camundongos CD18<sup>low</sup> após 7 semanas de infecção com *S. mansoni*. Em conjunto nossos resultados demonstram que baixa expressão de CD18 afeta diretamente os subtipos de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low</sup> e monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> no sangue periférico ao longo da infecção por *S. mansoni*.



**Figura 19. A baixa expressão de CD18 reduz os monócitos inflamatórios e monócitos patulheiros no sangue periférico ao longo da infecção por *S. mansoni*.**

Sangue periférico de camundongos WT e CD18<sup>low</sup> não infectados e infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* foram avaliados por citometria de fluxo na 1<sup>o</sup> e na 7<sup>o</sup> semana após a infecção. **(A)** Gráficos de contorno representativos e gráficos de linha mostram a porcentagem e os números absolutos dos subtipos de monócitos Ly6C<sup>high</sup>, Ly6C<sup>inter</sup> e Ly6C<sup>low</sup> (CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> Ly6C<sup>+</sup>) no sangue periférico após uma semana de infecção (1). **(B)** Gráficos de linha mostram a porcentagem e os números absolutos de neutrófilos (CD45<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) no sangue periférico de animais infectados após uma semana. **(C)** Gráfico de barras com pontos mostram a expressão CCR2 mensurada pelo MFI em monócitos Ly6C<sup>high</sup>, Ly6C<sup>inter</sup> e Ly6C<sup>low</sup> (CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> Ly6C<sup>+</sup>) do sangue periférico após uma semana de infecção. **(D)** Gráficos de contorno e gráficos de barra com pontos mostram os monócitos inflamatórios e monócitos patulheiros no sangue periférico, incluindo o marcador CX<sub>3</sub>CR1, após uma semana de infecção. **(E)** Gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem e o número absoluto de monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low</sup>) no sangue periférico de animais infectados por 7 semanas. **(F)** Gráficos de barras com pontos mostram

a porcentagem e o número absoluto de monócitos patrulheiros (Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup>) no sangue periférico de animais infectados por 7 semanas. Os dados representam as medianas ± intervalo interquartil (**A – D**) ou a média ± SD (**E – F**) de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (n= 2 controles não infectados e 5-6 camundongos infectados por grupo após 1<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> semana de infecção). Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn (**A – D**) ou utilizando teste t de Student não pareado (**E – F**) (\* p<0,05, \*\* p< 0,01, \*\*\* p< 0,001 comparado ao WT em cada tempo)

#### **4.8. A baixa expressão de CD18 diminui os monócitos patrulheiros no pulmão durante a esquistossomose aguda.**

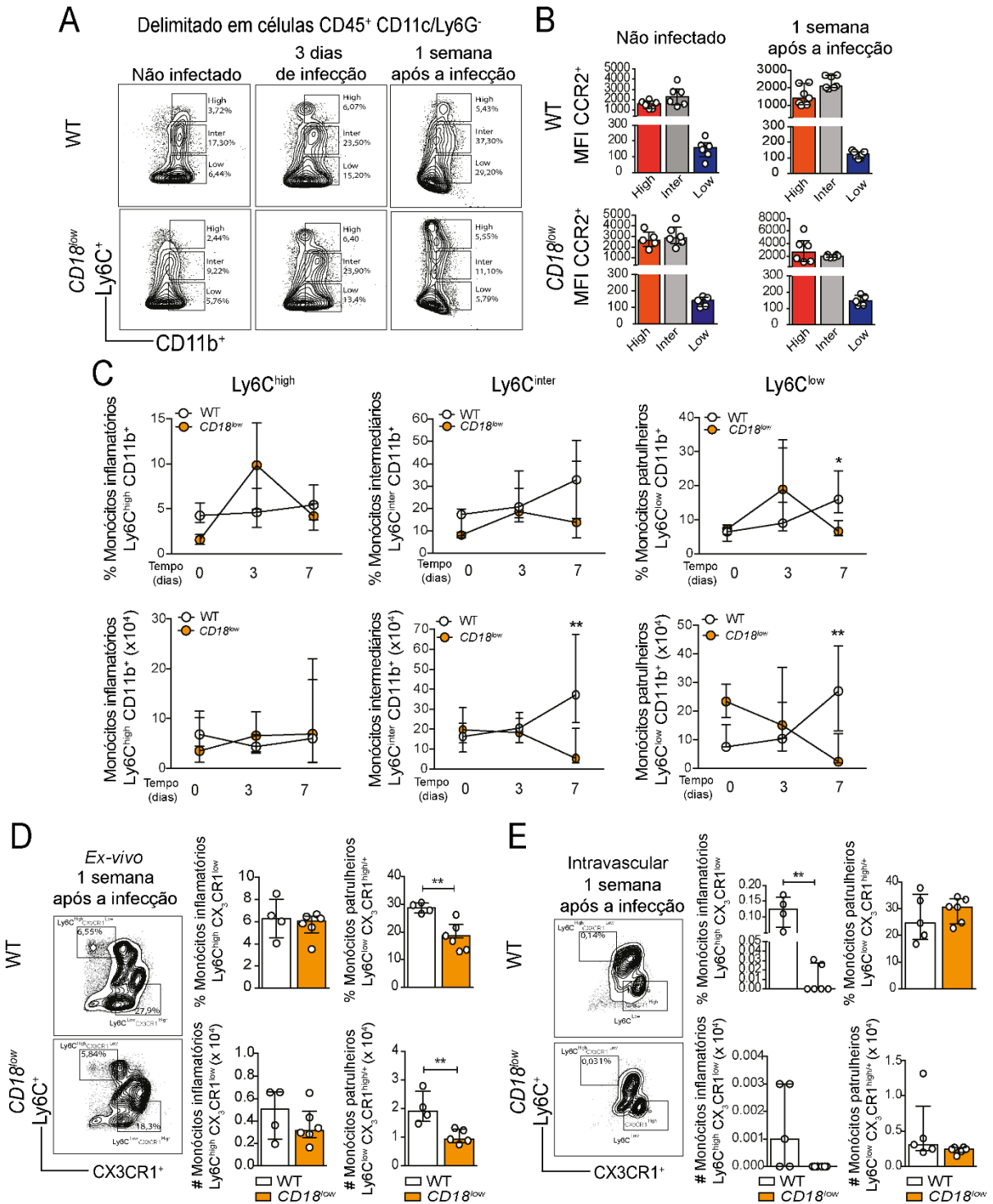
Ao longo da infecção por *S. mansoni*, os esquistossômulos que migram pelos vasos sanguíneos atingem o pulmão nos primeiros dias (WILSON, 2009), que é um local eficaz para eliminação dos parasitas (DOMBROWICZ et al., 2000). Para determinar o papel do CD18 durante a passagem do *S. mansoni* através do pulmão, avaliamos o acúmulo dos subtipos de monócitos em camundongos WT e CD18<sup>low</sup> nos primeiros dias de infecção (**Figura 6**). Após 1 semana, confirmamos que os subtipos de monócitos apresentam expressão diferencial de CCR2 (**Figura 20A e B**). Como esperado, os monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> expressam altos níveis de CCR2, enquanto os monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> expressam baixos níveis deste receptor (**Figura 20A e B**). Ao decorrer de uma semana de infecção (0, 3 e 7 dias), observamos que tanto a porcentagem como o número absoluto de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> permaneceram inalterados nos pulmões de animais WT e CD18<sup>low</sup> infectados com *S. mansoni* (**Figura 20A e C**). No entanto, o número absoluto de monócitos intermediários Ly6C<sup>inter</sup> foi reduzido nos pulmões de animais CD18<sup>low</sup> após uma semana de infecção (**Figura 20A e C**). Além disso, ambos, porcentagem e número absoluto de monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> estavam reduzidos nos pulmões dos animais CD18<sup>low</sup> após uma semana de infecção com *S. mansoni* (**Figura 20A e C**). Esses dados sugerem que CD18 regula o acúmulo dos subtipos de monócitos no pulmão nos primeiros dias de infecção.

Para obter maior confiança que a expressão de CD18 adequada é necessária para o acúmulo de monócitos patrulheiros no pulmão, avaliamos os subtipos de monócitos incluindo o marcador CX<sub>3</sub>CR1 (**Figura 7**). Corroborando nossas análises anteriores, os monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low</sup> permaneceram inalterados nos pulmões de ambos os grupos experimentais (**Figura 20D**). Em contraste, a porcentagem e o número absoluto de monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup>



foram reduzidos nos pulmões de animais  $CD18^{low}$  após uma semana de infecção com *S. mansoni* (**Figura 20D**).

Os monócitos patrulheiros  $Ly6C^{low} CX_3CR1^{high/+}$  circulam pelo endotélio da vasculatura de modo dependente de CD18 e invadem rapidamente os tecidos após estímulos inflamatórios (AUFFRAY et al., 2007). Embora os esquistossômulos circulem pelo pulmão, eles não transmigram ativamente para o parênquima, mas se acumulam no capilares, onde causam danos aos tecidos devido seu grande tamanho (CRABTREE; WILSON, 1986). Portanto, é possível que os monócitos patrulheiros também estejam reduzidos nos capilares pulmonares, além do parênquima. Para testar esta hipótese, realizamos marcação intravascular usando anticorpo anti-CD45 para rastrear os leucócitos presentes nos capilares pulmonares de camundongos WT e  $CD18^{low}$  infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* após uma semana de infecção (**Figura 12**). Curiosamente, apenas a porcentagem de monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high} CX_3CR1^{low}$  de animais  $CD18^{low}$  foi reduzida na vasculatura pulmonar em comparação com camundongos WT (**Figura 20E**), mas não houve alterações significativas destas células no tecido pulmonar (**Figura 20D**), indicando que os monócitos inflamatórios são capazes de infiltrarem no tecido pulmonar de modo independente de CD18. Em contraste, os monócitos patrulheiros  $Ly6C^{low} CX_3CR1^{high/+}$  foram igualmente representados na vasculatura pulmonar de camundongos WT e  $CD18^{low}$  (**Figura 20E**), demonstrando que a baixa expressão de CD18 afeta a entrada destas células para o pulmão no início da infecção (**Figura 20E**). Em conjunto, nossos dados indicam que a expressão adequada de CD18 é necessária para a manutenção monócitos patrulheiros na vasculatura e sua entrada no parênquima em momentos iniciais da infecção por *S. mansoni*.



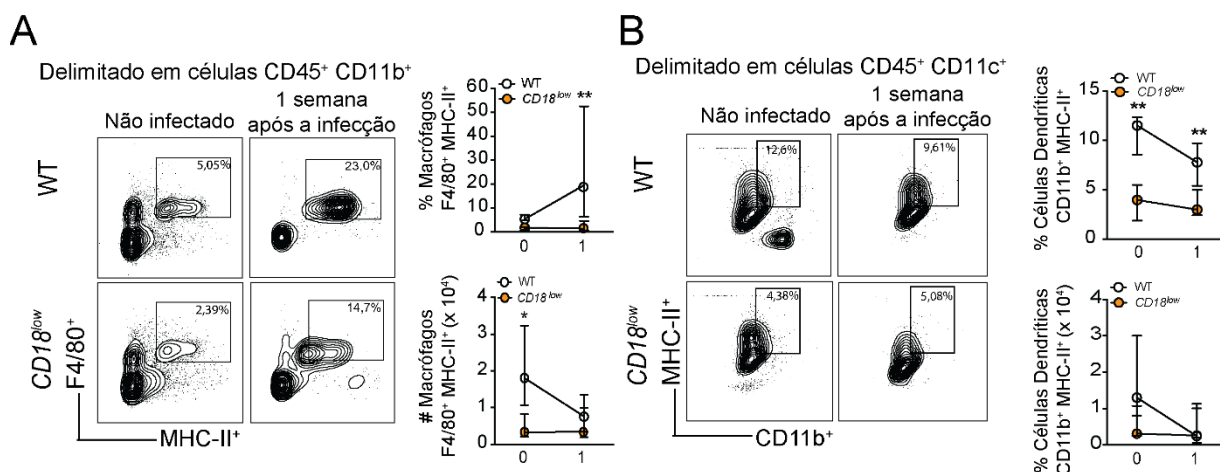
**Figura 20. A baixa expressão de CD18 diminui o acúmulo de monócitos patrulheiros nos pulmões de animais infectados com *S. mansoni*.**

