

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MATHEUS PEREIRA DE ARAÚJO

**ANÁLISE DA MICROBIOTA EM FASE AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE
HEPÁTICA E INTESTINAL E A POSSÍVEL INTERAÇÃO DE ESPÉCIES DE
Schistosoma E BACTÉRIAS.**

Alfenas/MG
2021

MATHEUS PEREIRA DE ARAÚJO

**ANÁLISE DA MICROBIOTA EM FASE AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE
HEPÁTICA E INTESTINAL E A POSSÍVEL INTERAÇÃO DE ESPÉCIES DE
Schistosoma E BACTÉRIAS.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques
Coorientadores: Prof^ª. Dra. Raquel Lopes Martins Souza
Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Alfenas/MG
2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

A663a Araújo, Matheus Pereira de.
Análise da microbiota em fase aguda da esquistossomose hepática e intestinal e a possível interação de espécies de *Schistosoma* e bactérias. / Matheus Pereira de Araújo. -- Alfenas/MG, 2021.
98f.: il. --

Orientador: Marcos José Marques.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Esquistossomose. 2. Microbiota. 3. Translocação Bacteriana.
4. Antibacterianos. I. Marques, Marcos José. II. Título.

CDD-616.96

MATHEUS PEREIRA DE ARAÚJO

"ANÁLISE DA MICROBIOTA EM FASE AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE HEPÁTICA E
INTESTINAL E A POSSÍVEL INTERAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Schistosoma* E BACTÉRIAS"

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 02 de março de 2021.

Prof. Dr. Marcos José Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Ivo Santana Caldas
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Fabio Antonio Colombo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 12/05/2021, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Rita Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 12/05/2021, às 15:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Antonio Colombo, Professor do Magistério Superior**, em 12/05/2021, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ivo Santana Caldas, Professor do Magistério Superior**, em 12/05/2021, às 21:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Latércia Tranches Dias, Professor do Magistério Superior**, em 14/05/2021, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0506569** e o código CRC **EA86F0C4**.

Aos meus sobrinhos Cecília, Aline, Joaquim e Júlia
por fazerem meus dias mais felizes com vocês por perto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por enviar os guias espirituais para trilhar meu caminho;

Aos meus orientadores, Marcos José Marques, Raquel Lopes Martins Souza e Luiz Felipe Leomil Coelho pela amizade e confiança, pois de cada um aprendi algo novo para que pudesse desenvolver e concluir este trabalho. Destes 13 anos de UNIFAL-MG, são 8 anos que estou no laboratório de parasitologia, e sempre me senti muito feliz por toda atenção, conselhos e ensinamentos;

Ao meu orientador no Japão, Marcello Otake Sato, que além de tudo o que me ensinou, tornou o período de intercâmbio inesquecível. Obrigado pela amizade, pelas conversas, pelos ensinamentos, e por me fazer gostar ainda mais do país do sol nascente;

Ao Chigusa, Kawai, Kirinoki, Megumi e Ito sensei; Oshita san, Tanaka san, Takaoka san, Moteki san, Hamid san, Kentaro kun, Abi chan, Mami chan, Tama kun, Milene, Beatriz, Guilherme, Ricardo, Márcio, Ângela, Ganbold, Eegii, Jamiyan, e a todos que me auxiliaram de alguma forma no período em que estive na Dokkyo Medical University;

Ao meu sensei de Nihongo, Celio Tikashi Nakahara, por ser meu amigo, professor e meu guia pela cultura japonesa;

Aos amigos e colegas que conheci no Japão: みなさまどうもありがとうございました (“minna sama domo arigatou gozaimashita”);

Aos servidores e amigos do Departamento de Patologia e Parasitologia: obrigado por todo incentivo para cursar o estágio no exterior;

Aos professores Amanda Latércia Tranches Dias, Livia de Figueiredo Diniz, Ivo Santana Caldas, Fábio Antônio Colombo, Maria Rita Rodrigues, Aline Pereira Castro e Rômulo Dias Novaes pelas contribuições para que este trabalho fosse concluído;

Às minhas amigas: Maria Ângela e Marilene. Agradeço por sempre serem o suporte no laboratório e pela amizade;

Ao meus pais, irmãos e minha família por sempre terem me incentivado a estudar e a trilhar este caminho. Obrigado por mostrarem que o conhecimento é o maior bem que podemos obter nesta vida;

Ao Watson pelo companheirismo e por apoiar meus sonhos. Obrigado pelo ombro nos momentos felizes e também nos difíceis;

Aos meus amigos e colegas de laboratório Micaella, Vinícius, Gabriel, Elda, Juliana e Patrícia durante toda esta caminhada: agradeço por toda ajuda;

Aos meus amigos Lellis, Vanessa, Clara, Cristiane, Rafaella, André, Renata, Natássia, Amanda, Débora, Dafni, Maria Thereza, Emilio, Rafaela, Lilian e Eduardo por serem o significado de amizade mesmo que estejamos tão distantes;

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas;

À Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação;

À Diretoria de Relações Internacionais;

À Dokkyo Medical University;

À Universidade Federal de Alfenas,

o meu muito obrigado a todos.

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

RESUMO

A esquistossomose, causada por espécies do trematódeo *Schistosoma*, é uma doença negligenciada, muito comum em países em desenvolvimento, e mais de 200 milhões de pessoas necessitam de tratamento. Na evolução da esquistossomose há um comprometimento da estrutura morfológica e funcional do trato gastrointestinal. Nestas condições, as bactérias da própria microbiota intestinal podem chegar à corrente sanguínea, ou se associar ao verme adulto e ovo. Assim, no presente trabalho, foi realizada uma revisão literária a respeito da interação microbiota, geohelmintos e esquistossomose. Experimentalmente, a composição da microbiota de camundongos BALB/c em fase aguda da esquistossomose mansônica e japônica e os eventuais impactos da infecção no intestino e no fígado foram analisados. Houve divisão de 5 grupos de animais: CBr controle do Brasil e SmBr infectado com *S. mansoni* do Brasil; CJp controle do Japão; SmJp infectado com *S. mansoni* no Japão e SjJp infectado com *S. japonicum* no Japão. Desta forma, a análise da microbiota intestinal foi realizada a partir da obtenção do DNA das fezes de camundongos e posterior sequenciamento metagenômico. Embora a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nas fezes dos infectados (SmBr) foi maior que no controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,3637$), assim como nos grupos SmJp e SjJp ($p = 0,5564$). Os resultados de metagenômica para SmBr indicam um aumento no número de bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes (56,6% para 77%) e diminuição do filo Firmicutes (37,5% para 13,9%) na microbiota intestinal. Os resultados do PCR quantitativo para o filo Bacteroidetes confirmaram os resultados obtidos na metagenômica, encontrando maior quantidade no grupo SmBr, assim como diminuição de Firmicutes. Os fígados dos animais dos grupos controle e infectado foram obtidos também para avaliar a composição da microbiota, e somente os animais infectados apresentaram bactérias no fígado. A análise molecular mostra a presença de bactérias do filo Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacterias. Quatro espécies de bactérias foram isoladas do fígado dos animais SmBr e a identificação dessas foi realizada pela técnica de MALDI-TOF (*Bordetella hinzii*, *Haemophilus haemolyticus*, *Lactococcus garvieae* e *Escherichia coli*); SmJp (*Staphylococcus nepalensis* e *Staphylococcus sciuri*) e SjJp (*Enterococcus galinarum*, *Staphylococcus sciuri* e *Paenibacillus*). Ensaios para determinar o perfil de sensibilidade das bactérias à diferentes antibióticos (Clindamicina, Doxiciclina, Eritromicina, Gentamicina, Levofloxacino e Sulfametoxazol + Trimetoprima) mostraram que todas as espécies estudadas

apresentaram sensibilidade para Gentamicina. Este antibiótico apresentou maior eficácia tanto pela análise de Concentração Inibitória Mínima como pela Concentração Microbicida Mínima. Para Eritromicina, as bactérias *B. hinzii*, *L. garvieae*, *S. nepalensis* e *S. sciuri* apresentaram sensibilidade. Já para o Levofloxacino, *H. haemolyticus*, *E. coli*, *L. garvieae*, *S. nepalensis* e *S. sciuri* foram sensíveis. Nos cortes histológicos, foi possível observar granulomas esquistossomóticos do tipo exsudativo no fígado; e no intestino foram identificados retenção de ovos dos parasitos na camada mucosa e aumento da celularidade, a qual foi constituída por acúmulo de células mononucleares e polimorfonucleares. Foi possível verificar também que algumas bactérias são capazes de aderir à superfície dos vermes adultos (*E. coli*) e dos ovos (*L. garvieae*) de *S. mansoni*. Os resultados obtidos indicam uma alteração na microbiota intestinal com possível disseminação das bactérias para outros órgãos, tais como o fígado, evidenciando uma possível translocação bacteriana.

Palavras-chave: Esquistossomose. Microbiota. Translocação Bacteriana. Antibacterianos.

ABSTRACT

Schistosomiasis, caused by species of the trematode *Schistosoma*, is a neglected disease, very common in developing countries, and more than 200 million people need treatment. In the evolution of schistosomiasis there is a compromise in the morphological and functional structure of the gastrointestinal tract. Under these conditions, bacteria from the intestinal microbiota itself can reach the bloodstream, or associate with the adult worm and egg. Thus, in the present work, a literary review was carried out regarding the microbiota, geohelminth and schistosomiasis interaction. Experimentally, the composition of the BALB/c mice microbiota in the acute phase of mansonic and japanese schistosomiasis and the possible impacts of the infection on the intestine and liver were analyzed. There was a division of 5 groups of animals: CBr control from Brazil and SmBr infected with *S. mansoni* from Brazil; CJp control of Japan; SmJp infected with *S. mansoni* in Japan and SjJp infected with *S. japonicum* in Japan. Thus, the analysis of the intestinal microbiota was performed by obtaining the DNA from the feces of mice and subsequent metagenomic sequencing. Although the count of Colony Forming Units (CFU) in the feces of the infected (SmBr) was higher than in the control, this difference was not statistically significant ($p = 0.3637$), as well as in the SmJp and SjJp groups ($p = 0.5564$). The results of metagenomics for SmBr indicate an increase in the number of bacteria belonging to the phylum Bacteroidetes (56.6% to 77%) and a decrease in the phylum Firmicutes (37.5% to 13.9%) in the intestinal microbiota. The results of the quantitative PCR for the phylum Bacteroidetes confirmed the results obtained in the metagenomics, finding a greater quantity in the SmBr group, as well as a decrease in Firmicutes. The livers of the animals in the control and infected groups were also obtained to evaluate the composition of the microbiota, and only the infected animals had bacteria in the liver. Molecular analysis shows the presence of bacteria from the phylum Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacterias. Four species of bacteria were isolated from the liver of SmBr animals and their identification was performed using the MALDI-TOF technique (*Bordetella hinzii*, *Haemophilus haemolyticus*, *Lactococcus garvieae* and *Escherichia coli*); SmJp (*Staphylococcus nepalensis* and *Staphylococcus sciuri*) and SjJp (*Enterococcus galinarum*, *Staphylococcus sciuri* and *Paenibacillus*). Tests to determine the sensitivity profile of bacteria to different antibiotics (Clindamycin, Doxycycline, Erythromycin, Gentamicin, Levofloxacin and Sulfamethoxazole + Trimethoprim) showed that all species studied showed sensitivity to Gentamycin. This antibiotic showed

greater efficiency both by the analysis of Minimum Inhibitory Concentration and by the Minimum Microbicide Concentration. For Erythromycin, the bacteria *B. hinzii*, *L. garvieae*, *S. nepalensis* and *S. sciuri* showed sensitivity. As for Levofloxacin, *H. haemolyticus*, *E. coli*, *L. garvieae*, *S. nepalensis* and *S. sciuri* were sensitive. In histological sections, it was possible to observe exudative schistosomal granulomas in the liver; and in the intestine, egg retention of parasites in the mucous layer and increased cellularity were identified, which consisted of accumulation of mononuclear and polymorphonuclear cells. It was also possible to verify that some bacteria are able to adhere to the surface of adult worms (*E. coli*) and eggs (*L. garvieae*) of *S. mansoni*. The results obtained indicate a change in the intestinal microbiota with possible spread of bacteria to other organs, such as the liver, showing a possible bacterial translocation.

Keywords: Schistosomiasis. Microbiota. Bacterial Translocation. Antibacterials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Locais não endêmicos, status de tratamento e status de transmissão para esquistossomose no mundo.....	29
Figura 2 -	Variação da microbiota intestinal.....	36
Figura 3 -	O epitélio intestinal, microbiota intestinal, fatores ambientais e resposta imune.....	42
Figura 4 -	Fluxograma do delineamento experimental.....	48
Figura 5 -	Unidades Formadoras de Colônia nas fezes.....	58
Figura 6 -	Classificação das bactérias de Filo até Família à partir de fezes camundongos infectados com <i>S. mansoni</i>	60
Figura 7 -	PCR em tempo real para Bactérias Totais e Filo Bacteroidetes.....	61
Figura 8 -	Classificação das bactérias de Filo até Família à partir de fígado camundongos infectados com <i>S. mansoni</i>	65
Figura 9 -	Fígado e intestino sem alterações, granulomas esquistossomóticos hepáticos e presença de ovos no intestino de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> em fase aguda corados com Eosina e Hematoxilina.....	72
Figura 10 -	Porcentagem de redução da resazurina na adesão de bactérias.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Primers para PCR em tempo real.....	50
Tabela 2 -	PCR em tempo real para CBr e SmBr.....	61
Tabela 3 -	Crescimento de bactérias de fígado de camundongos.....	62
Tabela 4 -	Número de UFC/mg de fígado de camundongo infectado SmBr.....	63
Tabela 5 -	Número de UFC/mg de fígado de camundongo infectado SmJp.....	63
Tabela 6 -	Número de UFC/mg de fígado de camundongo infectado SJJp.....	63
Tabela 7 -	Identificação de bactérias à partir do fígado dos animais infectados SmBr, SmJp e SJJp.....	66
Tabela 8 -	Halos (em milímetros) de bactérias isoladas de fígado de animais infectados com <i>S. mansoni</i> a partir de Antibiograma.....	67
Tabela 9 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para SmBr.....	68
Tabela 10 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para SmJp.....	69
Tabela 11 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para SJJp.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IgA	- Imunoglobulina A
BE	- Bile Esculina
BHI	- Brain Heart Infusion
°C	- Graus Celcius
CHCA	- α -ciano-4-hidroxi-ácido cinâmico
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CMM	- Concentração Microbicida Mínima
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DO	- Densidade Óptica
EMB	- Eosin Methylene Blue agar
g	- Força g
IL-1	- Interleucina 1
IL-2	- Interleucina 2
IL-4	- Interleucina 4
IL-5	- Interleucina 5
IL-10	- Interleucina 10
IFN- γ	- Interferon gama
LB	- Luria-Bertani
MALDI-TOF	- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight
MN	- Mononucleares
MRS	- de Man, Rogosa e Sharpe
NaCl	- Cloreto de Sódio
PMH	- Projeto de Microbioma Humano
PMN	- Polimorfonucleares
PZQ	- Praziquantel
TCD4	- Linfócitos TCD4
TCD8	- Linfócitos TCD8
Th1	- Linfócitos T helper 1
Th2	- Linfócitos T helper 2
Th17	- Linfócitos T helper 17
T regs	- Células T reguladoras

μL	- Microlitro
μM	- Micrometro
UFC	- Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
	CAPÍTULO 1 – ARTIGO DE REVISÃO LITERÁRIA	18
	CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DA MICROBIOTA NA ESQUISTOSSOMOSE AGUDA	29
2	REFERENCIAL TEÓRICO	29
2.1	ESQUISTOSSOMOSE	29
2.2	MICROBIOMA	31
2.3	MICROBIOTA E A INTERAÇÃO COM ORGANISMO HOSPEDEIRO	34
2.4	MICROBIOTA INTESTINAL BACTERIANA	35
2.5	MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS PARASITÁRIAS	39
2.6	BACTÉRIAS E ESQUISTOSSOMOSE	42
2.7	DESAFIOS PARA O TRATAMENTO	44
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	ANIMAIS	48
4.1.2	Infecções por espécies de <i>Schistosoma</i>	49
4.2	ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> E NÃO INFECTADOS	49
4.2.1	PCR em Tempo Real	50
4.2.2	Metagenômica	50
4.2.3	Determinação do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia)	53
4.2.4	Identificação bacteriana por MALDI-TOF	53
4.2.5	Antibiograma	54
4.2.6	Concentração inibitória mínima (CIM)	54
4.2.7	Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM)	55
4.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E CAPTURA DE FOTOS	56
4.4	DETERMINAÇÃO DA ADESÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS	56
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5	RESULTADOS	58
5.1	ESTUDO DA MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i> E <i>S. japonicum</i> NAS FEZES	58
5.1.1	Análise Metagenômica nas fezes	58
5.1.2	PCR em tempo real	61
5.2	ESTUDO DA MICROBIOTA DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i> E <i>S. japonicum</i>	62
5.2.1	Contagem de bactérias presentes no fígado	62
5.2.2	Análise Metagenômica do fígado	63
5.2.3	Identificação das bactérias provenientes do fígado - MALDITOF	66
5.2.4	Antibiograma das bactérias isoladas do fígado	67
5.3	CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO E INTESTINO	70
5.4	ADESÃO DE BACTÉRIAS	73
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXOS	95

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose, doença causada por espécies do *Schistosoma*, dentre elas o *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum*, afeta ao redor do mundo aproximadamente 230 milhões de pessoas. Estes platelmintos, da classe dos trematódeos, apresentam um complexo ciclo de vida, na qual homem é o hospedeiro definitivo e o caramujo é o hospedeiro intermediário (World Health Organization, 2020). No hospedeiro definitivo, o parasito migra pela corrente sanguínea, chegando ao fígado para maturação sexual até a postura de ovos, que é feita no plexo mesentérico do intestino grosso tanto para *S. mansoni* quanto para *S. japonicum*. Decorrente da destruição tecidual causada pela reação inflamatória ao redor dos ovos, bactérias da microbiota intestinal podem infiltrar por estas lesões do tecido (BARNHILL *et al.*, 2011).

A microbiota intestinal é importante para o ser humano, pois está envolvida em diversos processos no organismo, desde o aproveitamento de nutrientes à proteção imunológica. Vários são os microrganismos presentes no organismo humano, sendo que vírus, fungos, protozoários e bactérias podem variar dependendo do local, porém, o intestino é um dos órgãos com maior presença de bactérias, e estas podem trazer benefícios para o hospedeiro, ou desencadear alterações que leve a disbiose (TURNBAUGH, 2007; KIM; JAZWINSKI, 2018). Parasitos, tais como helmintos podem colonizar o mesmo ambiente, e uma vez em conjunto com as bactérias, podem trazer desequilíbrios. A interação entre parasitos e bactérias intestinais pode propiciar estudos em intervenções terapêuticas que podem ser feitas a partir da manipulação da estrutura da microbiota intestinal, regulando as respostas inflamatórias (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012).

A associação das bactérias ao parasito, seja em suas formas evolutivas através de adesão ao tegumento ou à casca dos ovos, assim como as bactérias ingeridas pelos vermes adultos ao se alimentarem do sangue do hospedeiro definitivo, possibilita infecções bacterianas mais prolongadas e a ineficácia de tratamento de ambas as infecções, pois poucos são os medicamentos disponíveis para tratamento da esquistossomose, e uma vez instalada, o tratamento exige acompanhamento para ter a cura efetiva (BARNHILL *et al.*, 2011). Disponível no mercado, o Praziquantel (PZQ) é droga mais usada em larga escala atualmente para tratar esquistossomose, porém em certos locais do mundo o medicamento já não é tão efetivo (PORDEUS *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2016; WHO, 2016b)

Sendo assim, neste trabalho foi realizado uma revisão literária a respeito da interação microbiota, geohelmintos e esquistossomose (vide capítulo 1 à seguir). Junto a isto, experimentalmente, fez-se a análise da composição da microbiota de camundongos infectados com *S. mansoni* e *S. japonicum*; e através do isolamento das bactérias do fígado de camundongos infectados em fase aguda e avaliação do perfil de susceptibilidade desses isolados à antibióticos. Adicionalmente, foram feitas as análises histológica de fígado e intestino, PCR quantitativo e de adesão de bactérias aos ovos e vermes adultos, com os quais foi possível inferir sobre uma eventual translocação bacteriana, uma vez que bactérias da microbiota intestinal podem se associar às formas evolutivas do parasito, e que pode dificultar o tratamento de ambas as infecções.

CAPÍTULO 1 – ARTIGO DE REVISÃO LITERÁRIA

Review

Unbalanced relationships: Insights on the interaction microbiota, geohelminths, and schistosomiasis

Matheus Pereira de Araújo^{1,2,#}, Marcello Otake Sato^{2*#}, Megumi Sato³, Satoru Kawai², Luiz Felipe Leomil Coelho¹, Raquel Lopes Martins Souza¹, Marcos José Marques¹

¹ Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil; matheus.araujo@unifal-mg.edu.br

² Dokkyo Medical University, Mibu, Tochigi, Japan; marcello@dokkyomed.ac.jp

³ Niigata University, Niigata, Niigata, Japan.

Contributed equally

* Correspondence: marcello@dokkyomed.ac.jp; Tel.: +81 0282-87-2134; FAX: +81 0282-86-6431

Abstract: Hosts, their microbiota, and parasites have co-evolved in an adaptative relationship from remote times. The interaction between parasites and intestinal bacteria is currently a subject of great interest in terms of hosts and health. Therapeutic interventions can be made manipulating the structure of the intestinal microbiota which have immunological interactions for both modulating the host's immune system and for reducing inflammation. Most of the helminth parasites are intestinal and this environment provides complex interactions with other microorganisms in which internal and external factors can influence the composition of the intestinal microbiota. Besides, helminths and intestinal microorganisms can modulate the host's immune system beneficially or not. The immune system can be depleted with co-infection and bacteria from intestinal microbiota can translocate to other organs. In this way, the treatment can be compromised and together with drug resistance by the parasites, make healing even more difficult. Thus, this work aims to understand how interaction can occur of the microbiota and parasitic diseases from the most important geo-helminths and schistosomiasis, and the consequences of this association.

Keywords: parasites; microbiota; host-pathogen interaction

1. Introduction

The microbiota is important for humans because it is involved in several processes in the body from the use of nutrients to immune protection. New treatments with the use of antibiotics, immunization, and better sanitation are among some of the factors that can alter the microbiota. Other microorganisms besides the commensals can interfere in the natural regulation of the organism [1,2]. Parasites, such as helminths, can colonize the same environment and once together with bacteria, can lead to imbalances where the obstruction of gut can lead to changes in absorption of nutrients resulting in severe malnutrition. Parasitic diseases affect millions of people around the world mainly in countries undergoing industrialization. It is estimated that almost a quarter of the population needs treatment for parasitic infection often occurring with multiple infections. Since they can interact with the host microbiota, the composition of intestinal bacteria can be a tool to modulate the immune system with the progression of parasites to prevent or mitigate intestinal infection [1,3].

Advances in medical technology, health systems and changes in the population's lifestyle (psychological, physical stress and diet) have directly reflected in the treatment of parasitic diseases [4]. However, studies related to neglected diseases are poorly financed in developed countries which has led to a shortage of new drugs. There are drugs for treatment, but due to this deficit in attention to infectious diseases, there are few alternatives being developed for treatment in cases of resistance by parasites and co-infections [5]. In addition to this, allergies are related with food and microbiota where the use of many antibiotics during infancy can be a problem in child development [6]. The alterations of microbiota can be directly related to inflammatory disorders and the risk of other ones too like autoimmune diseases and its possible mechanism in organisms that include alteration on intestinal mucosa permeability and the host immune response caused by the microbiota [7]. Since many parasites can interact with the host microbiota, challenges of new treatments and consequences to the individual who has these parasites can be observed like alterations in

the immune system and consequences from the development of disease for a chronic phase [8,9]. This review aims to understand this on how geo-helminths and schistosomiasis interact with the host microbiota and its significance in alterations to health.

2. Microbiota and the interaction with host organism

The microbiota consists of the microorganisms present in a specific place in the organism. It is determined by its diversity and quantity of species present by the activity of the organism and by the relationship with the host and there may be synergism or even competition of these species for the habitat [10]. The misuse of antibiotics, dietary changes and other infections, such as helminths competing for the same habitat, make the studies with microbiota necessary to understand the pathogen-host interaction since microorganisms can lead to imbalances that favor opportunistic infections [11].

The microbiota of an adult human has specific bacteria genera like *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and several gram-positive cocci, while *Enterococcus* and *Enterobacteriaceae* are considered secondary families [12-14]. Thus, variations in the composition of the intestinal microbiota between individuals do not compromise an adequate function, rather, adaptations are made for each one according to multifactorial characteristics.