Os pulmões de camundongos WT e CD18<sup>low</sup> não infectados e infectados com *S. mansoni* nos dias 0, 3 e 7 foram analisados por citometria de fluxo. **(A)** Os gráficos de contorno mostram os dados representativos da citometria de fluxo de monócitos CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>. **(B)** Os gráficos de barras com pontos mostram a expressão de CCR2 mensurada pelo MFI nos subtipos de monócitos avaliados pela expressão Ly6C antes e após uma semana de infecção. **(C)** Os gráficos de linha mostram a cinética de porcentagem e números absolutos dos subtipos de monócitos Ly6C no pulmão. Os dados representam as medianas ± intervalo interquartil de dois experimentos independentes juntos. (n = 4-6 controles não infectados e 11-

13 camundongos infectados por grupo nos diferentes tempos). Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  comparado ao WT em cada tempo). **(D)** Os gráficos de contorno mostram os dados representativos da citometria de fluxo e os gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem e os número absolutos de monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high} CX_3CR1^{low}$  e monócitos patrulheiros  $Ly6C^{low} CX_3CR1^{high/+}$  no tecido pulmonar de animais infectados após uma semana. **(E)** Os gráficos de contorno mostram os dados representativos da citometria de fluxo e os gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem e os número absolutos de monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high} CX_3CR1^{low}$  e monócitos patrulheiros  $Ly6C^{low} CX_3CR1^{high/+}$  na vasculatura pulmonar após uma semana de infecção. Os dados representam as medianas  $\pm$  intervalo interquartil de um experimento independente. ( $n = 6$  WT e  $CD18^{low}$  por grupo). Os dados foram analisados com o teste de Man-Whitney (\*\* $p < 0.01$  comparado ao WT em cada ponto)

#### **4.9. A baixa expressão de CD18 reduz macrófagos (MDMs) e células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos no pulmão após a infecção por *S. mansoni*.**

Uma vez que se infiltram nos focos inflamatórios, os monócitos podem se diferenciar em macrófagos derivados de monócitos (MDMs) ou células dendríticas derivadas de monócitos (MDCs) (UDALOVA; MANTOVANI; FELDMANN, 2016), que se caracterizam principalmente pela expressão dos marcadores de superfícies F4/80 e CD11c, respectivamente **(Figura 9)**. Comparado aos animais WT não infectados, o número absoluto de MDMs pulmonares foram reduzidos em animais  $CD18^{low}$  sem infecção **(Figura 21A)**. Apesar disso, a porcentagem de MDMs pulmonares foi significativamente maior em animais WT quando comparado aos animais  $CD18^{low}$  **(Figura 21A)**, cuja porcentagem e número absoluto já eram baixos antes da infecção e permaneceram inalterados após uma semana de infecção **(Figura 21A)**. Além disso, observamos que a porcentagem de MDCs nos pulmões foram reduzidas em animais  $CD18^{low}$ , tanto antes como após uma semana de infecção **(Figura 21B)**. Tomando em conjunto, esses dados sugerem que a falha na entrada de monócitos específicos para os pulmões de animais  $CD18^{low}$  **(Figura 20)** afeta o acúmulo de macrófagos (MDMs) e células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos após uma semana de infecção com *S. mansoni*.



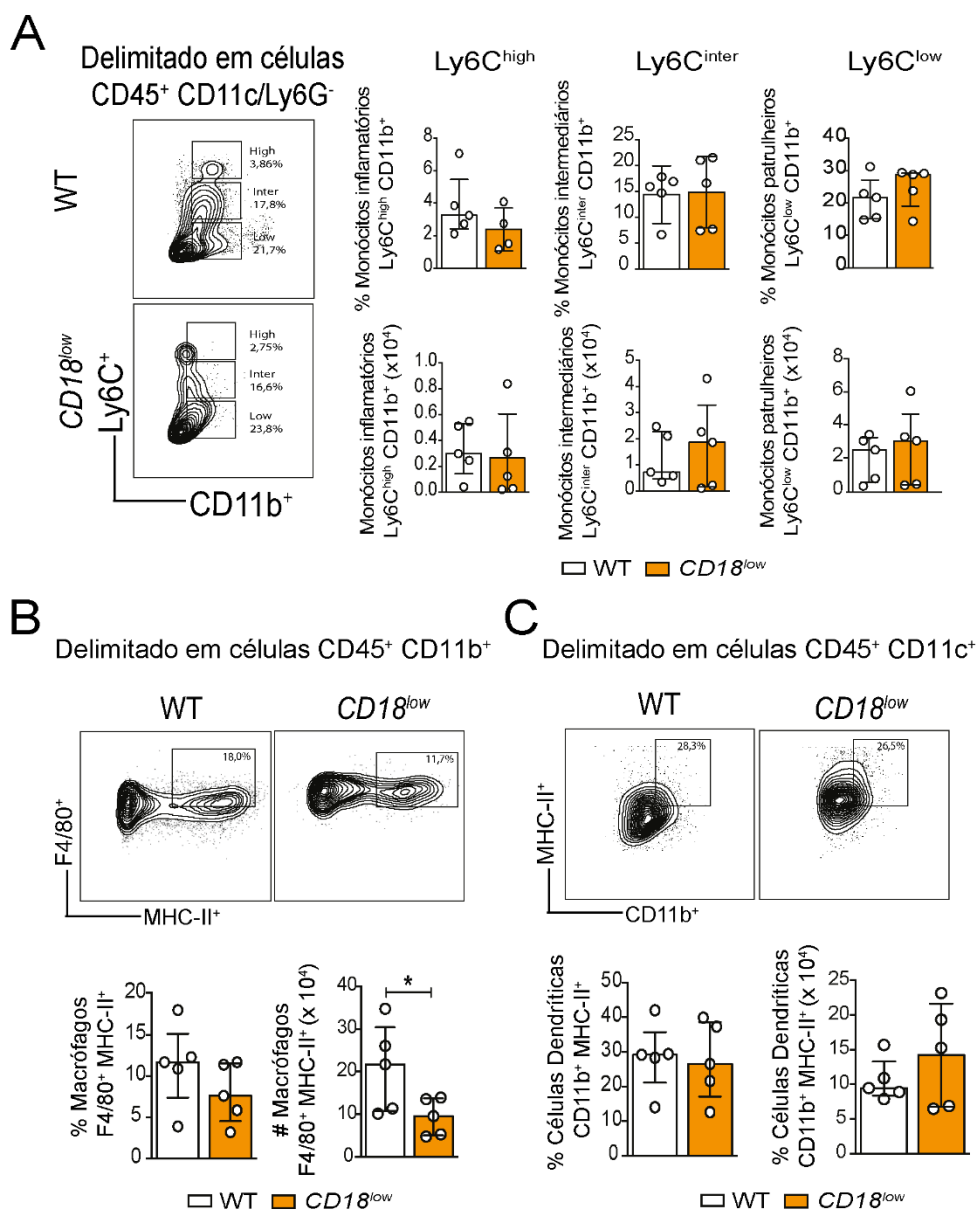
**Figura 21. Animais  $CD18^{low}$  apresentam redução na frequência de macrófagos (MDMs) e células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos nos pulmões durante a esquistossomose aguda.**

Os pulmões de camundongos WT e  $CD18^{low}$  não infectados e infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* foram avaliados por citometria de fluxo após uma semana de infecção. Os gráficos de contorno mostram os dados representativos da citometria de fluxo e os gráficos de linhas mostram a cinética de porcentagem e números absolutos de **(A)** macrófagos (MDMs) ( $CD45^+$   $CD11b^+$   $F4/80^+$   $MHC-II^+$ ) e **(B)** células dendríticas (MDCs) ( $CD45^+$   $CD11c^+$   $MHC-II^+$   $CD11b^+$ ) derivadas de monócitos. Os dados representam as medianas  $\pm$  intervalo interquartil de dois experimentos independentes juntos. ( $n = 4-6$  controles não infectados e 11-13 camundongos infectados por grupo em 3 e 7 dias). Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  comparado ao WT em cada tempo)

#### 4.10. A baixa expressão de CD18 não prejudica o recrutamento de monócitos e a diferenciação em macrófagos (MDMs) e células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos nos pulmões durante a esquistossomose crônica.

Em seguida, avaliamos o acúmulo de monócitos (**Figura 6**), macrófagos (MDMs) e células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos (**Figura 9**) nos pulmões de animais WT e  $CD18^{low}$  infectados com *S. mansoni* após 7 semanas. Não observamos diferenças significativas nos subtipos de monócitos de ambos os camundongos (**Figura 22A**). Comparados aos animais WT, observamos discreta redução na porcentagem de MDMs nos pulmões de animais  $CD18^{low}$  (**Figura 22B**). Por fim, não observamos diferenças significativas de MDCs entre ambos os grupos experimentais (**Figura 22C**). Esses resultados sugerem que a baixa expressão de CD18 não afeta o acúmulo de monócitos, macrófagos (MDMs) e células dendríticas

(MDCs) derivadas de monócitos no pulmão durante a fase crônica da esquistossomose.

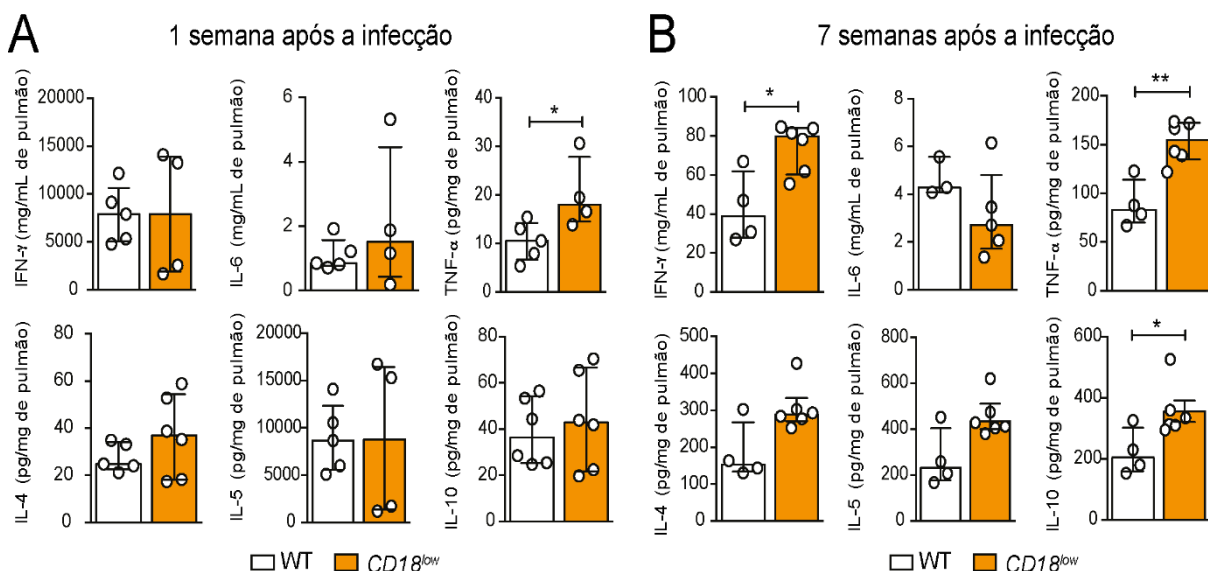


**Figura 22. A baixa expressão de CD18 não altera o acúmulo de monócitos, macrófagos (MDMs) e células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos no pulmão após 7 semanas de infecção com *S. mansoni*.**

Os pulmões de camundongos WT e  $CD18^{low}$  infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* foram avaliados por citometria de fluxo após 7 semanas de infecção. Os gráficos de contorno mostram os dados representativos da citometria de fluxo e os gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem e números absolutos dos subtipos de monócitos através da expressão de Ly6C (**A**). Os gráficos de contorno mostram os dados representativos da citometria de fluxo e os gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem e números absolutos de macrófagos (MDMs) ( $CD45^+ CD11b^+ F4/80^+ MHC-II^+$ ) (**B**), e células dendríticas (MDCs) ( $CD45^+ CD11c^+ MHC-II^+ CD11b^+$ ) (**C**) derivadas de monócitos. Os dados representam as medianas  $\pm$  intervalo interquartil de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (n= 4-5 WT e  $CD18^{low}$  infectados por grupo). Os dados foram analisados com o teste de Man-Whitney (\*p<0.05 comparado ao WT em cada ponto).