The species of microorganisms that colonize the organism of animals are related to a beneficial association with the host. Commensal microorganisms colonize many parts of mammals, including the gingiva, the oropharynx, the skin, the gastrointestinal and genitourinary tracts by different species of microorganisms. The human being has a composition of 100 trillion cells of microorganisms that express unique genes when compared to the human genome [15,16], and several communities of commensal microorganisms, including bacteria, archaea, fungi, protozoa and viruses [17,18].

Throughout the gastrointestinal tract, each part presents a different microbiota. The microbiota of the mouth presents a diversified number of bacteria and some factors are important for maintenance of colony, like saliva, which is important for adhesion of bacteria and adequate pH; excess of cortisol hormone can be prejudicial for the immunological system, impairing mucosa immunoglobulins; and the temperature around 35 degree Celsius to maintain good conditions for the local resident microbiota [19].

In the esophagus, there is a predominance of *Streptococcus* species and the alteration of microorganisms in this location is associated with inflammatory foci and dysplasia. *Prevotella*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* and *Staphylococcus* have also been detected and these bacterial genera can provide complementary health-related functions. Among some bacterial groups, such as streptococci, they may include strains that extend their habitats from the oral cavity to the esophageal mucosa and to the stomach in the absence of *Helicobacter pylori* infection [20,21].

The types of microorganisms in the stomach are limited. Due to the acidic pH, only resistant bacteria survive this environment. *H. pylori* is an example and its presence affects the composition of the microbiota present since this bacterium can be commensal or pathogenic and can cause peptic ulcer and gastritis. Approximately 10 genera are more prevalent in the human stomach which include *Rothia*, *Streptococcus*, *Veillonella* and *Prevotella*[20,22,23].

The greatest variation occurs in the intestine where bacterial communities increase in diversity and complexity in the proximal-distal direction from the duodenum to the jejunum and ileum. *Streptococcus* is a dominant genus in the duodenum and jejunum [22] and the adult's remaining intestinal microbiota is dominated by two phyla, Firmicutes and Bacteroidetes, which covers about 90% of all bacterial species in the intestine followed by Actinobacteria and Verrucomicrobia[8,24,25].

The microbiota is known to influence the development and balance of the immune system and has been studied in the prevention of opportunistic diseases as well as in the influence of systemic autoimmune diseases [26]. The immune response acts in various parts of the body as a barrier and maintains microbial homeostasis. The physiological responses, even though the modulation of the host's immune system are made through signals transmitted by bacteria which can influence the immune system's response both innate and adaptive, result in systemic responses far from the colonization site [14].

The host's defense mechanisms in colonization resistance to infection by pathogens are related in habitat competition for nutrients and for fixation sites for production of antimicrobial compounds and for production of metabolites that may be unfavorable to the growth of pathogens [26]. Animals free of microorganisms, and those with a deficiency of commensals due to the use of antibiotics, show that an

exogenous microbiota is necessary to acquire resistance to unwanted colonization mainly for pathogenic microorganisms. A study showed a diarrhea phenomenon caused by the growth of *Clostridium difficile* in the intestine of humans after the use of broad-spectrum antibiotics with destruction of the microbiota [27]. Another studies [28,29] showed the beneficial role of the commensal microbiota in protecting against infection by pathogens in mice without microorganisms, concluding that those with an already established microbiota had a competent immunological defense system.

Still not very well elucidated is the manipulation of the composition of the microbiota which can have consequences on the host's ability to mount protective responses because there are differences along the gastrointestinal tract [30]. The intestinal tract presents an immune defense barrier for the organism and it is a site that has the most commensal microorganisms, a joint action of epithelial cells, mucus release, and immunoglobulins. This protection is necessary to maintain homeostasis since the host's microbiota tries to minimize contact with invading microorganisms with reduction of tissue inflammation and attempts to avoid a possible translocation of microorganisms to other parts of the organism [31].

The challenge in the intestine is due to its vast extension since the villi substantially increases the contact surface and allows microorganisms to lodge and reproduce in these places. In addition, the mammalian immune system must continuously deal with its own diverse microbiota, a huge external microbial load and frequent pathogens ingested in food and water [32]. The interaction between the gastrointestinal tract and the resident microbiota is well balanced in healthy individuals but in disequilibrium, it can lead to diseases in the intestine and elsewhere in the body.

The mammalian intestine contains a dynamic community of microorganisms that establish symbiotic relationships with their hosts, bringing essential contributions to human metabolism while living in a protected environment with conditions necessary for proliferation and for obtaining nutrients. In certain populations, it is observed that there are minor responses to certain oral vaccines in children living in emerging countries when compared to industrialized countries, but it depends on multiple factors that lead to this situation such as malnutrition [12]. In studies in Africa, the rotavirus vaccine had an effect on 49% of children, however, positive results are observed in 95% of the population of Western children [33]. The lack of microbiota can influence and reduce the effect of the use of Cyclophosphamide with mice that were treated with antibiotics in addition to less effective immune responses against tumors [34].

The use of nutrients is part of the role of the resident microbiota in the intestine for the host, such as absorption of calcium, iron, magnesium, vitamin K, vitamin B12, biotin and folic acid [35,36]. Regarding the composition of food, each type of carbohydrate can affect the composition of bacteria in the intestinal microbiota, and the composition can affect the metabolism of these sugars. On the other hand, the composition of the community can affect its ability to metabolize food carbohydrates. Vegetable starch, which is rich in amylopectin or amylose, is a common component in food and is metabolized by Bifidobacterium, Bacteroides and Fusobacterium bacteria. The relative consumption of vegetables, fruits and meat has been reported as an important factor in conducting the composition gastrointestinal microbiota and health in the elderly [37]. In this way, the carbohydrate-rich diets that predominate on the African continent favor Bacteroidetes that are able to degrade xylan and cellulose to use energy from vegetable-based diets.

The diets high in fat and animal proteins that are predominant in Western countries are related to the phylum Firmicutes, and to the metabolism of proteins and sugars which is one example of how there is an adaptation according to the environment where one lives in [9]. For proteins, these can be converted into amino acids, as well as compounds for immune-protection and signaling. Bacterial proteinases and peptidases work together and are able to break the larger molecules into fragments for better absorption and utilization. As an example, L-histidine can be converted to amine and histamine by histidine decarboxylases, which are produced by intestinal bacteria [38].

The interaction among human cells and bacteria can occur in many different ways as described. The non-existent basic sanitation, lack of hygiene, consumption of contaminated food, and the lack of information for the population can result in diseases and among them, parasitic diseases can occur which is necessary for the comprehension of this association.

3. Microbiota and parasitic diseases

Helminths have a detrimental effect on the host organism. Foodborne parasitic diseases as well as those that are waterborne are important worldwide, resulting in millions of deaths every year [3]. In endemic areas, with infected individuals excreting eggs and larvae, there may be contamination of the soil and food, and together with the lack of governmental actions to avoid the transmission, the proliferation of these parasites is more frequent [37]. The main helminth diseases in Brazil are ascariasis, tricuriasis, hookworm and the plathelminth schistosomiasis but other parasites can have direct interaction with microbiota [3].

The host's defense mechanisms in colonization resistance to infection by pathogens are related in habitat competition both for nutrients and for fixation sites, and production of antimicrobial compounds such as colicins and microcins, and production of metabolites that may be unfavorable to the growth of pathogens [13,26]. The parasites attempt to deceive the host's immune system. The responses directed to bacteria and helminths are different with effector mechanisms of helper T cells T helper 1, Th17 for bacteria and Th2 for helminths. Some bacteria are able to suppress with induction of regulatory T cells (Tregs) such as *Bacteroides fragilis* and *Clostridium* spp. [39,40].

The innate immune response induces the production of interleukins such as IL-6, IL-8, IL-12, INF-gamma, TNF-alpha and the adaptive immune system, and induces the production of IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22. Given the Th2 response to helminths with the breakdown of immune homeostasis there may be functional changes in bacterial populations with diet, exposure to UV rays, and exercise that can influence the colonization of bacteria in the intestinal epithelium [41]. In the predominance of Th2 cells, cytokines are not enough to remove adult worms from the intestine. In addition, even with long-lasting response of Th2 cells, infected people show no signs of an evident worm allergy and are actually protected against the development of allergies [42,43].

Observing that the immune system is not enough to eliminate the infection by itself, helminths are still a huge problem for developing countries. Affecting approximately 800 million people, *Ascaris lumbricoides* is one of the most prevalent helminth infections in the world [3]. In Brazil, the proportion of positive cases for *A. lumbricoides* is 6% and it is found in all the country's states [44]. The parasite can infect reptiles, fishes, birds, mammals and the transmission occurs with water and food contaminated with eggs. An individual after ingesting embryonated eggs with larvae in stage 1 (L1), will have more than 3 stages of the parasite inside the body where L2 penetrates the intestinal mucosa and migrates to the lung circulation; L3 from the alveolar wall pass through the tracheobronchial area to the larynx where these larvae can be released with a cough or mucus or ingested again going to the small intestine, finalizing the maturation and becoming L4, the final stage, when a female parasite is mature and can lay around 200,000 eggs a day [45,46].

In the same way, *Trichuris trichiura* is estimated to have infected more than 450 million people around the world [47] with a rate of infection of 5.41% in the last national survey in Brazil [44]. This parasite presents sexual dimorphism like *A. lumbricoides*, but different from the cylindrical body from the first, *T. trichiura* has a notable feature which is the whip aspect, and the habitat is the human large intestine, especially the cecum and ascending colon. Through the ingestion of embryonated eggs, the cycle is fecal-oral, in which the lack of hygiene is a fundamental factor for contamination. After ingestion, eggs are semi-digested by gastric juices, allowing the larvae to hatch at the level of the small intestine, and migrate to the large intestine where they settle. There the larvae undergo four seedlings and transform into adult worms in about two to three months [47,48].

Th2 cells respond in defense of an organism with production of IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, being characteristic of the IgE and increasing of eosinophils for both parasites and expansion of mast cells and basophils [48,49]. The ascariasis is very allergenic and the tropomyosin species specific presence in Asc s 1, and a cross reacting AscI 3, have been reported to be the main allergens [50]. In some cases, the infection in childhood is associated with asthma, and this occurs in part because its pulmonary larval stage has consequences on the development of disease. However, a protective effect from rhinitis was already observed with *T. trichiuria* and when the infection is early life, the parasite is associated with a low allergen skin test reactivity. This is related to mothers who had an infection causes the prevalence of eczema to be reduced in their children [51,52].

When the interaction with the microbiota occurs because of the presence of parasites in the intestine, some responses can be observed. A study using piglets showed the ability of *Ascaris suum* to create an

antimicrobial strategy to avoid the host microbiota with production of a substance that inhibited the bacteria depending on the parasite life-stage [53]. *A. lumbricoides* was confirmed that it might be associated with changes of child microbiota and another result showed that with *T. trichiura*, it was not related to alterations with the host microbiota [54]. On the other hand using animal models working with the intestinal helminth *Trichuris muris*, it was demonstrated that the infection of mice with this parasite significantly altered the intestinal microbiota reducing the diversity and abundance of *Prevotellae* and *Parabacteroides* [55]. In addition to changes in the microbiota, helminth infections can also modify the host's metabolism with implications for immune modulation. It was also shown that the experimental infection of *T. muris* in mice reduced a large number of metabolic products when compared to infected and uninfected mice. There was a decrease in vitamin D, many fatty acids, glycerophospholipids, carbohydrates and amino acid synthesis intermediates which shows the negative effect of the presence of these parasites [55].

The hookworms, *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*, are present in many emerging countries and it is estimated around 570 million people can be infected with these parasites. In Brazil, ancylostomiasis has 2.73% of prevalence [44]. The infection by hookworms occurs through active penetration of the filariform larvae into the mucosa or skin especially in the regions of the feet, legs, buttocks, and hands as well as by ingesting the larvae with contaminated food. Skin injury at the penetration site and lung injury due to the parasites passing through this organ, and lesions of the intestinal mucosa with blood spoliation are observed, with anemia as the chronic condition due to the evolution of the disease [42].

Regarding the interaction with microbiota during the acute phase of ancylostomiasis, it was demonstrated that no differences of microbiota was observed in feces of humans when compared with healthy individuals but that maybe with a biopsy of the places where the parasites are fixed, differences could appear. Another point is the intensity of the infection where the higher the number of parasites, alteration in microbiota could be observed [56]. A recent research analyzing the relationship with hookworms and *Mycobacterium tuberculosis* showed that persons with the parasite infection have a potential for the reduced prevalence of tuberculosis, and possibly an anti-mycobacterial role for helminth-induced eosinophils is involved in this process [57].

One of the most important infectious disease, schistosomiasis, has a complex life cycle different from geohelminths presented before because the parasite needs an intermediate host to complete its cycle. A person, defined as the infected host, lays the eggs through the feces or urine, where *S. mansoni* and *S. japonicum* being the main species for the first case and *S. haematobium* for the second. The female parasite can lay around 300 eggs by day and the egg upon contact with the water, in adequate conditions of light and temperature, makes the miracidium to hatch from the egg and in this way the ciliate larva can infect the intermediate host snail, that in Brazil is the specie *Biomphalaria glabrata* [58]. In four to six weeks, and at the end of development, the evolutionary form released is the cercaria. This becomes free by the waters and infects the definitive host through active penetration into the skin or mucosa when they lose their tails and undergo a modification turning into schistosomules [59]. These forms migrate through the bloodstream and proceed towards the heart and lung, but the parasite matures in the liver where the parasite finds satisfactory conditions for its development and reaches its sexual maturation. The female depends on the male to reach the mesenteric veins of the lower plexus of the large intestine and once mated, the female begins laying eggs and part of them is retained in the tissues causing the granulomatous reaction; others reach the intestinal lumen and are released into the environment along with the feces [3,58,59].

Considered the second parasite disease in the number of contaminated people in the world, and around 2.71% of infected people in endemic areas of Brazilian territory [44], infection by *Schistosoma* spp. causes several pathological processes by lesions in the intestinal epithelium which, associated with the immunomodulatory response, can lead to a decrease in the protective barrier against bacteria [55]. Thus, these conditions favor the bacterial translocation of the intestinal lumen into the bloodstream. *S. mansoni* infection has the ability to suppress the immune response. It was already demonstrated that the ability of schistosomiasis to modulate the immune response in individuals evaluating with vaccination for tetanus which showed a mixed response of Th1 and Th2 [60]. It was related an experimental association between *S. mansoni* and *Paracoccidioides brasiliensis*, with a modulation of granulomatous inflammation of schistosomiasis developed in mice co-infected, with a divergent profile of cytokines such as IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-5 being other example of immunomodulation [61]. Other studies demonstrate the influence of the parasite with viruses, with the production of CD4 + T and CD8 + T cells, and thus, these interactions in

co-infected hosts can alter the transmission, clinical evaluation and control of multiple infectious diseases [62,63].

It is possible that the Venom-Allergen-Like proteins of *S. mansoni* (SmVALs) are involved in the process of allergy [64]. These proteins are involved in the process of immunomodulatory and they are secreted at different stages of the life cycle where SmVALs have been proposed as candidates for vaccines also [64,65]. In a study with Zimbabwean children infected with *S. haematobium* [66], the most frequent genus *Prevotella* was found in fecal samples. The use of Praziquantel, a medication widely used to treat schistosomiasis, has not reversed the composition of the microbiota suggesting that exposure to platyhelminths in childhood may have long-term effects on the structure of the microorganism community. Another study conducted [67] demonstrated that host commensal bacteria, during infection by *S. mansoni*, played an important role in the result of the formation of intestinal granulomas and specific immune responses of schistosomiasis which may influence the excretion of the egg. Some studies report cases of septicemia in bacterial confections with *S. mansoni* [68-70]. Once in circulation, these bacteria reach the adult worms of *S. mansoni*, present in the mesenteric veins, and associate with the cecum [71]. The association of bacteria with *S. mansoni* enables more prolonged bacterial infections, the development of resistance to antibiotics and the ineffective treatment of both infections [69].

With the use of antibiotics, one of the biggest control challenges is what occurs mainly in hospitals. The misuse of these drugs without the correct guidance and used indiscriminately, leads to resistance and selection of microorganisms [72]. Resistant strains are selected when the drug is not used according to its function and correct dosage in which its dose and time of use are essential for successful therapy. With the increase in resistance by microorganisms, many diseases will have their treatment compromised in addition to major complications that can even lead to death, and together with this, greater public health expenditure to try to supply the problems ranging from diagnosis to definitive cure [73,74].

The etiologic agents most described and given as resistant bacteria are *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp., *Escherichia coli* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [74,75]. This diversity, which leads to specific characteristics for the identification of microorganisms, means that the treatment is assigned according to the protocol already established and not with a detailed identification and this has been considered as a factor in the increase in mortality rates especially in hospitalized patients [72].

The treatment for helminths is based on Albendazole and Mebendazole and these drugs bind to parasite β -tubulin and inhibit parasite microtubule polymerization, which causes death of adult worms [46]. For schistosomiasis, Praziquantel (PZQ) is the drug used and it can kill all evolutive forms inside the definitive host. By the lowest effective concentrations, it causes increased muscle activity followed by contraction and spastic paralysis. At higher therapeutic concentrations, praziquantel causes vacuolization and vesiculation of the tegument. This effect results in the release of the parasite content, activation of the host's defense mechanism and destruction of the worms [76]. Other therapies are being used for treatment using the interaction of microbiota and helminths. For Inflammatory bowel disease and celiac disease, the use of Helminth therapy seems a favorable pathway because altering intestinal permeability and the host's immune response to a Th2 cytokine-mediated response is possible to immunomodulating the host defense [77,78].

Unfortunately, not only antibiotics has problems with resistance. Strains obtained from places where the schistosomiasis is endemic showed different sensitivity to PZQ and it could be related with a previous contact with the parasite, so, in cases of reinfection, there is necessity of a different treatment [79]. The use of a unique drug for treatment has been studied over the years and the results shows the resistance by parasites [80], reducing the percentage of cure in African countries like in Senegal, with a cure rate of only 18% [81], and Kenya which indicate a substantial variation in drug efficacy in kids [82].

In this way, the control and rational use of antimicrobials, which includes both the use for parasites and bacteria, has the objective of better treatment, prophylaxis and minimization of adverse effects safely in the treatment proposed for the patient. Surveillance for the correct and safe use is important, as large-scale treatment when misapplied can result in damage to public health.

4. Conclusion: the unbalanced relationship among microorganisms and health

The interaction between microbiota and parasites is complex and needs attention. *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *N. americanus*, *A. duodenale* and *S. mansoni* have different forms of interaction with the host microbiota, even sharing part of the same mechanism of activation of immune defense. While most of them can do a modification in gut microbiota, other appear not influence it, like the *N. americanus*. New studies have been done, not all are yet elucidated, such as how is it possible to manipulate the microbiota beneficially for the host, because most parts of these studies were made in a controlled infection, different from places where a person can also have a huge infection or co-infections. The complete understanding of organisms in how the immune system interacts with the host and with the invasive bacteria and parasites can be a key for new treatments and its application could control of the establishment of infection with consequent diminishing the transmission in endemic areas.

Author Contributions: Conceptualization, writing-original, draft preparation: M.P.A, M.O.S.; writing-review and editing: M.J.M., M.S., S.K.; Supervision: M.J.M., M.O.S., R.L.M.S., L.F.L.C., M.S.,S.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and in part by Dokkyo Medical University Research Funding.

Acknowledgments: We are thankful to the staff of Dokkyo Medical University, Universidade Federal de Alfenas and Niigata University for their logistical support. Thanks to Clyde Ito, Department of Pediatrics, Dokkyo Medical University for the kind reading and improving of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Turnbaugh, P.J.; Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature*. 2007 Oct 17;449(7164):804–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature06244>
2. Stensvold, C.R.; van der Giezen, M. Associations between Gut Microbiota and Common Luminal Intestinal Parasites. *Trends Parasitol*. 2018, 34, 369–377, doi:10.1016/j.pt.2018.02.004.
3. WHO. Soil Transmitted Helminth Infections. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections> (accessed on 12 November 2020).
4. Borges, G.M. Health transition in Brazil: regional variations and divergence/convergence in mortality. *Cad. Saude Publica* 2017, 33, doi:10.1590/0102-311x00080316.
5. Idris, O.A.; Wintola, O.A.; Afolayan, A.J. Helminthiasis; prevalence, transmission, host-parasite interactions, resistance to common synthetic drugs and treatment. *Heliyon* 2019, 5, e01161, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01161.
6. Love, B.L.; Mann, J.R.; Hardin, J.W.; Lu, Z.K.; Cox, C.; Amrol, D.J. Antibiotic prescription and food allergy in young children. *Allergy, Asthma Clin. Immunol*. 2016, 12, 41, doi:10.1186/s13223-016-0148-7.
7. Ajslev, T.A.; Andersen, C.S.; Gamborg, M.; Sørensen, T.I.A.; Jess, T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int. J. Obes*. 2011, 35, 522–529, doi:10.1038/ijo.2011.27.
8. Hooper, L. V.; Littman, D.R.; Macpherson, A.J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* (80-.). 2012, 336, 1268–1273, doi:10.1126/science.1223490.
9. Glendinning, L.; Nausch, N.; Free, A.; Taylor, D.W.; Mutapi, F. The microbiota and helminths: sharing the same niche in the human host. *Parasitology* 2014, 141, 1255–1271, doi:10.1017/S0031182014000699.
10. Zoetendal, E.G.; Collier, C.T.; Koike, S.; Mackie, R.I.; Gaskins, H.R. Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *J. Nutr*. 2004, 134, 465–472, doi:10.1093/jn/134.2.465.
11. Arrieta, M.-C.; Stiemsma, L.T.; Amenyogbe, N.; Brown, E.M.; Finlay, B. The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. *Front. Immunol*. 2014, 5, doi:10.3389/fimmu.2014.00427.
12. Knight, D.; Girling, K. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003, 361, 1831, doi:10.1016/S0140-6736(03)13438-1.
13. Rakoff-Nahoum, S.; Medzhitov, R. Role of the Innate Immune System and Host-Commensal Mutualism. In *Gut-Associated Lymphoid Tissues*; Springer Berlin Heidelberg; pp. 1–18.

14. Ivanov, I.I.; Atarashi, K.; Manel, N.; Brodie, E.L.; Shima, T.; Karaoz, U.; Wei, D.; Goldfarb, K.C.; Santee, C.A.; Lynch, S. V.; *et al.* Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* 2009, 139, 485–498, doi:10.1016/j.cell.2009.09.033.
15. Sonnenburg, J.L.; Angenent, L.T.; Gordon, J.I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat. Immunol.* 2004, 5, 569–573, doi:10.1038/ni1079.
16. Belkaid, Y.; Harrison, O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* 2017, 46, 562–576, doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008.
17. Foulongne, V.; Sauvage, V.; Hebert, C.; Dereure, O.; Cheval, J.; Gouilh, M.A.; Pariente, K.; Segondy, M.; Burguière, A.; Manuguerra, J.-C.; *et al.* Human Skin Microbiota: High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing. *PLoS One* 2012, 7, e38499, doi:10.1371/journal.pone.0038499.
18. Eckburg, P.B.; Lepp, P.W.; Relman, D.A. Archaea and Their Potential Role in Human Disease. *Infect. Immun.* 2003, 71, 591–596, doi:10.1128/IAI.71.2.591-596.2003.
19. Cornejo Ulloa, P.; van der Veen, M.H.; Krom, B.P. Review: modulation of the oral microbiome by the host to promote ecological balance. *Odontology* 2019, 107, 437–448, doi:10.1007/s10266-019-00413-x.
20. Sekirov, I.; Russell, S.L.; Antunes, L.C.M.; Finlay, B.B. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 2010, 90, 859–904, doi:10.1152/physrev.00045.2009.
21. Yang, L.; Lu, X.; Nossa, C.W.; Francois, F.; Peek, R.M.; Pei, Z. Inflammation and Intestinal Metaplasia of the Distal Esophagus Are Associated With Alterations in the Microbiome. *Gastroenterology* 2009, 137, 588–597, doi:10.1053/j.gastro.2009.04.046.
22. Andersson, A.F.; Lindberg, M.; Jakobsson, H.; Bäckhed, F.; Nyrén, P.; Engstrand, L. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS One* 2008, 3, e2836, doi:10.1371/journal.pone.0002836.
23. Bik, E.M.; Eckburg, P.B.; Gill, S.R.; Nelson, K.E.; Purdom, E.A.; Francois, F.; Perez-Perez, G.; Blaser, M.J.; Relman, D.A. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, 103, 732–737, doi:10.1073/pnas.0506655103.
24. Willing, B.P.; Russell, S.L.; Finlay, B.B. Shifting the balance: antibiotic effects on host–microbiota mutualism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011, 9, 233–243, doi:10.1038/nrmicro2536.
25. Hollister, E.B.; Gao, C.; Versalovic, J. Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health. *Gastroenterology* 2014, 146, 1449–1458, doi:10.1053/j.gastro.2014.01.052.
26. Ogaki, M.B.; Furlaneto, M.C.; Maia, L.F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. *Brazilian J. Food Technol.* 2015, 18, 267–276, doi:10.1590/1981-6723.2215.
27. Stoddart, B.; Wilcox, M.H. *Clostridium difficile*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002, 15, 513–518, doi:10.1097/00001432-200210000-00010.
28. Filho-Lima, J.V.M.; Vieira, E.C.; Nicoli, J.R. Antagonisticeffect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia colicombinations* against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88, 365–370, doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00973.x.
29. Hudault, S. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 2001, 49, 47–55, doi:10.1136/gut.49.1.47.
30. Gabryszewski, S.J.; Bachar, O.; Dyer, K.D.; Percopo, C.M.; Killoran, K.E.; Domachowske, J.B.; Rosenberg, H.F. *Lactobacillus* -Mediated Priming of the Respiratory Mucosa Protects against Lethal Pneumovirus Infection. *J. Immunol.* 2011, 186, 1151–1161, doi:10.4049/jimmunol.1001751.
31. McGuckin, M.A.; Lindén, S.K.; Sutton, P.; Florin, T.H. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011, 9, 265–278, doi:10.1038/nrmicro2538.
32. Mathers, C.D.; Boerma, T.; Ma Fat, D. Global and regional causes of death. *Br. Med. Bull.* 2009, 92, 7–32, doi:10.1093/bmb/ldp028.
33. WHO Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, October 2009 – Conclusions and recommendations. *Biologicals* 2010, 38, 170–177, doi:10.1016/j.biologicals.2009.12.007.
34. Viaud, S.; Saccheri, F.; Mignot, G.; Yamazaki, T.; Daillere, R.; Hannani, D.; Enot, D.P.; Pfirschke, C.; Engblom, C.; Pittet, M.J.; *et al.* The Intestinal Microbiota Modulates the Anticancer Immune Effects of Cyclophosphamide. *Science* (80-.). 2013, 342, 971–976, doi:10.1126/science.1240537.