#### 4.11. CD18 regula a produção de citocinas nos pulmões durante a esquistossomose.

Durante os estágios iniciais da infecção por *S. mansoni*, no hospedeiro, as células imune reconhecem os antígenos do parasita e iniciam a produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , mas uma vez que os parasitas amadurecem e ocorre a deposição dos ovos, esse perfil muda para a produção de IL-4, IL-13, IL-5, IL-10 (PEARCE; MACDONALD, 2002). Para esclarecer o impacto do CD18 no perfil de citocinas pulmonares durante as fases iniciais e posteriores da infecção, animais WT e *CD18<sup>low</sup>* foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* e, na 1<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> semana após a infecção os pulmões foram coletados. Após uma semana de infecção, apenas os níveis de TNF- $\alpha$  foram significativamente aumentados nos pulmões de animais *CD18<sup>low</sup>* quando comparado aos animais WT (**Figura 23A**). Curiosamente, mesmo após a passagem do parasita pelo pulmão e maturação no fígado e intestino (fase crônica), os animais *CD18<sup>low</sup>* apresentaram níveis aumentados de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-10 na 7<sup>a</sup> semana de infecção (**Figura 23B**). Esses dados indicam que CD18 é necessário para o equilíbrio da produção de citocinas durante momento iniciais e crônicos da esquistossomose.



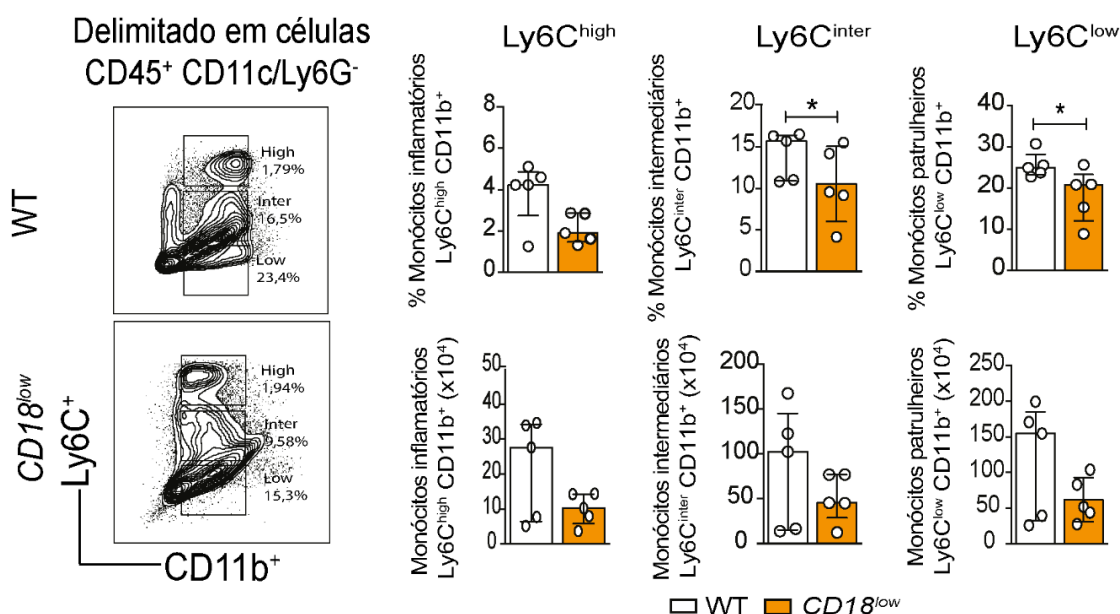
**Figura 23. CD18 é necessário para a produção adequada de citocinas nos pulmões de animais infectados com *S. mansoni*.**

Pulmões de animais WT e *CD18<sup>low</sup>* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* foram coletados após a 1<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> semana de infecção para análise de citocinas por ensaio de ELISA. Os gráficos de barras com pontos mostram a quantificação de IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 e IL-10 por ELISA na 1<sup>a</sup> (**A**) e 7<sup>a</sup> (**B**) semana após a infecção. Os dados representam as medianas  $\pm$  intervalo interquartil de um de dois experimentos independentes. (n = 4-6 WT e *CD18<sup>low</sup>*)

infectados por grupo após 1 e 7 semanas). Os dados foram analisados com Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  comparado ao WT em cada tempo)

#### 4.12. A baixa expressão de CD18 diminui os monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup> no fígado durante a esquistossomose crônica.

A formação de granulomas ao redor do ovos de *S. mansoni* requer o recrutamento de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros para o fígado (GIRGIS et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014; ROLOT et al., 2019; RÜCKERL; COOK, 2019). Assim, procuramos investigar se o CD18 é necessário para o acúmulo eficiente dos subtipos de monócitos no fígado após 7 semanas de infecção com *S. mansoni* (Figura 6). Comparado aos animais WT, as porcentagens de monócitos Ly6C<sup>inter</sup> e de monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> foram reduzidas no fígado dos animais CD18<sup>low</sup>, enquanto os monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> não foram alterados significativamente entre os grupos experimentais (Figura 24).

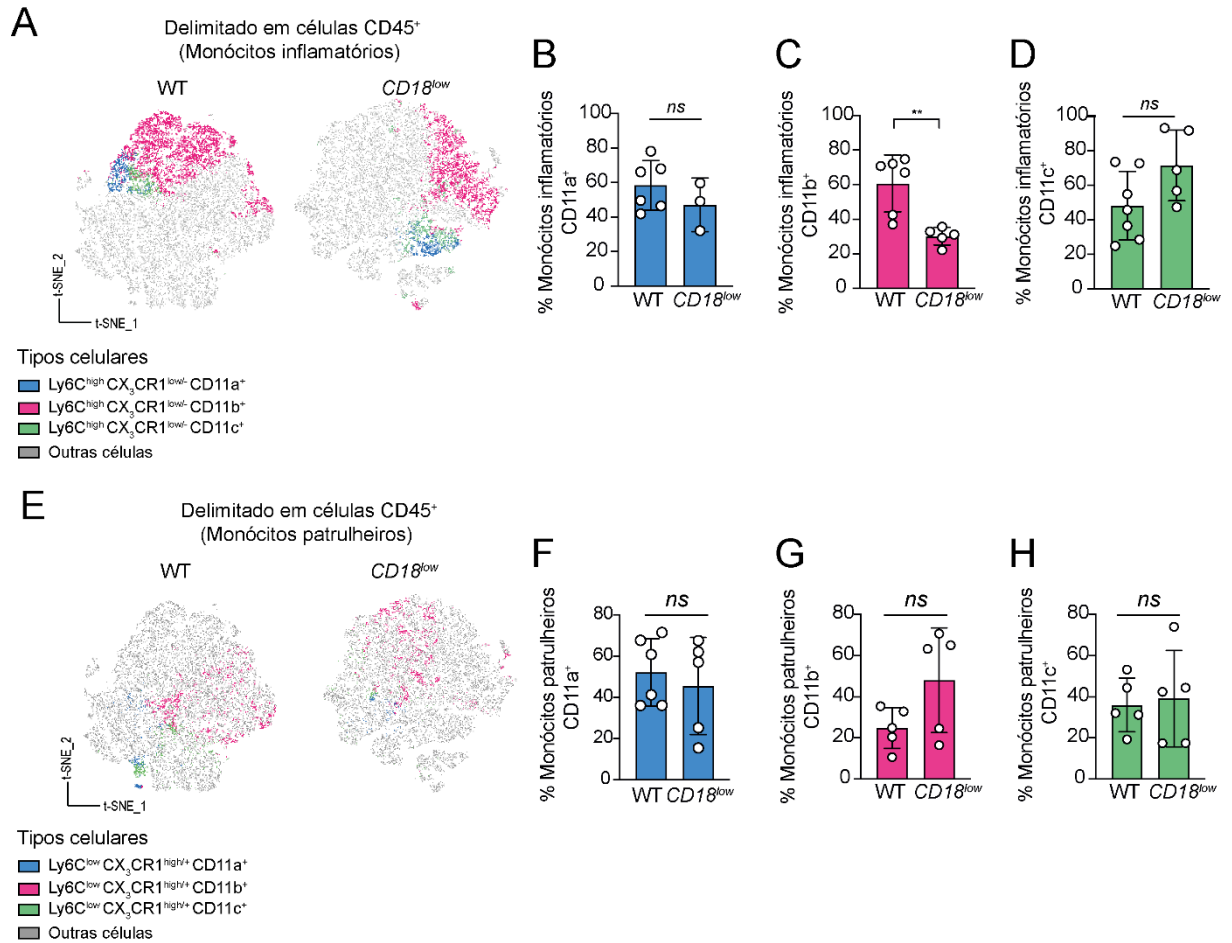


**Figura 24. A baixa expressão de CD18 diminui a porcentagem de monócitos intermediários Ly6C<sup>inter</sup> e monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> no fígado após 7 semanas de infecção com *S. mansoni*.**

Fígado de camundongos WT e CD18<sup>low</sup> infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* foram avaliados por citometria de fluxo após 7 semanas de infecção. Os gráficos de contorno mostram os dados representativos da citometria de fluxo e os gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem e números absolutos dos subtipos de monócitos avaliados pela expressão de Ly6C. Os dados representam as medianas  $\pm$  intervalo interquartil de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (n= 4-5 WT e CD18<sup>low</sup> infectados por grupo). Os dados foram analisados com o teste de Man-Whitney (\* $p < 0.05$  comparado ao WT em cada ponto)

Em seguida, para aumentar a confiabilidade dos nossos dados e confirmar as subpopulações de monócitos, incluímos o marcador CX<sub>3</sub>CR1 e, também, avaliamos a frequência das subunidades  $\alpha$  de integrinas  $\beta_2$  em cada subpopulações de monócitos presentes no fígado de animais WT e *CD18<sup>low</sup>* (**Figura 10**). Primeiro, realizamos um mapa t-SNE que mostrou a distribuição das subunidades  $\alpha$  CD11a<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> em monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> (**Figura 25A**) e monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> (**Figura 25E**) no fígado. Não observamos diferenças significativas na porcentagem de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> CD11a<sup>+</sup> (**Figura 25A e B**) e monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> CD11c<sup>+</sup> (**Figura 25A e D**) entre os grupos experimentais. No entanto, a porcentagem de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup> foi reduzida em camundongos *CD18<sup>low</sup>* infectados (**Figura 25A e C**). Além disso, descobrimos que a baixa expressão de CD18 não prejudica a porcentagem dos monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> que expressam CD11a<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> no fígado dos camundongos WT e *CD18<sup>low</sup>* após 7 semanas de infecção com *S. mansoni* (**Figura 25 E e H**). Em conjunto, esses dados indicam que a baixa expressão de CD18 diminui os monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> que expressam CD11b<sup>+</sup> no fígado durante a infecção crônica com *S. mansoni*.



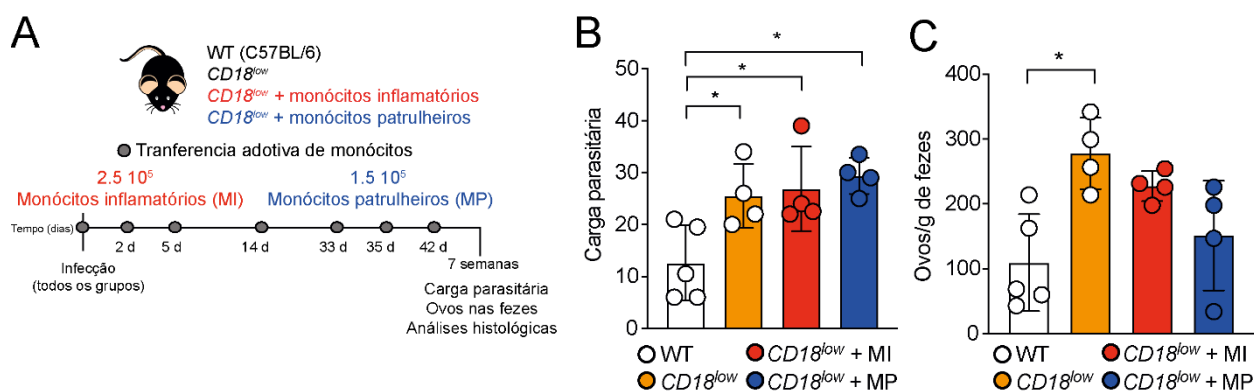


**Figura 25. A baixa expressão de CD18 prejudica a subunidade CD11b<sup>+</sup> em monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> no fígado de animais infectados cronicamente com *S. mansoni*.**

Animais WT e  $CD18^{low}$  foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* e após 7 semanas de infecção o fígado foi coletado para análise de citometria de fluxo. O mapa t-SNE representativo mostra os monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> que expressam CD11a<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> (A). Os gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> CD11a<sup>+</sup> (B); monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup> (C); e monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> CD11c<sup>+</sup> (D). O mapa t-SNE representativo mostra os monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> que expressam CD11a<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> (E). Os gráficos de barras com pontos mostram a porcentagem de monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> CD11a<sup>+</sup> (F); monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> CD11b<sup>+</sup> (G); e monócitos patrulheiros Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> CD11c<sup>+</sup> (H). Os dados representam um de dois experimentos independentes (n= 4-6 WT n= 3-5  $CD18^{low}$  infectados por grupo). Os dados representam a média ± SD. As diferenças estatísticas foram avaliadas com teste *t* de Student não pareado. (\*\* p < 0,01 em comparação ao WT)

#### 4.13. A transferência adotiva de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup> reverte o dano hepático de animais CD18<sup>low</sup> infectados cronicamente com *S. mansoni*

Para validar a função biológica dos monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros durante a esquistossomose experimental, isolamos da medula óssea de animais não infectados CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/+</sup> os monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/-</sup>) e monócitos patrulheiros (Ly6C<sup>-</sup> Ly6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/+</sup>), e em seguida transferimos essas células para camundongos CD18<sup>low</sup> infectados com 80 cercárias de *S. mansoni*, de acordo com o delineamento experimental da **Figura 26A**. Semelhante ao dados da **Figura 13B e C**, os camundongos CD18<sup>low</sup> tem maior carga de vermes (**Figura 26B**) e maior deposição de ovos (**Figura 26C**) nas fezes quando comparado aos animais WT após 7 semanas de infecção com *S. mansoni*. A transferência adotiva de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros para animais CD18<sup>low</sup> não alterou a carga parasitária (**Figura 26B**) e nem a deposição de ovos nas fezes (**Figura 26C**). Em conjunto, nossos demonstram que os monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros não estão relacionados ao controle parasitológico ao longo da infecção por *S. mansoni*.