35. Rabizadeh, S.; Sears, C. New horizons for the infectious diseases specialist: How gut microflora promote health and disease. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2008, 10, 92–98, doi:10.1007/s11908-008-0017-8.
36. Ursell, L.K.; Haiser, H.J.; Van Treuren, W.; Garg, N.; Reddivari, L.; Vanamala, J.; Dorrestein, P.C.; Turnbaugh, P.J.; Knight, R. The Intestinal Metabolome: An Intersection Between Microbiota and Host. *Gastroenterology* 2014, 146, 1470–1476, doi:10.1053/j.gastro.2014.03.001.
37. Wang, X.; Conway, P.L.; Brown, I.L.; Evans, A.J. In Vitro Utilization of Amylopectin and High-Amylose Maize (Amylomaize) Starch Granules by Human Colonic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 4848–4854, doi:10.1128/AEM.65.11.4848-4854.1999.
38. Thomas, C.M.; Hong, T.; van Pijkeren, J.P.; Hemarajata, P.; Trinh, D. V.; Hu, W.; Britton, R.A.; Kalkum, M.; Versalovic, J. Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. *PLoS One* 2012, 7, e31951, doi:10.1371/journal.pone.0031951.
39. Round, J.L.; Mazmanian, S.K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010, 107, 12204–12209, doi:10.1073/pnas.0909122107.
40. Thomas, C.M.; Hong, T.; van Pijkeren, J.P.; Hemarajata, P.; Trinh, D. V.; Hu, W.; Britton, R.A.; Kalkum, M.; Versalovic, J. Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. *PLoS One* 2012, 7, e31951, doi:10.1371/journal.pone.0031951.
41. Ahmed, I.; Roy, B.; Khan, S.; Septer, S.; Umar, S. Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms* 2016, 4, 20, doi:10.3390/microorganisms4020020.
42. Loukas, A.; Hotez, P.J.; Diemert, D.; Yazdanbakhsh, M.; McCarthy, J.S.; Correa-Oliveira, R.; Croese, J.; Bethony, J.M. Hookworm infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2016, 2, 16088, doi:10.1038/nrdp.2016.88.
43. Brosschot, T.P.; Reynolds, L.A. The impact of a helminth-modified microbiome on host immunity. *Mucosal Immunol.* 2018, 11, 1039–1046, doi:10.1038/s41385-018-0008-5.
44. Katz, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses. 2018; 76. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections> (accessed on 12 November 2020).
45. Nejsum, P.; Betson, M.; Bendall, R.P.; Thamsborg, S.M.; Stothard, J.R. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* : looking to the future from an analysis of the past. *J. Helminthol.* 2012, 86, 148–155, doi:10.1017/S0022149X12000193.
46. Bethony, J.; Brooker, S.; Albonico, M.; Geiger, S.M.; Loukas, A.; Diemert, D.; Hotez, P.J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 2006, 367, 1521–1532, doi:10.1016/S0140-6736(06)68653-4.
47. Vos, T.; Barber, R.M.; Bell, B.; Bertozzi-Villa, A.; Biryukov, S.; Bolliger, I.; Charlson, F.; Davis, A.; Degenhardt, L.; Dicker, D.; *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015, 386, 743–800, doi:10.1016/S0140-6736(15)60692-4.
48. Jourdan, P.M.; Lamberton, P.H.L.; Fenwick, A.; Addiss, D.G. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet* 2018, 391, 252–265, doi:10.1016/S0140-6736(17)31930-X.
49. Varyani, F.; Fleming, J.O.; Maizels, R.M. Helminths in the gastrointestinal tract as modulators of immunity and pathology. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 2017, 312, G537–G549, doi:10.1152/ajpgi.00024.2017.
50. Acevedo, N.; Erler, A.; Briza, P.; Puccio, F.; Ferreira, F.; Caraballo, L. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* Tropomyosin and IgE Sensitization among Asthmatic Patients in a Tropical Environment. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2011, 154, 195–206, doi:10.1159/000321106.
51. Zakzuk, J.; Casadiego, S.; Mercado, A.; Alvis-Guzman, N.; Caraballo, L. *Ascaris lumbricoides* infection induces both, reduction and increase of asthma symptoms in a rural community. *Acta Trop.* 2018, 187, 1–4, doi:10.1016/j.actatropica.2018.07.016.
52. Elliott, A.M.; Mpairwe, H.; Quigley, M.A. Helminth Infection During Pregnancy and Development of Infantile Eczema. *JAMA* 2005, 294, 2028, doi:10.1001/jama.294.16.2032-c.
53. Midha, A.; Janek, K.; Niewianda, A.; Henklein, P.; Guenther, S.; Serra, D.O.; Schlosser, J.; Hengge, R.; Hartmann, S. The Intestinal Roundworm *Ascaris suum* Releases Antimicrobial Factors Which Interfere With Bacterial Growth and Biofilm Formation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018, 8, doi:10.3389/fcimb.2018.00271.
54. Cooper, P.; Walker, A.W.; Reyes, J.; Chico, M.; Salter, S.J.; Vaca, M.; Parkhill, J. Patent Human Infections with the Whipworm, *Trichuris trichiura*, Are Not Associated with Alterations in the Faecal Microbiota. *PLoS One* 2013, 8, e76573, doi:10.1371/journal.pone.0076573.

55. Houlden, A.; Hayes, K.S.; Bancroft, A.J.; Worthington, J.J.; Wang, P.; Grecis, R.K.; Roberts, I.S. Chronic *Trichuris muris* Infection in C57BL/6 Mice Causes Significant Changes in Host Microbiota and Metabolome: Effects Reversed by Pathogen Clearance. *PLoS One* 2015, 10, e0125945, doi:10.1371/journal.pone.0125945.
56. Cantacessi, C.; Giacomini, P.; Croese, J.; Zakrzewski, M.; Sotillo, J.; McCann, L.; Nolan, M.J.; Mitreva, M.; Krause, L.; Loukas, A. Impact of Experimental Hookworm Infection on the Human Gut Microbiota. *J. Infect. Dis.* 2014, 210, 1431–1434, doi:10.1093/infdis/jiu256.
57. O’Shea, M.K.; Fletcher, T.E.; Muller, J.; Tanner, R.; Matsumiya, M.; Bailey, J.W.; Jones, J.; Smith, S.G.; Koh, G.; Horsnell, W.G.; *et al.* Human Hookworm Infection Enhances Mycobacterial Growth Inhibition and Associates With Reduced Risk of Tuberculosis Infection. *Front. Immunol.* 2018, 9, doi:10.3389/fimmu.2018.02893.
58. Nelwan, M.L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Curr. Ther. Res.* 2019, 91, 5–9, doi:10.1016/j.curtheres.2019.06.001.
59. Colley, D.G.; Bustinduy, A.L.; Secor, W.E.; King, C.H. Human schistosomiasis. *Lancet* 2014, 383, 2253–2264, doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2.
60. Sabin, E.A.; Araujo, M.I.; Carvalho, E.M.; Pearce, E.J. Impairment of Tetanus Toxoid-Specific Th1-like Immune Responses in Humans Infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.* 1996, 173, 269–272, doi:10.1093/infdis/173.1.269.
61. Araújo, M.P. de; Burger, E.; Dias R.N.; Akatuti, A.A.; Rodrigues, M.Â.; Mendes, A.C.S.C.; Bani, G.M. de C.; Santos, E.C.; Mendonça, A.A.S.; Souza, R.L.M. Impact of *Paracoccidioides brasiliensis* Coinfection on the Evolution of *Schistosoma mansoni*- Induced Granulomatous Liver Injury in Mice. *Biomed Res. Int.* 2019, 1–12, doi:10.1155/2019/8319465.
62. Chiodini, P.L. Chemotherapy for patients with multiple parasitic infections. *Parasitology* 2001, 122, S83–S89, doi:10.1017/S0031182000017674.
63. Pedersen, A.B.; Fenton, A. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 2007, 22, 133–139, doi:10.1016/j.tree.2006.11.005.
64. Chalmers, I.W.; McArdle, A.J.; Coulson, R.M.; Wagner, M.A.; Schmid, R.; Hirai, H.; Hoffmann, K.F. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. *BMC Genomics* 2008, 9, 89, doi:10.1186/1471-2164-9-89.
65. Rofatto, H.K.; Parker-Manuel, S.J.; Barbosa, T.C.; Tararam, C.A.; Alan Wilson, R.; Leite, L.C.C.; Farias, L.P. Tissue expression patterns of *Schistosoma mansoni* Venom Allergen-Like proteins 6 and 7. *Int. J. Parasitol.* 2012, 42, 613–620, doi:10.1016/j.ijpara.2012.04.008.
66. Kay, G.L.; Millard, A.; Sergeant, M.J.; Midzi, N.; Gwisai, R.; Mduluzi, T.; Ivens, A.; Nausch, N.; Mutapi, F.; Pallen, M. Differences in the Faecal Microbiome in *Schistosoma haematobium* Infected Children vs. Uninfected Children. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015, 9, e0003861, doi:10.1371/journal.pntd.0003861.
67. Holzschleiter, M.; Layland, L.E.; Loffredo-Verde, E.; Mair, K.; Vogelmann, R.; Langer, R.; Wagner, H.; Prazeres da Costa, C. Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis. *Clin. Exp. Immunol.* 2014, 175, 246–257, doi:10.1111/cei.12230.
68. Lambertucci, J.R.; Rayes, A.A.; Serufo, J.C.; Nobre, V. Pyogenic abscesses and parasitic diseases. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2001, 43, 67–74, doi:10.1590/S0036-46652001000200003.
69. Barnhill, A.E.; Novozhilova, E.; Day, T.A.; Carlson, S.A. *Schistosoma*-associated *Salmonella* resist antibiotics via specific fimbrial attachments to the flatworm. *Parasit. Vectors* 2011, 4, 123, doi:10.1186/1756-3305-4-123.
70. Hsiao, A.; Toy, T.; Seo, H.J.; Marks, F. Interaction between *Salmonella* and Schistosomiasis: A Review. *PLOS Pathog.* 2016, 12, e1005928, doi:10.1371/journal.ppat.1005928.
71. Muniz-Junqueira, M.I.; Tosta, C.E.; Prata, A. Salmonelose septicêmica prolongada associada à esquistossomose: evolução do conhecimento e mecanismos imunopatogênicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009, 42, 436–445, doi:10.1590/S0037-86822009000400015.
72. WHO. Plan on Antimicrobial Resistance. Available online: <http://www.globalhealthdynamics.co.uk/wp-content/uploads/2015/06/AMR2015-June-3.pdf> (accessed on 12 November 2020).
73. Williams, M.R.; Stedtfeld, R.D.; Guo, X.; Hashsham, S.A. Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environ. Res.* 2016, 88, 1951–1967, doi:10.2175/106143016X14696400495974.
74. WHO. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Available online: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf?ua=1

(accessed on 12 November 2020).

75. Silvestri, L.; Lenhart, F.P.; Fox, M.A. Prevention of intensive care unit infections. *Curr. Anaesth. Crit. Care* 2001, 12, 34–40, doi:10.1054/cacc.2001.0320.
76. Siqueira, L. da P.; Fontes, D.A.F.; Aguilera, C.S.B.; Timóteo, T.R.R.; Ângelos, M.A.; Silva, L.C.P.B.B.; de Melo, C.G.; Rolim, L.A.; da Silva, R.M.F.; Neto, P.J.R. Schistosomiasis: Drugs used and treatment strategies. *Acta Trop.* 2017, 176, 179–187, doi:10.1016/j.actatropica.2017.08.002.
77. Sipahi, A.M.; Baptista, D.M. Helminths as an alternative therapy for intestinal diseases. *World J. Gastroenterol.* 2017, 23, 6009–6015, doi:10.3748/wjg.v23.i33.6009.
78. Vale, N.; Gouveia, M.J.; Rinaldi, G.; Brindley, P.J.; Gärtner, F.; Correia da Costa, J.M. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, 61, doi:10.1128/AAC.02582-16.
79. Cioli, D.; Botros, S.S.; Wheatcroft-Francklow, K.; Mbaye, A.; Southgate, V.; TchuemTchuente, L.-A.; Pica-Mattocchia, L.; Rita Troiani, A.; Seif el-Din, S.H.; Sabra, A.-N.A.; *et al.* Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int. J. Parasitol.* 2004, 34, 979–987, doi:10.1016/j.ijpara.2004.05.001.
80. Stelma, F.F.; Gryseels, B.; Deelder, A.M.; Talla, I.; Kongs, A.; Sow, S.; Polman, K.; Niang, M. Efficacy and Side Effects of Praziquantel in an Epidemic Focus of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995, 53, 167–170, doi:10.4269/ajtmh.1995.53.167.
81. Gryseels, B.; Mbaye, A.; De Vlas, S.J.; Stelma, F.F.; Guisse, F.; Van Lieshout, L.; Faye, D.; Diop, M.; Ly, A.; Tchuem-Tchuente, L.A.; *et al.* Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop. Med. Int. Heal.* 2001, 6, 864–873, doi:10.1046/j.1365-3156.2001.00811.x.
82. King, C. Evidence Against Rapid Emergence of Praziquantel Resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 2000, 6, 585–594, doi:10.3201/eid0606.000606.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DA MICROBIOTA NA ESQUISTOSSOMOSE AGUDA

2 REFERENCIAL TEÓRICO

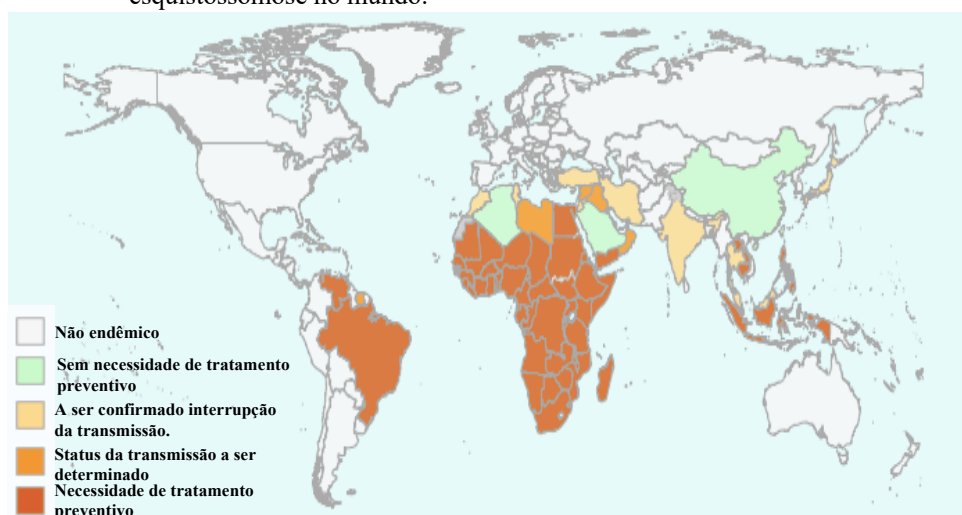
Neste capítulo, foi realizada uma revisão a respeito de microbioma, microbiota intestinal e esquistossomose, e realizada experimentalmente a análise da associação entre espécies de *Schistosoma* e bactérias.

2.1 ESQUISTOSSOMOSE

Doenças negligenciadas, tais como a esquistossomose, são comuns em países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2020), mais de 200 milhões de pessoas estão em áreas de risco e necessitam de tratamento ou acompanhamento nestes locais para que não haja transmissão da doença. De interesse médico, três são focos de grandes estudos, sendo o *S. mansoni* e *S. japonicum*, que tem seu habitat o sistema porta-hepático, e o *Schistosoma haematobium*, que se localiza no sistema urinário (BRASIL, 2017; WHO, 2020).

Em vários países no mundo ainda ocorre transmissão da doença, e isto é devido ao precário saneamento básico, baixo ou nenhum controle de moluscos, junto à falta de tratamento da população infectada e orientação constante sobre a prevenção da doença. Desta forma, a esquistossomose é de grande importância para saúde pública no mundo, como pode ser visto a seguir:

Figura 1 – Locais não endêmicos, status de tratamento e status de transmissão para esquistossomose no mundo.



Fonte: Adaptado de https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html (2020).

No território brasileiro, local que pode ser visto na figura 1 como um dos principais países onde há a necessidade de tratamento preventivo para a população, a esquistossomose é causada somente pelo *S. mansoni* devido à presença do caramujo do gênero *Biomphalaria*, sendo *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* as principais espécies. Na Ásia, o *S. japonicum* tem como hospedeiro intermediário o caramujo do gênero *Oncomelania*, sendo que este parasito já foi erradicado no Japão, mas ainda está presente no sul da China, Filipinas e Indonésia (WHO, 2020). No Brasil, a esquistossomose está distribuída por 19 estados. Milhões de pessoas podem estar em áreas de risco, principalmente as que vivem na zona rural, pois estão próximas a coleções de águas que podem conter o caramujo (BRASIL, 2017; KATZ, 2018). Os estados das regiões Sudeste e Nordeste no território brasileiro são os mais afetados pela esquistossomose, sendo o índice de positividade para esquistossomose de 2,35% e 1,27% respectivamente (KATZ, 2018).

O parasito apresenta dimorfismo sexual e o macho tem aproximadamente 1 cm e a fêmea pode chegar a 2 cm. As espécies destes vermes se alimentam de células sanguíneas que são digeridas em um trato intestinal incompleto, e cujos restos são regurgitados na corrente sanguínea humana. O metabolismo anaeróbico é presente nestes parasitos, e os machos se movimentam contra a corrente sanguínea. A fêmea fica albergada no canal ginecóforo do macho, e isto possibilita a reprodução sexuada e a produção de ovos, os quais são eliminados pelas fezes do hospedeiro definitivo (COLLEY, 2014; WHO, 2020). Os ovos ao entrarem em contato com a água, em condições adequadas de luz e temperatura, faz com que o miracídio ecloda do ovo, e desta forma, a larva ciliada infecta o hospedeiro intermediário (caramujo). A larva miracídio se desenvolve passando para a forma de esporocisto em um período de quatro a seis semanas, e ao final do desenvolvimento, a forma liberada do caramujo infectado é a cercaria. Esta fica livre pelas águas e infectam o hospedeiro definitivo por meio da penetração ativa na pele ou na mucosa, momento que perdem suas caudas e sofrem uma modificação, transformando-se em esquistossômulo (COLLEY *et al.*, 2014).

Os esquistossômulos migram pela corrente sanguínea, e seguem em direção ao coração e pulmão, porém o amadurecimento do parasito ocorre no fígado, local que o parasito encontra condições satisfatórias para seu desenvolvimento, e atinge sua maturação sexual. A fêmea unida ao macho chega ao plexo venoso inferior do intestino grosso, e uma vez acasalados, inicia-se a postura de ovos (cerca de 300 ovos/dia para *S. mansoni* e aproximadamente 1000 ovos/dia para *S. japonicum*) em que parte dos ovos

fica retido nos tecidos, causando a reação granulomatosa, e outros alcançam a luz do intestino, e são lançados ao ambiente junto com as fezes, e podem chegar a locais em que há a presença do molusco (ANDRADE, 2008).

A passagem do ovo para outros tecidos do organismo humano é promovida pela reação inflamatória intensa devido ao parasito vivo em seu interior que elimina substâncias que estimulam o sistema imune, e também pela própria espícula lateral dos ovos de *S. mansoni* (característica não presente nos ovos de *S. japonicum*) que pode iniciar o processo quando em contato com um tecido (COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018). A destruição tecidual dos órgãos pelo processo inflamatório ocorre inicialmente no intestino, por ser o local onde há passagem destes ovos para luz intestinal; e o fígado, por ser um dos primeiros locais onde os ovos chegam ao serem carreados pela corrente sanguínea, porém, outros órgãos podem ser afetados (LAMBERTUCCI, 2010). Esta reação granulomatosa é observada com ativação inicial da resposta de linfócitos T auxiliares (*T helper*) Th1 em primeiro momento, com síntese de Interleucinas IL-1, IL-2, TNF- α e INF- γ , com recrutamento de macrófagos na tentativa de eliminar o verme, mas com início da postura de ovos, há uma diminuição da resposta Th1 e aumento da resposta do tipo Th2 com produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estimulação da produção de anticorpos (PEARCE, 1991; SILVA, 2008). Para *S. mansoni*, há um predomínio de eosinófilos, células mononucleares e baixa presença de neutrófilos, e para *S. japonicum* há um predomínio de células polimorfonucleares com neutrófilos ao redor dos granulomas (CHUAH *et al.*, 2014).

Em fase aguda, o granuloma é produtivo, pois ainda não há deposição de fibras colágenas ao redor dos ovos para isolamento do parasito, e com isto, a destruição tecidual é intensa. Desta forma, à medida que o parasito migra pelo organismo, somado à destruição de barreiras entre os tecidos pela reação granulomatosa, uma interação ocorre entre o microbioma humano e o parasito, principalmente a microbiota do intestino, sendo necessário o entendimento dessa associação (LAMBERTUCCI, 2010; SCHNEEBERGER *et al.* 2018).

2.2 MICROBIOMA

O microbioma é definido como a totalidade de microrganismos, seus elementos genéticos e as interações ambientais (TURNBAUGH *et al.*, 2007). As comunidades microbianas têm função em vários processos e em muitos habitats diversos, desde água,

solo, alimentos até o organismo humano. Os microbiomas são amplos e diversificados, e desempenham um papel na formação do sistema imunológico e metabólico para o hospedeiro. Eles são capazes de induzir respostas imunes protetoras, proporcionar nutrientes essenciais, além de auxiliar na digestão de componentes alimentares (BELKAID; HARRISON, 2017).

O Projeto do Microbioma Humano (PMH) é uma extensão do projeto do genoma humano e foi desenvolvido de forma a desvendar as interações complexas entre os microrganismos e o ser humano. O PMH engloba inúmeros projetos e vem de estudos realizados em vários países provenientes da América do Norte, Europa e Ásia (TURNBAUGH *et al.*, 2007, MCGUIRE *et al.*, 2008). Estudos do microbioma humano revelaram que mesmo indivíduos saudáveis diferem notavelmente em relação aos microrganismos em todos os locais do corpo, sejam na pele, trato respiratório, gastrointestinal ou geniturinário. Fatores ambientais, a alimentação, a genética do hospedeiro e a exposição microbiana são as possíveis razões que podem influenciar nesta diversidade (HUTTENHOWER *et al.*, 2014).