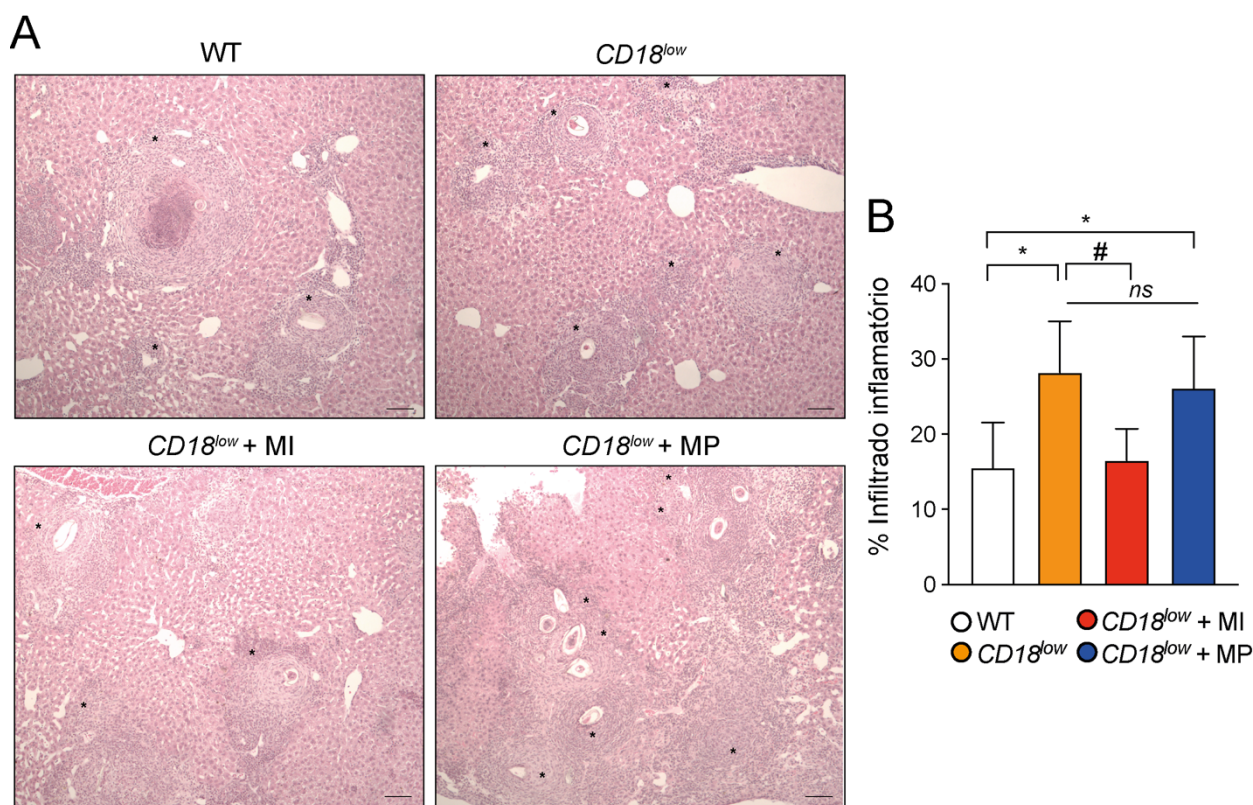


**Figura 26. A transferência adotiva de monócitos inflamatórios e monócitos patrulheiros não altera os parâmetros parasitológicos de animais CD18<sup>low</sup> infectados com *S. mansoni*.**

Animais WT e CD18<sup>low</sup> foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni*. **(A)** O esquema representa o delineamento experimental da transferência adotiva de monócitos inflamatórios (2,5 x 10<sup>5</sup>) e monócitos patrulheiros (1,5 x 10<sup>5</sup>) isolados da medula óssea de animais não infectados CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/+</sup>. **(B)** O gráfico de barras com pontos mostra a carga parasitária (vermes) determinada por perfusão do sistema porta hepático após 7 semanas de infecção. **(C)** O gráfico de barras com pontos mostra o número de ovos/g de fezes após 7 semanas de infecção. Os dados representam a média ± SD de um experimento (n=5 WT infectados, n= 4 CD18<sup>low</sup> infectados, n= 4 CD18<sup>low</sup> infectados tratados com monócitos inflamatórios e/ou

monócitos patrulheiros). Os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Bonferroni (\*  $p < 0,05$  comparado aos animais WT).

Em seguida, avaliamos o infiltrado inflamatório do fígado de ambos os grupos experimentais empregando coloração de H&E. Como visto na **Figura 14**, animais  $CD18^{low}$  apresentaram maior número de granulomas e aumento da porcentagem do infiltrado inflamatório ao redor dos ovos presentes por todo tecido hepático quando comparado aos animais WT (**Figura 27A e B**). No entanto, a transferência de monócitos inflamatórios para camundongos  $CD18^{low}$  infectados diminuiu o número de granulomas (**Figura 27A**) e o infiltrado inflamatório (**Figura 27B**) ao redor dos ovos de *S. mansoni*, assemelhando-se aos camundongos WT. Não observamos diferenças significativas nos granulomas e no infiltrado inflamatório ao redor dos ovos após a transferência de monócitos patrulheiros (**Figura 27A e B**).

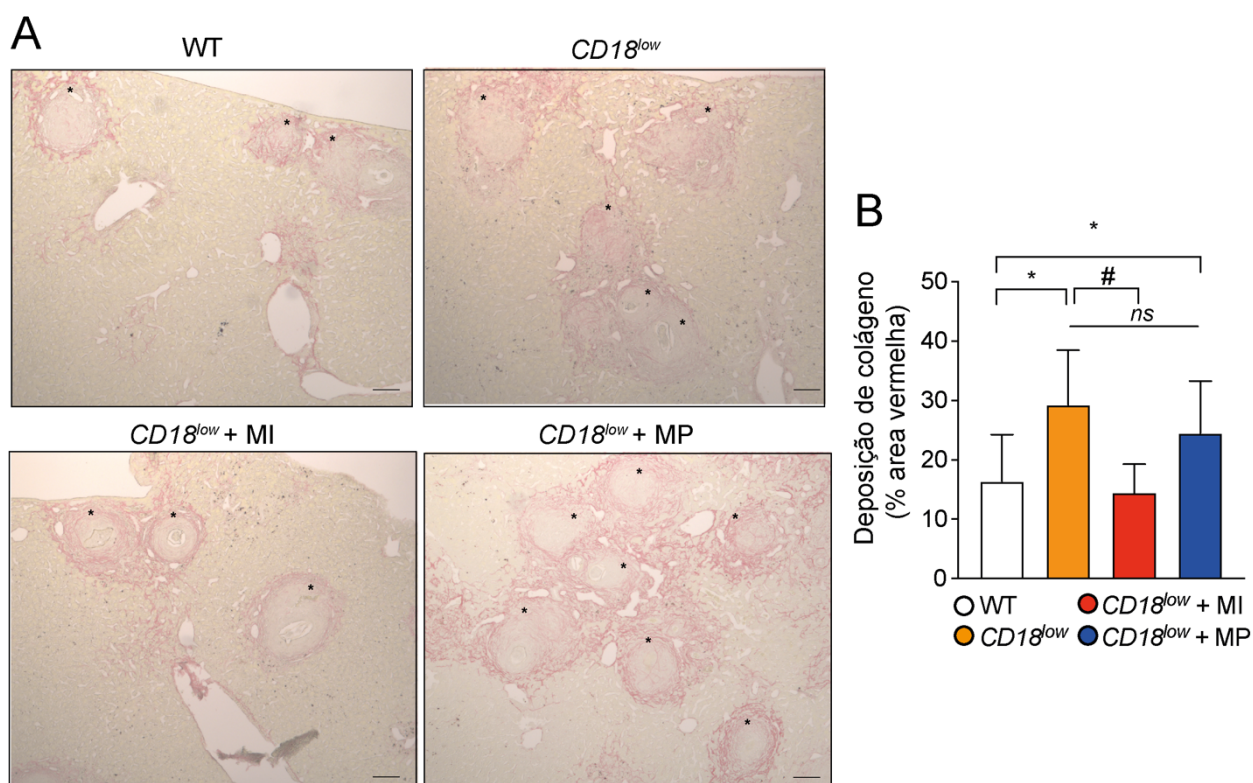


**Figura 27. A transferência adotiva de monócitos inflamatórios diminui o infiltrado inflamatório no fígado de animais  $CD18^{low}$  infectados cronicamente com *S. mansoni*.**

Animais WT e  $CD18^{low}$  infectados com 80 cerarias de *S. mansoni* receberam adotivamente monócitos inflamatórios ( $2,5 \times 10^5$ ) e monócitos patrulheiros ( $1,5 \times 10^5$ ) previamente isolados da medula óssea de animais não infectados  $CX_3CR1^{gfp/+}$ . **(A)** Fotomicrografias representativas (aumento de 100x) do fígado coradas com H&E. **(B)** O gráfico de barras representa a área de marcação dos granulomas hepáticos. Os dados representam a média  $\pm$  SD de um experimento (n=5 WT infectados, n= 4  $CD18^{low}$  infectados, n= 4  $CD18^{low}$  infectados tratados com monócitos inflamatórios e/ou monócitos patrulheiros). Os dados foram analisados pelo

teste one-way ANOVA seguido de Bonferroni (\*  $p < 0,05$  comparado aos animais WT ou #  $p < 0,05$  comparado aos animais  $CD18^{low}$  infectados).

Por fim, avaliamos a fibrose hepática empregando a coloração de picrossírus. Comparado aos animais WT, a deposição de colágeno ao redor dos ovos de *S. mansoni* é maior nos animais  $CD18^{low}$  (Figura 28A e B). A transferência adotiva de monócitos inflamatórios diminuiu a deposição de colágeno ao redor dos ovos quando comparado aos animais  $CD18^{low}$  infectados (Figura 28A e B). Não observamos diferenças significativas na fibrose hepática após a transferência de monócitos patrulheiros para animais  $CD18^{low}$  infectados (Figura 28A e B). Em conjunto, nossos dados mostram que CD18 é crucial para manutenção e função dos monócitos inflamatórios no fígado, uma vez que, a transferência adotiva de monócitos inflamatórios controla dano tecidual e fibrose causada em resposta ao ovo de *S. mansoni* nos animais  $CD18^{low}$ .