Devido à importância da microbioma, o PMH tem como objetivo criar um banco de dados de DNA microbiano para mostrar se indivíduos possuem ou não um microbioma comum. As questões levantadas nestes estudos estão relacionadas à estabilidade ou não do microbioma através de diferentes períodos na vida, nas semelhanças dentro das próprias famílias, comunidades e diferentes ambientes; e se as mudanças que podem ou não ser correlacionadas com alterações na homeostase do indivíduo (PALMER *et al.*, 2007).

A primeira fase do PHM foi realizada com adultos saudáveis entre as idades de 18 e 40 anos. Crianças e adultos mais velhos foram excluídos, pois poderiam apresentar variáveis que prejudicariam os estudos devido ao ambiente microbiano no início e com o avanço de idade (MCGUIRE *et al.*, 2008). As bactérias estudadas foram relacionadas ao desenvolvimento e regulação do sistema imunológico, e assim, foi possível observar que o microbioma está diretamente envolvido na resposta imune do hospedeiro com células de defesa que levam a uma resposta imune protetora, ou uma resposta que leva ao desenvolvimento de uma doença.

As bactérias habitam várias regiões do corpo humano em microbiomas altamente adaptados. A grande maioria das células associadas a humanos são bacterianas, e juntos alcançam sua maior biomassa no intestino. Essas comunidades bacterianas variam em composição em todo o corpo, com fatores físicos, químicos e imunes, de forma que o

organismo humano aceita a presença de um microbioma adaptado ao meio, cuja interação com o hospedeiro é geralmente benéfica (SMITH; MCCOY; MACPHERSON, 2007).

Os estudos com microbiomas fornecem novas formas de definir parâmetros entre o saudável e o não saudável. Ferramentas têm sido desenvolvidas e são necessárias para delinear, melhorar e monitorar estratégias para manipular intencionalmente os microrganismos, que tendem a melhorar o tratamento de doenças e trazer benefícios para a população, pois a composição muda ao longo do ciclo de vida, sendo necessário o entendimento para cada fase de desenvolvimento humano (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

O microbioma infantil apresenta-se mais diversificado e converge em uma estrutura semelhante ao adulto após 3 anos do nascimento. A colonização com microrganismos é importante para o intestino infantil, e sofre importantes estágios de mudança iniciando desde o nascimento (RUSSELL *et al.*, 2012). Em modelos animais, que não apresentam microbiota natural, foi demonstrado que a colonização microbiana induz o desenvolvimento anatômico do epitélio intestinal, aumento das taxas de proliferação de células epiteliais, além de induzir a maturação do tecido linfoide associado ao intestino (BOUSKRA *et al.*, 2008).

Em adultos, a diversidade microbiana está relacionada principalmente à genética (GOODRICH *et al.*, 2016), e desta forma, há dificuldade em se conseguir padrões semelhantes entre as populações. Com isto, o uso do modelo murino é um aliado, com a vantagem de que as condições ambientais podem ser controladas, além das semelhanças com o trato digestivo humano. Outras espécies podem ser usadas para o estudo do microbioma, tal como o peixe Zebrafish (*Danio rerio*), devido facilidade de reprodução, imunidade adaptativa e trato digestivo simples. A Drosófila (*Drosophila melanogaster*) também pode ser utilizada como modelo de estudo, devido a composição de microrganismos simples e cultiváveis sem nenhum sistema imunológico adaptativo; além do cefalópode da ordem Sepiolida conhecido como *Euprymna scolopes* (KOSTIC; HOWITT; GARRETT, 2013).

Associado aos modelos experimentais, a biologia molecular representa uma importante ferramenta para a identificação do microbioma. Os genes do rRNA 16S tornam as sequências mais amplamente utilizadas para a análise da diversidade microbiana, e essa análise é considerada padrão ouro para o estudo da comunidade microbiana (COLE *et al.*, 2008). Técnicas moleculares que utilizam desta abordagem permitem descrever a composição bacteriana de um ecossistema, evitando os estágios da cultura que demandam tempo e necessitam rigor em seu manuseio para que não haja

contaminação, assim como todas as etapas analíticas, desde a extração de material para análise (SUAU *et al.*, 1999; ROOKS; GARRET, 2016).

2.3 MICROBIOTA E A INTERAÇÃO COM ORGANISMO HOSPEDEIRO

A microbiota é definida como conjunto de microrganismos presentes em determinado local do organismo. É determinada pela sua diversidade e quantidade de espécies presentes, pela atividade que exerce para o organismo e pela relação com o hospedeiro, podendo haver sinergismo ou até mesmo competição destas espécies pelo habitat (ZOETENDAL *et al.*, 2004).

O uso indevido de antibióticos, a alteração da dieta e outras infecções, tais como helmintos competindo pelo mesmo habitat, faz com que estudos com as microbiotas sejam necessários para entendimento da interação patógeno-hospedeiro, pois os microrganismos podem levar a desequilíbrios que favorecem infecções oportunistas (ARRIETA *et al.*, 2014).

As espécies de microrganismos que colonizam o organismo de vertebrados são relacionadas a uma associação benéfica com o hospedeiro. A microbiota é conhecida por influenciar o desenvolvimento e o equilíbrio do sistema imunológico e tem sido estudado na prevenção de dano induzido por doenças oportunistas, assim como na influência de doenças autoimunes sistêmicas (RAKOFF-NAHOUM, MEDZHITOV, 2006). A resposta imune irá atuar em várias partes do organismo, e age como barreira e manter a homeostase microbiana. As relações mutualistas capazes de influenciar as respostas fisiológicas, mesmo através da modulação do sistema imunológico do hospedeiro, são feitas através de sinais transmitidos pelas bactérias, que podem influenciar a resposta do sistema imune tanto inato quanto do adaptativo, resultando em respostas sistêmicas distantes do local de colonização (IVANOV *et al.*, 2009).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro na resistência à infecção por agentes patogênicos estão relacionados a competição das bactérias pelo local de fixação e obtenção de nutrientes, e produção de compostos antimicrobianos e metabólitos que podem ser desfavoráveis ao crescimento de patógenos (MAIA; OGAKI; FURLANETO, 2015). Animais livres de microrganismos, e aqueles com deficiência de comensais devido ao uso de antibióticos mostram que uma microbiota exógena é necessária para adquirir resistência a colonizações indesejadas, principalmente para microrganismos patogênicos. Stoddart e Wilcox (2002) mostraram um fenômeno de diarreia causada pela proliferação

de *Clostridium difficile* no intestino de seres humanos após o uso de antibióticos de amplo espectro com destruição da microbiota. Em estudos por Filho-Lima *et al.* (2000) e Hudault *et al.* (2001) mostraram o papel benéfico da microbiota comensal na proteção de infecção contra patógenos em camundongos sem microrganismos, concluindo que aqueles que apresentavam uma microbiota já estabelecida apresentavam um sistema de defesa mais competente.

Ainda não muito bem elucidada, a manipulação da composição da microbiota pode ter consequências sobre a capacidade do hospedeiro para montar respostas protetoras contra infecções oportunistas (FOULONGNE *et al.*, 2012; KIM; JAZWINSKI, 2018). A variedade de microrganismos comensais que colonizam os mamíferos é grande entre os sítios anatômicos, o que dificulta este entendimento, e aproximadamente 1000 espécies diferentes de microrganismos podem estar presentes, incluindo a região oral, a pele, os tratos geniturinário e o gastrointestinal, sendo este com uma microbiota diversificada em toda sua extensão (SONNENBURG; ANGENENT; GORDON, 2004; BELKAID; HARRISON, 2017).

2.4 MICROBIOTA INTESTINAL BACTERIANA

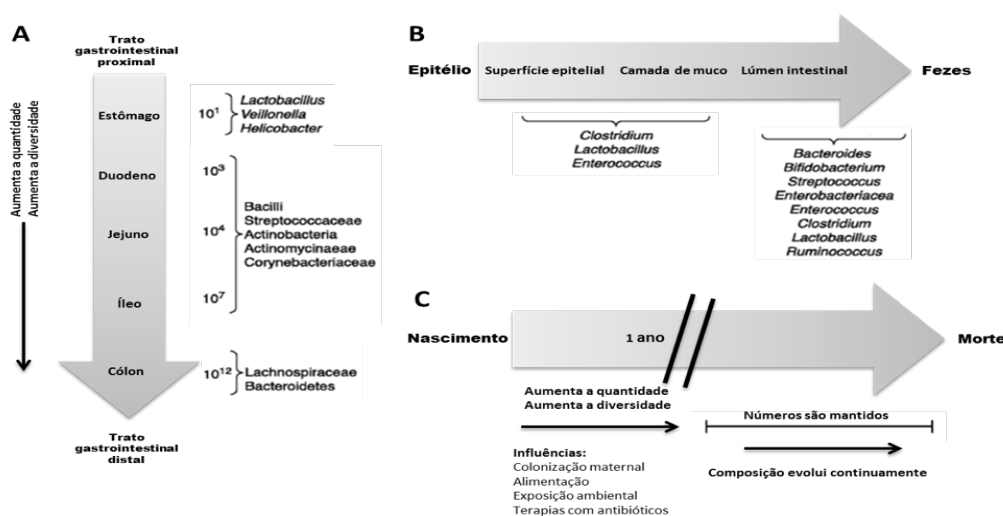
O trato intestinal apresenta uma ação conjunta das células epiteliais, liberação de muco, e Imunoglobulina A (IgA) que fornecem uma defesa primária para o organismo. Esta proteção é necessária para manter a homeostase, uma vez que a microbiota do hospedeiro tenta minimizar o contato com microrganismos invasores, com redução de inflamação do tecido e tentativa de evitar uma possível translocação de microrganismos para outros órgãos (MCGUCKIN, 2011; ADAK; KHAN, 2019).

O intestino de um mamífero apresenta uma comunidade de microrganismos que vão desde bactérias, arqueias, fungos vírus e protozoários que estabelecem relações simbióticas com seus hospedeiros, trazendo contribuições essenciais para o metabolismo humano, enquanto habitam um ambiente protegido com condições necessárias para proliferação, junto à disponibilidade de nutrientes. O desafio em se estudar a microbiota neste órgão é devido sua vasta extensão, uma vez que as vilosidades aumentam substancialmente a superfície de contato, e possibilitam que microrganismos possam se alojar e se reproduzir nestes locais. Junto a isto, o sistema imune do mamífero deve lidar continuamente com sua própria microbiota diversificada, uma enorme carga microbiana

externa e frequentes patógenos ingeridos em alimentos e água (MATHERS, BOERMA, MA FAT, 2009; ILLIANO; BRAMBILLA; PAROLINI, 2020).

Os estudos de microbiota intestinal têm se intensificado nos últimos anos, e cada vez mais, técnicas precisas e robustas são requeridas para análise. A amostra de fezes é recorrente nos estudos, mas pesquisadores também alertam na necessidade de análise de outros locais do organismo (TUDDENHAM; SEARS, 2015). Uma vez que microbiota é diferente de acordo com o a região do trato gastrointestinal, epitélio e idade do indivíduo, na Figura 2 a seguir são mostradas estas variações:

Figura 2 - Variação da microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de SEKIROV (2010).

Legenda: A Composição da microbiota intestinal do trato gastrointestinal proximal ao distal.

B Composição da microbiota intestinal do epitélio às fezes

C Composição da microbiota intestinal do nascimento à morte.

De acordo com a figura 2, os gêneros dominantes na microbiota de um ser humano adulto são *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, e vários cocos Gram-positivos, além de *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae* (GUARNER; MALAGELADA 2003; ANDERSSON *et al.*, 2008; SEKIROV *et al.*, 2010; ADAK; KHAN, 2019). Assim, as variações na composição da microbiota intestinal entre indivíduos não comprometem uma função adequada, e sim, adaptações são feitas para cada um, de acordo com características multifatoriais que irão variar ao longo do trato gastrointestinal (GRICE, SEGRE, 2012).

Iniciando pelo esôfago, há um predomínio de espécies de *Streptococcus* e a alteração dos microrganismos neste local está associada a focos inflamatórios e displasia.

Prevotella, *Actinomyces*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus* também foram detectados no esôfago, sendo que estes gêneros bacterianos podem fornecer funções complementares relacionadas à saúde. Entre alguns grupos bacterianos, como os estreptococos, podem incluir cepas que estendem seus habitats da cavidade oral para a mucosa esofágica e no estômago na ausência de infecção por *Helicobacter pylori* (YANG *et al.*, 2009; SEKIROV *et al.*, 2010). Os tipos de microrganismos no estômago são limitados. Devido ao pH ácido, somente bactérias resistentes sobrevivem a este ambiente. *H. pylori* é um exemplo, e sua presença afeta a composição da microbiota presente, pois esta bactéria pode ser comensal ou patogênica, e pode causar úlcera péptica e gastrite. Aproximadamente 10 gêneros são mais predominantes no estômago humano, e estes incluem *Rothia*, *Streptococcus*, *Veillonella* e *Prevotella* (BIK *et al.*, 2006; ANDERSSON *et al.*, 2008; SEKIROV *et al.*, 2010).