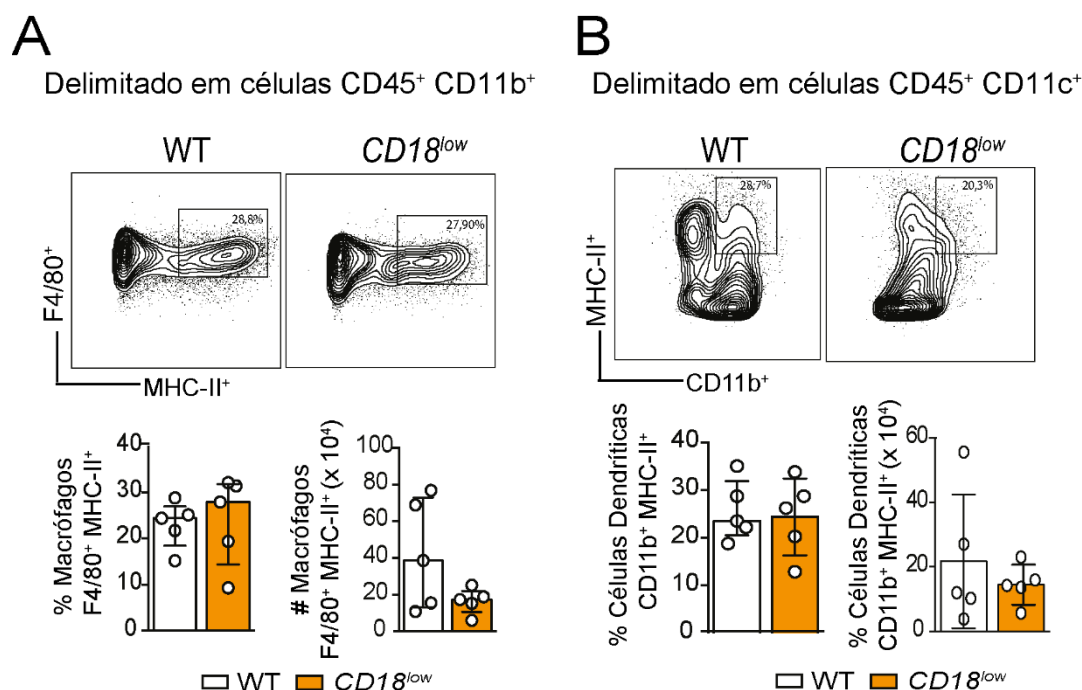
**Figura 28. A transferência adotiva de monócitos inflamatórios diminuiu a fibrose hepática de animais  $CD18^{low}$  após 7 semanas de infecção por *S. mansoni*.**

Animais WT e  $CD18^{low}$  infectados com 80 cerárias de *S. mansoni* receberam adotivamente monócitos inflamatórios ( $2,5 \times 10^5$ ) e monócitos patrulheiros ( $1,5 \times 10^5$ ) previamente isolados da medula óssea de animais não infectados  $CX_3CR1^{gfp/+}$ . **(A)** Fotomicrografias representativas (aumento de 100x) do fígado coradas com picrossírus. **(B)** O gráfico de barras representa a porcentagem de área vermelha no tecido hepático. Os dados representam a média  $\pm$  SD de um experimento (n=5 WT infectados, n= 4  $CD18^{low}$  infectados, n= 4  $CD18^{low}$  infectados

tratados com monócitos inflamatórios e/ou monócitos patrulheiros). Os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Bonferroni (\*  $p < 0,05$  comparado aos animais WT ou #  $p < 0,05$  comparado aos animais  $CD18^{low}$  infectados).

#### 4.14. A baixa expressão de CD18 reduz os macrófagos alternativamente ativados no fígado durante a esquistossomose crônica

O influxo de monócitos inflamatórios  $Ly6C^{high}$  no tecido dá origem a macrófagos derivados de monócitos  $CD11b^{high}$  (MDMs) (ROLOT et al., 2019; RÜCKERL; COOK, 2019), que se tornam alternativamente ativados por IL-4/IL-13 via sinalização de IL-4R $\alpha$  (MAAs) (GORDON; MARTINEZ, 2010), promovendo o reparo tecidual durante a esquistossomose crônica (GUNDRA et al., 2014; GIRGIS et al., 2014). Neste sentido, avaliamos o acúmulo de MDMs e MDCs no fígado de animais WT e  $CD18^{low}$  infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* após 7 semanas de infecção (Figura 9). Não observamos diferenças significativas nos macrófagos (MDMs) (Figura 29A) e nas células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos (Figura 29B) de ambos os grupos experimentais.



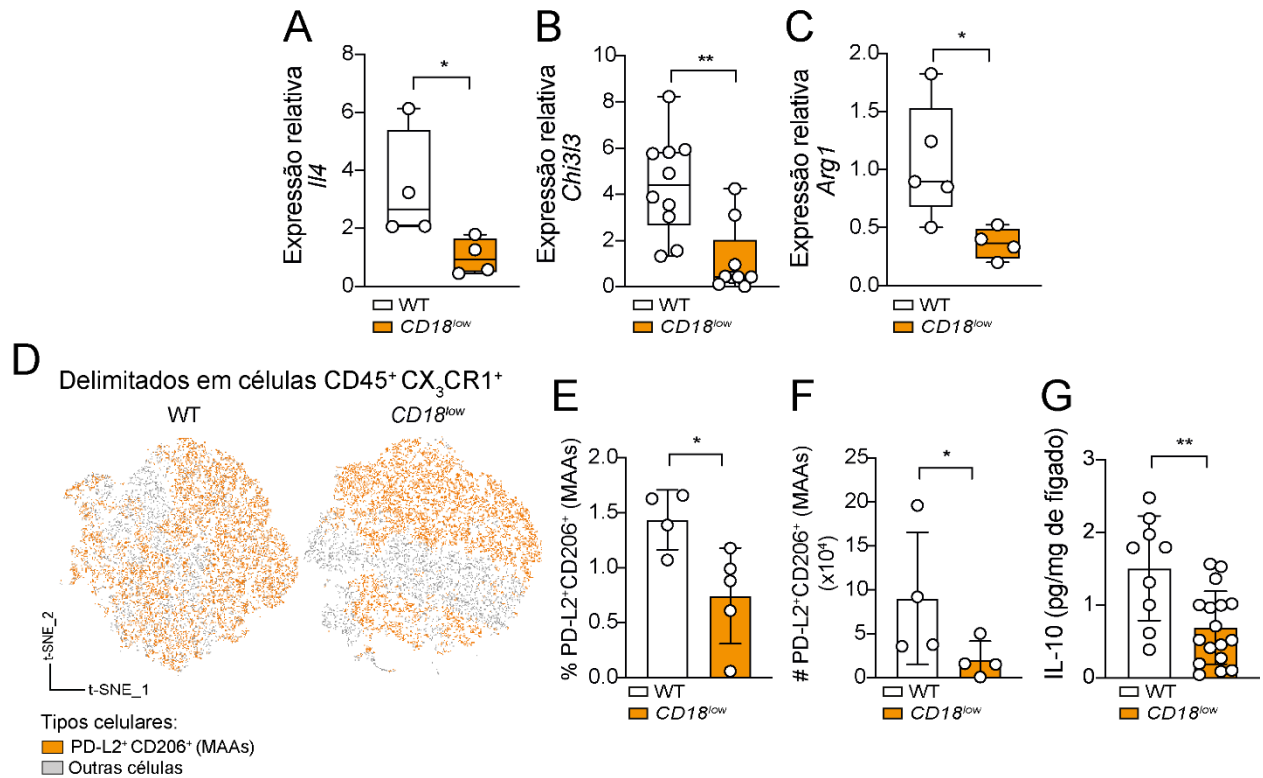
**Figura 29. A baixa expressão de CD18 não afeta o acúmulo de macrófagos (MDMs) e células dendríticas (MDCs) derivadas de monócitos no fígado após 7 semanas de infecção por *S. mansoni*.**

Animais WT e  $CD18^{low}$  foram infectados com 80 cercárias *S. mansoni* e após 7 semanas o fígado foi coletado para análise por citometria de fluxo. Os gráficos de contorno mostram os dados representativos da citometria de fluxo e os gráficos de barras com pontos mostram a

porcentagem e números absolutos de MDMs (CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) **(A)** e MDCs (CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) **(B)**. Os dados representam as medianas  $\pm$  intervalo interquartil de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (n= 4-5 WT e CD18<sup>low</sup> infectados por grupo). Os dados foram analisados com o teste de Man-Whitney (\*p<0.05 comparado ao WT em cada ponto)

Em seguida investigamos se o CD18 estaria afetando a ativação alternativa de macrófagos durante a infecção por *S. mansoni*. Para isso, animais WT e CD18<sup>low</sup> não infectados ou infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* foram sacrificados após 7 semanas e o fígado foi coletado para análise de PCR em tempo real (qPCR). Comparado aos animais WT, a expressão de *Il4* **(Figura 30A)**, *Chi3l3* **(Figura 30B)** e *Arg1* **(Figura 30C)** foi diminuída no fígado de camundongos CD18<sup>low</sup>. Nossos dados indicam que a baixa expressão de CD18 prejudica a transcrição de genes relacionados a ativação alternativa de macrófagos durante a esquistossomose crônica.

Desta forma, avaliamos a presença dos macrófagos alternativamente ativados (MAAs) no fígado dos animais WT e CD18<sup>low</sup> infectados cronicamente com *S. mansoni* **(Figura 11)**. Geramos um mapa t-SNE delimitado em células CD45<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> sobrepostas com os marcadores PD-L2<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> **(Figura 30D)**. Comparado aos animais WT, a porcentagem **(Figura 30E)** e o número absoluto **(Figura 30F)** de MAAs foram diminuídos no fígado de animais CD18<sup>low</sup> após 7 semanas de infecção. Esses resultados se correlacionaram como os níveis reduzidos de IL-10 **(Figura 30G)**. Em conjuntos, nossos dados evidenciam o papel crucial do CD18 para a manutenção de MAAs durante a esquistossomose crônica.



**Figura 30. A baixa expressão de CD18 diminui os macrófagos alternativamente ativados (MAAs) no fígado após 7 semanas de infecção com *S. mansoni*.**

O fígado de animais WT e  $CD18^{low}$  não infectados e infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* após 7 semanas foram analisados por PCR em tempo real (qPCR). O gráfico de caixa com pontos mostra a expressão de *Il4* (A), *Chi3l3* (B) e *Arg1* (C) mensurada por qPCR (D) O mapa t-SNE representativo mostra a distribuição de MAAs PD-L2<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> delimitados em células  $CD45^+ CX_3CR1^+$  (E) O gráfico de barras com pontos mostra a porcentagem de MAAs PD-L2<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup>. (F) O gráfico de barras com pontos mostra os números absolutos de MAAs PD-L2<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup>. Os dados representam um de dois experimentos independentes (n = 4 WT ou n = 4-5 camundongos  $CD18^{low}$  por grupo). (G) O gráfico de barras com pontos mostra a quantificação de IL-10 por ELISA. Os resultados representam um conjunto de três experimentos independentes. As barras de erro representam a média  $\pm$  SD. Diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas com teste *t* de Student não pareado. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , em comparação com WT em cada ponto de tempo)

## *5. Discussão*



## 5. DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária negligenciada causada por vermes do gênero *Schistosoma spp*, que afetam principalmente indivíduos que vivem em regiões tropicais e subtropicais (“Schistosomiasis (Bilharzia)”, [s.d.]). As alterações graves da doença incluem danos ao fígado (fibrose) (KAMDEM et al., 2018), hipertensão pulmonar e até pericardite (PINTO et al., 1994; CROSBY et al., 2010; DE JESUS et al., 2002). Durante a infecção no hospedeiro mamífero, os esquistossômulos migram através da vasculatura até atingirem os pulmões (WILSON, 2009), antes de chegarem no sistema porta hepático e migrarem para as vênulas mesentéricas, onde acasalam-se, e a fêmea deposita os ovos (MCMANUS et al., 2018). O acúmulo de ovos no tecidos induz altos níveis de IL-4, IL-13, IL-5 e IL-10 que desencadeiam a formação do granuloma do tipo 2 (SCHWARTZ; FALLON, 2018), uma marca registrada da fase crônica da infecção.

Granulomas são estruturas compostas por neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, células T, células B e fibroblastos, que são recrutados para limitar o dano tecidual causado pelos ovos. O granuloma induzido pelo ovo de *S. mansoni* é caracterizado pela presença de eosinófilos, monócitos e macrófagos derivados de monócitos (SCHWARTZ; FALLON, 2018; ROLOT et al., 2019). O tráfego de células imunes inatas para os tecidos afetados é dependente de quimiocinas e moléculas de adesão celular (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017). A família de integrinas é composta por 24 receptores que são classicamente conhecidas por suas funções relacionadas à adesão de leucócitos e a migração transendotelial (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017; FAGERHOLM et al., 2019). Cada integrina é formada através da ligação não covalente de uma subunidade  $\alpha$  a uma subunidade  $\beta$ , e atualmente foram identificadas 16 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  (SCHITTENHELM; HILKENS; MORRISON, 2017). Além do importante papel na migração transendotelial de leucócitos, as proteínas da família de integrinas  $\beta 2$  também participam, coordenam e discriminam as etapas de desenvolvimento de células mieloides (LEON-RICO et al., 2014; ZHANG et al., 2019; MEI et al., 2020) e linfoides (MCINTYRE et al., 2020), no entanto, pouco se sabe sobre o papel do CD18 na geração de células mieloides durante a esquistossomose.

Sabe-se que falhas na transcrição do gene *Itgb2* (CD18) estão associadas a redução da atividade proliferativa de células hematopoiéticas (TSUJI et al., 1998) e, durante a monocitopoese a expressão *Itgb2* é crucial para o desenvolvimento de progenitores cMoP (HETTINGER et al., 2013). Neste trabalho, nós confirmamos e ampliamos o conhecimento sobre os mecanismos regulados pelo CD18 durante a monocitopoese. Nossos resultados demonstraram que baixa expressão de CD18 reduz a proliferação de todas as células progenitoras de monócitos, levando ao acúmulo do progenitor de monócitos em proliferação – pMo (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>low/-</sup>), que é uma pequena população de CD11b<sup>low</sup> em monócitos Ly6C<sup>high</sup>, antes de se tornarem monócitos inflamatórios – MI (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup>). O fator de transcrição IRF8 é responsável pelo desenvolvimento e maturação de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>high</sup> (KUROTAKI et al., 2013; ZHAO et al., 2018a). Camundongos *Irf8*<sup>-/-</sup> apresentam acúmulo de progenitores MDP (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>) e cMoP (Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup> Ly6C<sup>high/+</sup> CD11b<sup>-</sup>), redução da expressão de *Csfr1* (CD115) e de monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>high</sup>) na medula óssea (KUROTAKI et al., 2013; ZHAO et al., 2018a). Nossos resultados mostram que o CD18 controla a expressão de *Irf8* e CD115 no progenitor de monócitos em proliferação (pMo), desvendando um potencial mecanismo associado a redução dos subtipos de monócitos na medula óssea e sangue periférico durante a esquistossomose.

Nos tecidos, monócitos e macrófagos medeiam a imunidade contra os esquistossômulos que atingem os pulmões (EL RIDI; TALLIMA, 2009) e coordenam as repostas imunes desencadeadas pela presença de ovos no fígado (SOUZA et al., 2020). O microambiente determina o perfil de resposta dos monócitos e macrófagos (LAVIN et al., 2014; SVEDBERG et al., 2019), e a reação inflamatória coordenada por essas células resulta no reparo tecidual durante a esquistossomose, (HUME; IRVINE; PRIDANS, 2019). No entanto, a dinâmica do acúmulo de leucócitos específicos no pulmão durante a migração dos esquistossômulos é desconhecida. Aqui, identificamos o papel crítico do CD18 para o acúmulo eficiente de monócitos intermediários (Ly6C<sup>inter</sup>) e monócitos patrulheiros (Ly6C<sup>low</sup>) no pulmão logo após a infecção por *S. mansoni*. Os monócitos patrulheiros (Ly6C<sup>low</sup>) expressam altos níveis da integrina LFA-1 (CD11a/CD18) e dependem dessa molécula de adesão para patrulhar os vasos sanguíneos na ausência de estímulos inflamatórios (AUFFRAY et al., 2007). Nosso estudo expande esse conhecimento, pois a marcação intravascular

de leucócitos CD45<sup>+</sup> demonstrou que, embora os monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>high</sup>) não dependam de CD18 para sair dos capilares pulmonares e entrar no tecido pulmonar, os monócitos patrulheiros (Ly6C<sup>low</sup>) não foram capazes de fazer isso, sugerindo que o CD18 também controla a migração transendotelial dessas células. Além disso, a redução dos subtipos de monócitos foi associada à diminuição da porcentagem de MDMs (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>) e MDCs (CD45<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), e aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , que permaneceram elevados no pulmão após 7 semanas de infecção. Esses dados sugerem que a redução de leucócitos imune inatos específicos no pulmão logo após a infecção pode resultar em resposta inflamatória desregulada que persiste com o tempo, mesmo sem a presença dos parasitas.

No fígado de animais *CD18<sup>low</sup>*, os monócitos inflamatórios foram reduzidos durante a infecção crônica, resultando em aumento da carga parasitária, maior número de granulomas, aumento do infiltrado inflamatório e fibrose, sugerindo que as falhas na monocitopoese dos animais *CD18<sup>low</sup>* estão intimamente correlacionadas com a disfunção da resposta imune protetora e dos mecanismos de reparo tecidual. Corroborando esta hipótese, sabe-se que monócitos intermediários CD14<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup> de humanos apresentam aprimorada capacidade de se ligarem a produtos derivados dos ovos e das cercárias de *S. mansoni*, mostrando que essas células têm função de reconhecimento dos produtos derivados do parasita (TURNER et al., 2014).

Os monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>high</sup>) são recrutados para o fígado pelo eixo CCR2/CCL2 e favorecem um ambiente imune protetor (GIRGIS et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014). Essas células se tornam macrófagos derivados de monócitos CD11b<sup>high</sup> (ROLOT et al., 2019; RÜCKERL; COOK, 2019), que se diferenciam em macrófagos alternativamente ativados (MAAs) (GORDON; MARTINEZ, 2010), cuja função é conter o dano hepático, aumentando a sobrevivência de camundongos durante a esquistossomose (GUNDRA et al., 2014; GIRGIS et al., 2014). No nosso estudo descobrimos que monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low/+</sup> CD11b<sup>+</sup>) foram reduzidos no fígado após 7 semanas de infecção em animais *CD18<sup>low</sup>* e, a transferência adotiva dessas células para animais *CD18<sup>low</sup>* diminuiu o infiltrado inflamatório e a fibrose hepática, demonstrando que integrina MAC-1 (CD11b/CD18) é necessária para repostas eficazes de macrófagos durante a esquistossomose (TROTTEIN et al., 1997). Camundongos sensibilizados com SEA aumentam a expressão de MAC-1, que se correlaciona com diminuição do dano

hepático (EL-AHWANY et al., 2000). Reforçando esses achados, foi demonstrado que a terapia com monócitos (CD14<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) contribui para a diminuição da fibrose hepática, bem como reduz a expressão de TGF- $\beta$  e Fizz1 (M2) no fígado de animais infectados com *S. mansoni* (DE SOUZA et al., 2019).

A ativação alternativa de macrófagos é controlada pelo eixo da IL-4/IL-13 – IL-4R $\alpha$  que desencadeia mecanismos de cicatrização (BARRON; WYNN, 2011; GORDON; MARTINEZ, 2010; SOUZA et al., 2020) e minimiza a resposta granulomatosa durante a infecção por *S. mansoni* (GIRGIS et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014; ROLOT et al., 2019; RÜCKERL; COOK, 2019). Além destas citocinas, a IL-10 regula o dano ao tecido (KAMDEM et al., 2018) e é crucial para manter os MAAs na ausência da sinalização de IL-4R $\alpha$  durante a esquistossomose (DEWALS et al., 2010). No entanto, a sinalização de IL-4R $\alpha$  é dispensável para o influxo de monócitos sanguíneos e sua conversão em macrófagos, mas abole os macrófagos residentes do fígado durante a esquistossomose (ROLOT et al., 2019; RÜCKERL; COOK, 2019). Curiosamente, após a infecção por *S. mansoni*, o metabolismo do colesterol diminui a população de macrófagos residentes, os quais são substituídos por MDMs no fígado (CORTES-SELVA et al., 2018). Por outro lado, altos níveis de LDL aumentam a expressão de CD18 em células hematopoiéticas e a adesão dependente de MAC-1 medeia o recrutamento, a proliferação e a diferenciação de células mieloides no sítio inflamatório (WANG et al., 2015). Além disso, sabe-se que a integrina MAC-1 se colocaliza com o receptor da IL-13 (IL-13R $\alpha$ 1), formando um complexo na superfície dos macrófagos que afeta a ativação alternativa (CAO et al., 2015). Embora não tenhamos observado diferenças na frequência de MDMs no fígado, nossos resultados mostram que a baixa expressão de CD18 diminui a expressão de genes relacionado a ativação alternativa de macrófagos (*Il4*, *Chi3l3* e *Arg1*), e conseqüentemente diminui os MAAs, fato correlacionado com a diminuição dos níveis de IL-10 durante a esquistossomose crônica. Esses dados mostram que o CD18 é necessário para a diferenciação de monócitos inflamatórios (CD45<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high/+</sup> CD11b<sup>+</sup>) em MAAs (CD45<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>) no tecido.

A resposta granulomatosa é crucial para proteger contra uma diversidade de patógenos, como o fungo *Paracoccidoides brasiliensis* (TRISTÃO et al., 2017), o parasita intracelular *Leishmania donovani* (HASSAN et al., 2006) e o *S. mansoni* (REZENDE et al., 1997; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Observamos que a baixa

expressão de CD18 não prejudicou a formação de granulomas ao redor dos ovos durante a infecção crônica. No entanto, os camundongos *CD18<sup>low</sup>* exibiram mais granulomas, os quais, foram incapazes de eliminar os parasitas de forma eficiente, refletida pelo aumento da carga de vermes, aumento da contagem de ovos nas fezes, e maior mortalidade de camundongos *CD18<sup>low</sup>* ao final de 70 dias de infecção. Portanto, nossos dados confirmam que CD18 é crucial para a resistência à infecção por *S. mansoni*.

Nosso estudo demonstra pela primeira vez o papel crítico do CD18 para o desenvolvimento de monócitos e para sua diferenciação em macrófagos alternativamente ativados, os quais promovem resistência à infecção experimental por *S. mansoni*. Esses dados fornecem informações importantes sobre as respostas do hospedeiro mediadas pelas moléculas que contêm a subunidade CD18, e pode contribuir para o desenvolvimento novas estratégias de intervenção clínica durante a esquistossomose.

## *6. Conclusão*

## **6. CONCLUSÃO**

A molécula CD18 regula o desenvolvimento e acúmulo de monócitos na medula óssea e assim promove a migração dos subtipos de monócitos do sangue periférico para os tecidos, sendo requerido para uma diferenciação adequada em macrófagos alternativamente ativados no fígado. Neste local, o macrófago alternativamente ativado coordena o reparo tecidual e promove resistência à infecção por *S. mansoni*.

## *7. Referências*



## 7. REFERÊNCIAS

ADEDOKUN, S. A. et al. Interleukin-4 and STAT6 promoter polymorphisms but not interleukin-10 or 13 are essential for schistosomiasis and associated disease burden among Nigerian children. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 65, p. 28–34, 1 nov. 2018.

ANDERSON, K. G. et al. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. **Nature Protocols**, v. 9, n. 1, p. 209–222, jan. 2014.

ARIYARATNE, A.; FINNEY, C. A. M. Eosinophils and Macrophages within the Th2-Induced Granuloma: Balancing Killing and Healing in a Tight Space. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 10, out. 2019.

ASSUNÇÃO, L. S. et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine triggers M2 polarization of macrophages through PPAR $\gamma$  dependent mechanisms. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 2, p. 246–254, fev. 2017.

AUFFRAY, C. et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science (New York, N.Y.)**, v. 317, n. 5838, p. 666–670, 3 ago. 2007.

BARRON, L.; WYNN, T. A. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2509–2514, set. 2011.

BORTHWICK, L. A. et al. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 1, p. 38–55, jan. 2016.

BROADHURST, M. J. et al. Upregulation of Retinal Dehydrogenase 2 in Alternatively Activated Macrophages during Retinoid-dependent Type-2 Immunity to Helminth Infection in Mice. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002883, 23 ago. 2012.

BURKE, M. L. et al. Temporal expression of chemokines dictates the hepatic inflammatory infiltrate in a murine model of schistosomiasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 2, p. e598, 9 fev. 2010.

CAO, C. et al. Mac-1 Regulates IL-13 Activity in Macrophages by Directly Interacting with IL-13R $\alpha$ 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 35, p. 21642–21651, 28 ago. 2015.

CHUAH, C. et al. Defining a pro-inflammatory neutrophil phenotype in response to schistosome eggs. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 1666–1677, nov. 2014.

COLLINS, J. J. et al. An Atlas for *Schistosoma mansoni* Organs and Life-Cycle Stages Using Cell Type-Specific Markers and Confocal Microscopy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, 8 mar. 2011.

- COOK, P. C. et al. Multiple Helminth Infection of the Skin Causes Lymphocyte Hypo-Responsiveness Mediated by Th2 Conditioning of Dermal Myeloid Cells. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 3, p. e1001323, 17 mar. 2011.
- CORTES-SELVA, D. et al. Schistosoma mansoni Infection-Induced Transcriptional Changes in Hepatic Macrophage Metabolism Correlate With an Athero-Protective Phenotype. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2580, 2018.
- CORTES-SELVA, D. et al. Metabolic reprogramming of the myeloid lineage by Schistosoma mansoni infection persists independently of antigen exposure. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1009198, 1 ago. 2021.
- CRABTREE, J. E.; WILSON, R. A. The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to Schistosoma mansoni. **Parasite Immunology**, v. 8, n. 3, p. 265–285, maio 1986.
- CROSBY, A. et al. Pulmonary vascular remodeling correlates with lung eggs and cytokines in murine schistosomiasis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 3, p. 279–288, 1 fev. 2010.
- DAS, A. et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 10, p. 2596–2606, out. 2015.
- DE GAETANO, M. et al. Conjugated linoleic acid targets  $\beta 2$  integrin expression to suppress monocyte adhesion. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 191, n. 8, p. 4326–4336, 15 out. 2013.
- DE JESUS, A. R. et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 1, p. 98–105, 1 jan. 2002.
- DE SOUZA, V. C. A. et al. Adoptive Transfer of Bone Marrow-Derived Monocytes Ameliorates Schistosoma mansoni -Induced Liver Fibrosis in Mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6434, 23 abr. 2019.
- DEAN, D. A.; MANGOLD, B. L. Evidence that both normal and immune elimination of Schistosoma mansoni take place at the lung stage of migration prior to parasite death. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 2, p. 238–248, ago. 1992.
- DEWALS, B. G. et al. IL-4R $\alpha$ -Independent Expression of Mannose Receptor and Ym1 by Macrophages Depends on their IL-10 Responsiveness. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. e689, 18 maio 2010.
- DOMBROWICZ, D. et al. Expression of a functional Fc epsilon RI on rat eosinophils and macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 165, n. 3, p. 1266–1271, 1 ago. 2000.
- EL RIDI, R.; TALLIMA, H. Schistosoma mansoni ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis. **Vaccine**, v. 27, n. 5, p. 666–673, 29 jan. 2009.

EL-AHWANY, E. G. et al. Immunolocalization of macrophage adhesion molecule-1 and macrophage inflammatory protein-1 in schistosomal soluble egg antigen-induced granulomatous hyporesponsiveness. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 7, p. 837–842, jun. 2000.

ESPÍNDOLA, M. S. et al. Combined immunization using DNA-Sm14 and DNA-Hsp65 increases CD8+ memory T cells, reduces chronic pathology and decreases egg viability during *Schistosoma mansoni* infection. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 263, 16 maio 2014.

ETZIONI, A. et al. Recurrent Severe Infections Caused by a Novel Leukocyte Adhesion Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 25, p. 1789–1792, 17 dez. 1992.

FAGERHOLM, S. C. et al. Beta2-Integrins and Interacting Proteins in Leukocyte Trafficking, Immune Suppression, and Immunodeficiency Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

FERNANDES, J. S. et al. Monocyte subsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 703653, 2014.

FRIEDMAN, A. D. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. **Oncogene**, v. 26, n. 47, p. 6816–6828, out. 2007.

FU, C.-L. et al. A novel mouse model of *Schistosoma haematobium* egg-induced immunopathology. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002605, 2012.

FU, C.-L.; ODEGAARD, J. I.; HSIEH, M. H. Macrophages are required for host survival in experimental urogenital schistosomiasis. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 29, n. 1, p. 193–207, jan. 2015.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71–82, jul. 2003.

GIRGIS, N. M. et al. Ly6C(high) monocytes become alternatively activated macrophages in schistosome granulomas with help from CD4+ cells. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 6, p. e1004080, jun. 2014.

GOMEZ, J. C.; DOERSCHUK, C. M. The role of CD18 in the production and release of neutrophils from the bone marrow. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 90, n. 4, p. 599–610, abr. 2010.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, jan. 2003.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 28 maio 2010.

GUNDRA, U. M. et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. **Blood**, v. 123, n. 20, p. e110-122, 15 maio 2014.

GUNDRU, U. M. et al. Vitamin A mediates conversion of monocyte-derived macrophages into tissue-resident macrophages during alternative activation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 6, p. 642–653, jun. 2017.

HAMS, E. et al. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 1, p. 367–372, 7 jan. 2014.

HANNA, R. N. et al. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C – monocytes. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 778–785, ago. 2011.

HASSAN, M. F. et al. The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 3, p. 943–953, set. 2006.

HERBERT, D. R. et al. Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology. **Immunity**, v. 20, n. 5, p. 623–635, 1 maio 2004.

HERBERT, D. R. et al. Arginase I suppresses IL-12/IL-23p40-driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 184, n. 11, p. 6438–6446, 1 jun. 2010.

HESPEL, C.; MOSER, M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 10, p. 2535–2543, out. 2012.

HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 5, p. 3157–3166, 1 mar. 2004.

HETTINGER, J. et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. **Nature Immunology**, v. 14, n. 8, p. 821–830, ago. 2013.

HUANG, W. et al. Characteristics and function of cathepsin L3 from *Schistosoma japonicum*. **Parasitology Research**, v. 119, n. 5, p. 1619–1628, 1 maio 2020.

HUME, D. A.; IRVINE, K. M.; PRIDANS, C. The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 2, p. 98–112, fev. 2019.

HURDAYAL, R. et al. IL-4-producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2-controlled diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 40, p. E8430–E8439, 3 out. 2017.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, n. 4, p. 549–554, 27 fev. 1987.

JENKINS, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 332, n. 6035, p. 1284–1288, 10 jun. 2011.

JORDAN, P. From katayama to the Dakhla Oasis: the beginning of epidemiology and control of bilharzia. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 9–40, 23 out. 2000.

KAMDEM, S. D. et al. Host Regulators of Liver Fibrosis During Human Schistosomiasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

KAWAMURA, S.; OHTEKI, T. Monopoiesis in humans and mice. **International Immunology**, v. 30, n. 11, p. 503–509, 29 out. 2018.

KNUHR, K. et al. Schistosoma mansoni Egg-Released IPSE/alpha-1 Dampens Inflammatory Cytokine Responses via Basophil Interleukin (IL)-4 and IL-13. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2293, 2018.

KUMKATE, S. et al. CD207+ Langerhans cells constitute a minor population of skin-derived antigen-presenting cells in the draining lymph node following exposure to Schistosoma mansoni. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 209–220, fev. 2007.

KUROTAKI, D. et al. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. **Blood**, v. 121, n. 10, p. 1839–1849, 7 mar. 2013.

LANDSMAN, L. et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 963–972, 22 jan. 2009.

LAVIN, Y. et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312–1326, 4 dez. 2014.

LEON-RICO, D. et al. Brief Report: Reduced Expression of CD18 Leads to the In Vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells in Mouse Bone Marrow. **STEM CELLS**, v. 32, n. 10, p. 2794–2798, 2014.

LESSARD, A.-J. et al. Triggering of NOD2 Receptor Converts Inflammatory Ly6Chigh into Ly6Clow Monocytes with Patrolling Properties. **Cell Reports**, v. 20, n. 8, p. 1830–1843, 22 ago. 2017.

LI, Z.-Y. et al. Contribution of tissue transglutaminase to the severity of hepatic fibrosis resulting from Schistosoma japonicum infection through the regulation of IL-33/ST2 expression. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 302, 14 jun. 2019.

MA, Y.-L. et al. IL-4-Producing Dendritic Cells Induced during Schistosoma japonica Infection Promote Th2 Cells via IL-4-Dependent Pathway. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 195, n. 8, p. 3769–3780, 15 out. 2015.

MAGALHÃES, E. S. et al. Macrophage migration inhibitory factor is critical to interleukin-5-driven eosinophilopoiesis and tissue eosinophilia triggered by Schistosoma mansoni infection. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 4, p. 1262–1271, abr. 2009.

MAGALHÃES, K. G. et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent

mechanisms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 9, p. 1369–1379, 1 nov. 2010.

MAGGI, L. et al. The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with *Schistosoma mansoni* in mice. **Cytokine**, v. 138, p. 155390, fev. 2021.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, 3 mar. 2014.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1055–1062, dez. 2014.

MBANEFO, E. C. et al. Interleukin-4 Signaling Plays a Major Role in Urogenital Schistosomiasis-Associated Bladder Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 3, 20 fev. 2020.

MCINTYRE, C. L. et al.  $\beta$ 2 Integrins differentially regulate  $\gamma\delta$  T cell subset thymic development and peripheral maintenance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 36, p. 22367–22377, 8 set. 2020.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 9 ago. 2018.

MEI, Y. et al. Diaphanous-related formin mDia2 regulates beta2 integrins to control hematopoietic stem and progenitor cell engraftment. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3172, 23 jun. 2020.

MOSER, M. et al. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. **Nature Medicine**, v. 14, n. 3, p. 325–330, mar. 2008.

MOUNTFORD, A. P.; TROTTEIN, F. Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 5, p. 221–226, maio 2004.

MUKENDI, J. P. K. et al. Interleukin (IL)-33 is dispensable for *Schistosoma mansoni* worm maturation and the maintenance of egg-induced pathology in intestines of infected mice. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 70, 22 jan. 2021.

MUTENGO, M. M. et al. Low IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  and High IL-13 Cytokine Levels Are Associated with Severe Hepatic Fibrosis in *Schistosoma mansoni* Chronically Exposed Individuals. **Journal of Parasitology Research**, v. 2018, p. 9754060, 2018.

NAIR, M. G. et al. Alternatively activated macrophage-derived RELM- $\alpha$  is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 4, p. 937–952, 13 abr. 2009.

NASCIMENTO, G. L. et al. The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 14 jan. 2019.

- NASCIMENTO, M. et al. Ly6Chi monocyte recruitment is responsible for Th2 associated host-protective macrophage accumulation in liver inflammation due to schistosomiasis. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004282, ago. 2014.
- NATION, C. S. et al. Schistosome migration in the definitive host. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0007951, 4 fev. 2020.
- PATTON, E. A. et al. Severe Schistosomiasis in the Absence of Interleukin-4 (IL-4) Is IL-12 Independent. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 589–592, jan. 2001.
- PAVELEY, R. A. et al. Fluorescent imaging of antigen released by a skin-invading helminth reveals differential uptake and activation profiles by antigen presenting cells. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 10, p. e528, 13 out. 2009.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, jul. 2002.
- PENG, H. et al. IL-33 Contributes to Schistosoma japonicum -induced Hepatic Pathology through Induction of M2 Macrophages. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29844, 21 jul. 2016.
- PESCE, J. T. et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000371, abr. 2009.
- PINTO, R. M. et al. Migration of Schistosoma mansoni sambon (Trematoda, Schistosomatidae) from skin to lungs in immunized NZ rabbits (Lagomorpha, Leporidae) by autoradiographic analysis. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 11, p. 629–634, 1994.
- PRENDERGAST, C. T.; SANIN, D. E.; MOUNTFORD, A. P. Alternatively Activated Mononuclear Phagocytes from the Skin Site of Infection and the Impact of IL-4R $\alpha$  Signalling on CD4+T Cell Survival in Draining Lymph Nodes after Repeated Exposure to Schistosoma mansoni Cercariae. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004911, ago. 2016.
- RAN, L. et al. Cx3cr1 deficiency in mice attenuates hepatic granuloma formation during acute schistosomiasis by enhancing the M2-type polarization of macrophages. **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, n. 7, p. 691–700, 1 jul. 2015.
- RAY, D. et al. Transcriptional Profiling of the Bladder in Urogenital Schistosomiasis Reveals Pathways of Inflammatory Fibrosis and Urothelial Compromise. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1912, 29 nov. 2012.
- REZENDE, S. A. et al. Mice lacking the gamma interferon receptor have an impaired granulomatous reaction to Schistosoma mansoni infection. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 8, p. 3457–3461, ago. 1997.
- ROLOT, M. et al. Recruitment of hepatic macrophages from monocytes is independent of IL-4R $\alpha$  but is associated with ablation of resident macrophages in schistosomiasis. **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 7, p. 1067–1081, jul. 2019.

ROLOT, M.; DEWALS, B. G. Macrophage Activation and Functions during Helminth Infection: Recent Advances from the Laboratory Mouse. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. e2790627, 2 jul. 2018.

ROSMARIN, A. G. et al. Differential expression of CD11b/CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 131–136, jan. 1989.

RÜCKERL, D.; COOK, P. C. Macrophages assemble! But do they need IL-4R during schistosomiasis? **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 7, p. 996–1000, 2019.

SADLER, C. H. et al. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 4, p. 880–888, abr. 2003.

**Schistosomiasis (Bilharzia)**. Disponível em: <<https://www.who.int/westernpacific/health-topics/schistosomiasis>>. Acesso em: 7 jun. 2021.

SCHITTENHELM, L.; HILKENS, C. M.; MORRISON, V. L.  $\beta$ 2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1866, 2017.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 29 out. 2018.

SCHWARTZ, C.; HAMS, E.; FALLON, P. G. Helminth Modulation of Lung Inflammation. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 5, p. 388–403, 1 maio 2018.

SCHWARTZ, E.; ROZENMAN, J. Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 10, p. 766–768; author reply 766–768, 5 set. 2002.

SOUZA, C. O. S. et al. Monocyte and Macrophage-Mediated Pathology and Protective Immunity During Schistosomiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

SUN, H. et al. The Activation and Regulation of  $\beta$ 2 Integrins in Phagocytes and Phagocytosis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

SVEDBERG, F. R. et al. The lung environment controls alveolar macrophage metabolism and responsiveness in type 2 inflammation. **Nature Immunology**, v. 20, n. 5, p. 571–580, maio 2019.

TADOKORO, S. et al. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5642, p. 103–106, 3 out. 2003.

TANG, H. et al. Soluble Egg Antigen Activates M2 Macrophages via the STAT6 and PI3K Pathways, and *Schistosoma Japonicum* Alternatively Activates Macrophage Polarization to Improve the Survival Rate of Septic Mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 12, p. 4230–4239, dez. 2017.



TARAFDER, M. R. et al. Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in humans in the absence of a “gold standard”. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 399–404, 15 mar. 2010.

TEIXEIRA, M. M. et al. Role of CD18 in the accumulation of eosinophils and neutrophils and local oedema formation in inflammatory reactions in guinea-pig skin. **British Journal of Pharmacology**, v. 111, n. 3, p. 811–818, mar. 1994.

TOFFOLI DA SILVA, G. et al. 5-lipoxygenase pathway is essential for the control of granuloma extension induced by *Schistosoma mansoni* eggs in lung. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 124–129, ago. 2016.

TORBEN, W. et al. Role of antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni*. **Vaccine**, v. 30, n. 48, p. 6753–6758, 6 nov. 2012.

TRISTÃO, F. S. M. et al. Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

TROTTEIN, F. et al. Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 159, n. 2, p. 804–811, 15 jul. 1997.

TROTTEIN, F. et al. *Schistosoma mansoni* schistosomula reduce E-selectin and VCAM-1 expression in TNF-alpha-stimulated lung microvascular endothelial cells by interfering with the NF-kappaB pathway. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 11, p. 3691–3701, nov. 1999.

TSUJI, T. et al. Integrin beta2 (CD18)-mediated cell proliferation of HEL cells on a hematopoietic-supportive bone marrow stromal cell line, HESS-5 cells. **Blood**, v. 91, n. 4, p. 1263–1271, 15 fev. 1998.

TURNER, J. D. et al. Circulating CD14<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ‘Intermediate’ Monocytes Exhibit Enhanced Parasite Pattern Recognition in Human Helminth Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2817, 24 abr. 2014.

UDALOVA, I. A.; MANTOVANI, A.; FELDMANN, M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 8, p. 472–485, ago. 2016.

VANNELLA, K. M. et al. Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 337, p. 337ra65, 4 maio 2016.

VAROL, C. et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 1, p. 171–180, 22 jan. 2007.

VÁSQUEZ-DE KARTZOW, R. et al. Leukocyte adhesion deficiency syndrome: report on the first case in Chile and South America. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 130, p. 263–266, 2012.

WANG, X. et al. Hematopoietic stem/progenitor cells directly contribute to arteriosclerotic progression via integrin  $\beta 2$ . **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 33, n. 4, p. 1230–1240, abr. 2015.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 148–154, 2007.

WILSON, R. A. The saga of schistosome migration and attrition. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1581–1592, out. 2009.

WILSON, R. W. et al. Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 151, n. 3, p. 1571–1578, 1 ago. 1993.

WINKEL, B. M. F. et al. Early Induction of Human Regulatory Dermal Antigen Presenting Cells by Skin-Penetrating Schistosoma Mansoni Cercariae. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 31 out. 2018.

WOLDE, M. et al. Human Monocytes/Macrophage Inflammatory Cytokine Changes Following in vivo and in vitro Schistosoma mansoni Infection. **Journal of Inflammation Research**, v. 13, p. 35–43, 2020.

YÁÑEZ, A. et al. Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. **Immunity**, v. 47, n. 5, p. 890–902.e4, 21 nov. 2017.

YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, p. 1, 7 jan. 2014.

YE, Z. et al. Galectins, Eosinophiles, and Macrophages May Contribute to Schistosoma japonicum Egg-Induced Immunopathology in a Mouse Model. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

YONG, L. et al. B1 cells protect against Schistosoma japonicum-induced liver inflammation and fibrosis by controlling monocyte infiltration. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007474, jun. 2019.

YU, Y.; DENG, W.; LEI, J. Interleukin-33 promotes Th2 immune responses in infected mice with Schistosoma japonicum. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 2911–2918, ago. 2015.

ZHANG, L.-J. et al. The Impact of Integrin  $\beta 2$  on Granulocyte/Macrophage Progenitor Proliferation. **STEM CELLS**, v. 37, n. 3, p. 430–440, 2019.

ZHAO, Y. et al. mTOR masters monocyte development in bone marrow by decreasing the inhibition of STAT5 on IRF8. **Blood**, v. 131, n. 14, p. 1587–1599, 5 abr. 2018a.

ZHAO, Y. et al. The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 10, p. 6425–6439, out. 2018b.

ZHU, J. et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 122, 25 mar. 2014.

*8. Anexos*

## 8. ANEXOS

### Anexo I – Aprovação CEUA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Campus de Ribeirão Preto**  
*Comissão de Ética no Uso de Animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 14.1.607.53.9), intitulado "Avaliação da função imunológica da molécula Beta-2 integrina na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*", de autoria de **Milena Sobral Espíndola e Lucia Helena Faccioli**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP**, foi aprovado em reunião da CEUA de 05/02/2015.

Colaboradores: Fabiani Gai Frantz; Caroline Fontanari

This is to certify that the work (Protocol number 14.1.607.53.9), entitled: "Avaliação da função imunológica da molécula Beta-2 integrina na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*", by **Milena Sobral Espíndola and Lucia Helena Faccioli** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, February, 26 2015.

**Duração prevista do projeto:** 02/03/2015 a 20/06/2016

Ribeirão Preto, 02 de março de 2015.

Prof. Dra. Cláudia Maria Padovan  
Presidente da CEUA

## Anexo II – Aprovação CEUA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel do CD18 para geração e plasticidade de monócitos durante a infecção por *Shistosoma mansoni*", registrada sob nº 19.146.60.4, sob a responsabilidade de Camila de Oliveira Silva e Souza e Lúcia Helena Faccioli, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* em 16/05/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.


Colaboradores: Luiz Gustavo Araújo Gardinassi

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica			
Vigência da Autorização	01/06/2019 a 01/03/2023			
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico	Camundongo <i>Knockout</i>		
	C57BL/6	CD18 <sup>ow</sup> (B6.129S-Itgb2 <sup>tm1bay</sup> )	CX3CR1 <sup>GFP/GFP</sup>	CX3CR1 <sup>+GFP</sup>
Nº de animais	204	204	170	204
Peso/Idade	22-28 g/ 6-8 semanas			
Sexo	Macho			
Origem	Biotério Central da PUSP-RP	Biotério I FCFRP-USP		

Ribeirão Preto, 16 de maio de 2019.

  
Ana Patrícia Yatsuda Natsui  
Coordenadora da CEUA-FCFRP

## Anexo II – SisGen

  
Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
Cadastro nº AD4AE99

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	<b>AD4AE99</b>
Usuário:	<b>Reitoria da Universidade de São Paulo</b>
CPF/CNPJ:	<b>63.025.530/0001-04</b>
Objeto do Acesso:	<b>Patrimônio Genético</b>
Finalidade do Acesso:	<b>Pesquisa</b>

---

**Espécie**

**Schistosoma mansoni**

Titulo da Atividade: **Papel do CD18 para geração e modulação de monócitos durante a infecção por Schistosoma mansoni**


---

**Equipe**


Lúcia Helena Faciolli	Reitoria da Universidade de São Paulo
Camila de Oliveira Silva e Souza	Universidade de São Paulo
Luiz Gustavo Araújo Gardinassi	Universidade de São Paulo
Luana Henrique de Macedo	Universidade de São Paulo

Data do Cadastro:	<b>10/10/2018 11:26:59</b>
Situação do Cadastro:	<b>Concluído</b>



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 11:36 de 10/10/2018.

 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO - SISGEN

## **Anexo IV – LISTA DE PUBLICAÇÕES**

### ***Artigos publicados durante o doutorado relacionados à tese***

- I. **Souza, C. O. S.**; Espíndola, M. S. ; Fontanari, C ; Prado, M. K. B. ; Frantz, F. G. ; Rodrigues, V ; Gardinassi, L. G. ; Faccioli, L. H. **CD18 Regulates Monocyte Hematopoiesis and Promotes Resistance to Experimental Schistosomiasis**. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1970, 2018.
- II. **Souza, C. O. S.** ; Gardinassi, L. G. ; Rodrigues, V. ; Faccioli, L. H. **Monocyte and Macrophage-Mediated Pathology and Protective Immunity During Schistosomiasis**. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 11:1973, 2020.

### ***Artigos publicados durante o doutorado não relacionados à tese***

- I. Pereira, P. A. T. ; Bitencourt, C. S. ; Reis, M. B. ; Frantz, F.G. ; Sorgi, C.A. ; **Souza, C. O. S.** ; Silva, C.L. ; Gardinassi, L. G. ; Faccioli, L. H. Immunomodulatory activity of hyaluronidase is associated with metabolic adaptations during acute inflammation. *INFLAMMATION RESEARCH*, v. 68, p. 1-9, 2019.
- II. Ketelut-Carneiro, N. ; **Souza, C. O. S.** ; Benevides, L. ; Gardinassi, L. G. ; Silva, M. C. ; Tavares, L. A. ; Zamboni, D. S. ; Silva, J. S. Caspase-11-dependent IL-1 $\alpha$  release boosts Th17 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Pathogens*, v. 15, p. e1007990, 2019.
- III. Sartim, M. A. ; **Souza, C. O. S.** ; Diniz, C. R. A. F. ; Da Fonseca, V. M. B. ; Sousa, L. O. ; Peti, A. P. F. ; Costa, T. R. ; Lourenço, A. G. ; Borges, M. C. ; Sorgi, C. A. ; Faccioli, L. H. ; Sampaio, S. V. Crotoxin-Induced Mice Lung Impairment: Role of Nicotinic Acetylcholine Receptors and COX-Derived Prostanoids. *BIOMOLECULES*, v. 10, p. 794, 2020.
- IV. Prado, M. K.B. ; Fontanari, C. ; **Souza, C. O. S.** ; Gardinassi, L. G. ; Zoccal, K. F. ; De Paula-Silva, F. W. G. ; Peti, A. P. F. ; Sorgi, C. A. ; Meirelles, A. F.G. ;



Ramos, S. G. ; Alves-Filho, J. C. ; Faccioli, L. H. IL-22 Promotes IFN- $\gamma$ -Mediated Immunity against *Histoplasma capsulatum* Infection. BIOMOLECULES, v. 10, p. 865, 2020.

V. Reis, M. B. ; Rodrigues, F. L. ; Lautherbach, N. ; Kanashiro, A. ; Sorgi, C. A. ; Meirelles, A. F. G. ; Silva, C. A. A. ; Zoccal, K. F. ; **Souza, C. O. S.** ; Ramos, S. G. ; Matsuno, A. K. ; Rocha, L. B. ; Salgado, H. C. ; Navegantes, L. C. C. ; Kettelhut, Í. C. ; Cupo, P. ; Gardinassi, L. G. ; Faccioli, L. H. . Interleukin-1 receptor-induced PGE2 production controls acetylcholine-mediated cardiac dysfunction and mortality during scorpion envenomation. Nature Communications, v. 11, p. 5433 (2020), 2020.

VI. **Souza, C.O.S.**; Ketelut-Carneiro, N.; Milanezi, C. M.; Faccioli, L. H.; Gardinassi, L. G. Silva, J. S. NLRP4 inhibits NLRP3 inflammasome and abrogates effective antifungal CD8+ T cell responses. iScience, v.24, 102548 (2021).

**Anexo V – Prêmios associados a essa tese.**

- I. *Global Health Travel Award* – Keystone Symposium on Helminths: New Insights from Immunity to Global Health. Cape Town, Western Cape, South Africa. December, 2019
  
- II. Menção Honrosa (eixo temático Helmintologia) pelo trabalho: CD18 regulates monocyte progenitors and differentiation into alternatively activated macrophages during experimental schistosomiasis. Apresentado no XXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, on-line, Maio 2021.