O intestino delgado humano tem importância na absorção dos nutrientes a partir da digestão de alimentos. Após passagem pelo estômago, comunidades bacterianas aumentam em diversidade e complexidade da direção proximal-distal, do duodeno ao jejuno e íleo. O *Streptococcus* é um gênero dominante no duodeno e no jejuno (ANDERSSON *et al.*, 2008); e a microbiota intestinal restante do adulto é dominada por dois filos, Firmicutes e Bacteroidetes, que classificam cerca de 90% de todas as espécies bacterianas no intestino, seguido por Actinobacteria e Verrucomicrobia. O Filo Firmicutes compreende uma série de gêneros de grande relevância na área de saúde e na indústria, e em sua maioria são gram positivos. Entre os gêneros de interesse clínico em humanos e animais pode-se citar *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weisella* (LANZA *et al.* 2015). Já Bacteroidetes são bastonetes gram-negativos anaeróbicos, não formadores de esporos resistentes à bile. Bacteroides, Flavobacteria e Sphingobacterias compeendem os principais gêneros deste filo (WEXLER, 2007). Se houver um desbalanço destas comunidades, quebra-se a homeostase, e torna o indivíduo mais susceptível à doenças (WILLING; RUSSELL; FINLAY, 2011, HOOPER, LITTMAN; MACPHERSON, 2012; HOLLISTER; GAO; VERSALOVIC, 2014; ADAK; KHAN, 2019).

A interação entre o trato gastrointestinal e a microbiota residente é bem equilibrada em indivíduos saudáveis, mas em desequilíbrio pode levar a doenças intestinais e em outros locais do organismo. Em certas populações, observa-se que há respostas menores para certas vacinas orais em crianças que vivem em países em

desenvolvimento quando comparados a países de primeiro mundo, mas deve ser destacado que isto depende de multifatores que levam a esta situação, tais como a desnutrição. Em estudos em Malawi (África), a vacina contra rotavírus teve efeito em 49% das crianças, porém, é observado efetividade em 95% da população de crianças ocidentais (KAU *et al.*, 2011). Em estudos em murinos, observou-se que ratos tratados com antibióticos apresentaram efeito reduzido com o uso de Ciclofosfamida, um antitumoral, além de respostas imunológicas menos eficazes contra os tumores, mostrando mais uma vez a importância da microbiota (VIAUD *et al.*, 2013).

Além do sistema imune, o aproveitamento de nutrientes é parte do papel da microbiota residente no intestino para o hospedeiro, tais como absorção de cálcio, ferro e magnésio, vitamina K, vitamina B12, biotina e ácido fólico (RABIZADEH; SEARS, 2008; URSELL *et al.*, 2014). Em relação à composição da alimentação, cada tipo de carboidrato pode afetar a composição das bactérias na microbiota intestinal, e a composição pode afetar a metabolização destes açúcares. Por outro lado, a composição da comunidade bacteriana pode afetar sua capacidade de metabolizar carboidratos alimentares. O amido vegetal, que é rico em amilopectina ou amilose e um componente comum da dieta atualmente, são metabolizados por bactérias *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*, e o consumo relativo de vegetais, frutas e carne já foi relatado como um fator importante na condução da composição da microbiota gastrointestinal e da saúde em, e desta forma, as dietas ricas em carboidratos que predominam no continente africano favorecem Bacteroidetes, os quais são capazes de degradar xilano e celulose para utilizar energia a partir de dietas à base de vegetais (WANG *et al.*, 1999; ADAK; KHAN, 2019).

As dietas ricas em gordura e proteínas animais que predominam nos países ocidentais favorecem os Firmicutes, que estão associados ao metabolismo das proteínas e dos açúcares, e são exemplos de como há uma adaptação de acordo com o ambiente que o indivíduo vive (GLENDINNING *et al.*, 2014). Para as proteínas, pode haver conversão destas em aminoácidos, assim como compostos para imunoproteção e sinalização. Proteinases bacterianas e peptidases agem em conjunto e conseguem quebrar as moléculas maiores em fragmentos para melhor absorção e aproveitamento. Como exemplo, a L-histidina pode ser convertida em amina e histamina, por histidina descarboxilases, que são produzidos por bactérias intestinais. A histamina pode ser transportada para o lúmen intestinal pela histidina, e esta pode suprimir a produção de

citocinas inflamatórias através da sinalização por receptores presentes nas células epiteliais intestinais (THOMAS *et al.*, 2012; VALDES *et al.* 2018).

2.5 MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS PARASITÁRIAS

A microbiota intestinal é importante em muitos processos, porém, outros microrganismos podem interferir na regulação natural do organismo. Parasitos podem colonizar o mesmo ambiente, e uma vez em conjunto com as bactérias, podem trazer desequilíbrios. Muitos mecanismos que ligam a microbiota intestinal à saúde humana ainda requerem muitos estudos. Os protozoários e helmintos tem um efeito prejudicial sobre o organismo hospedeiro, e as doenças decorrentes destes merecem atenção em todo o mundo, pois resultam em milhões de mortes todos os anos (WHO, 2017).

As doenças parasitárias são assintomáticas ou oligoassintomáticas, em sua grande maioria. Em área endêmicas, com indivíduos infectados eliminando ovos e larvas, pode haver contaminação do solo e alimentos, e junto a falta de saneamento básico, a proliferação destes parasitos são mais frequentes (BRASIL, 2016). Alterações na microbiota pela presença de protozoários são frequentes e diferem para cada parasito. A diarreia é uma das principais causas de morte em crianças menores de 5 anos, e está associada com cerca de meio milhão de mortes por ano. Apesar de ser causada por muitos agentes patogênicos, a diarreia é em grande parte causada por um protozoário (KOTLOFF *et al.*, 2013). Estima-se mais de 300 milhões de casos de com *Entamoeba* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. resultando em mortes e problemas sérios de saúde (WHO, 2017).

Determinadas bactérias podem aumentar a virulência em amebas, um fenômeno relacionado a componentes de superfície amebiana com atividade de lectina e componentes de galactose, N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina, e receptores para manose na superfície do parasito que reconhece este açúcar na superfície de bactérias. A interação é um dos fatores determinantes de maior virulência, pois determinadas amebas se alimentam de outras bactérias presentes no intestino (SCHMITZ-ESSER *et al.*, 2008; KEBBI-BEGHDADI; GREUB, 2014). Verma *et al.* (2012), trabalhando com *Entamoeba histolytica* e bactérias do trato gastrointestinal, mostraram que a *Lactobacillus casei* e *Enterococcus faecium* reduziram a sobrevivência parasitária em 80% quando usadas em conjunto.

Em estudo feito por Pérez *et al.* (2001) mostraram os efeitos *in vitro* de seis cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus johnsonii* La1 sobre a sobrevivência de *Giardia duodenalis*. *L. johnsonii* La1 inibiu significativamente a proliferação de trofozoítos de *Giardia*. Estes trabalhos mostram que bactérias podem ser auxiliares no tratamento de parasitoses, pois poucos são os fármacos que estão disponíveis no mercado, e devido a resistência ao uso constante dos únicos medicamentos disponíveis, novos fármacos com novas estratégias de tratamentos podem ser a solução para as doenças parasitárias.

Andersen *et al.* (2015) demonstraram que indivíduos que apresentavam *Prevotella* e *Ruminococcus* eram mais propensos a ser portadores de Blastocistos. Além disto, também já foi observado que a microbiota de fezes de pacientes colonizados por Blastocisto apresentava maior diversidade, além de maior presença Ruminococcaceae, e Prevotellaceae, enquanto pacientes sem o parasito apresentavam mais a família Enterobacteriaceae.

Leishmania depende de um vetor intermediário para sua transmissão, o flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*. O desenvolvimento de *Leishmania* para promastigotas metacíclicas infecciosas no intestino do inseto é um processo denominado metaciclogênese, e é um pré-requisito essencial para a transmissão. Desta forma, não necessariamente o hospedeiro definitivo deve apresentar uma microbiota favorável, mas sim, seu hospedeiro intermediário deve ajudar o parasito no seu desenvolvimento para perpetuação da espécie. Em estudos demonstrados por Kelly *et al.* (2017), com o uso de antibióticos para eliminação da microbiota do intestino médio dos vetores, tornou os flebotomíneos incapazes de suportar o crescimento do parasita e a metaciclogênese.

Plasmodium causa mais de 200 milhões de infecções e mais de 1 milhão de mortes anualmente (WHO, 2017). Em estudos com camundongos, foi demonstrado que *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são bactérias que podem ter um papel protetor contra o parasito, modulando a carga parasitária e atenuando a gravidade da doença. Também é possível que esses gêneros bacterianos se correlacionem com a diminuição da parasitemia e também na diminuição da abundância de outros gêneros bacterianos que podem auxiliar a presença elevada do parasito (VILLARINO *et al.*, 2016).

Já os principais helmintos que infectam seres humanos são as espécies: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *S. mansoni* e *Taenia solium*, porém vários outros sofrem influencia da microbiota intestinal. De acordo com a estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 840,2

milhões de crianças em todo o mundo necessitam de tratamento preventivo para helmintíases transmitidas pelo solo. Em 2017, mais de 500 milhões de crianças que necessitaram de tratamento receberam os medicamentos. Em 2015, 27 países atingiram o objetivo da Assembleia Mundial da Saúde de tratar pelo menos 75% das crianças em idade escolar com parasitose (WHO, 2017).

A interação entre parasitos e bactérias intestinais é atualmente um assunto de grande interesse em termos de saúde do hospedeiro, pois intervenções terapêuticas podem ser feitas a partir da manipulação da estrutura da microbiota intestinal devido às interações imunológicas, pois ambos modulam o sistema imune do hospedeiro, reduzindo as respostas inflamatórias (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012).

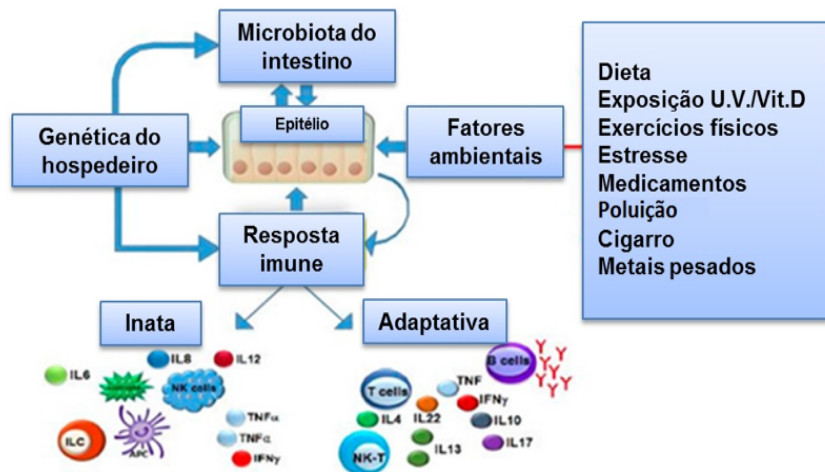
Taylor *et al.* (1999) discutem sobre o gênero *Wolbachia*, endobactérias simbióticas que infectam a maioria dos nematoides filáris, tais como a *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Onchocerca volvulus*. A *Wolbachia* é necessária para a reprodução e a sobrevivência de filárias e destacaram o uso de terapia antibiótica como a Tetraciclina/Doxiciclina como método de tratamento para infecções causadas por esses organismos. Em modelos animais, Houlden *et al.* (2015), trabalhando com o helminto intestinal *Trichuris muris*, demonstraram que a infecção de camundongos com este parasita alterou significativamente a microbiota intestinal, reduzindo a diversidade e a abundância de *Prevotellae* e *Parabacteroidetes*. Outro nematoide, *Heligmosomoides polygyrus*, altera a microbiota intestinal de camundongos saudáveis e apresenta as famílias Lactobacillaceae e Enterobacteriaceae aumentadas após a infecção (WALK *et al.*, 2010). Porcos com número elevado de parasitos foram associados com maior presença de *Campylobacter* em seu intestino (WU *et al.*, 2012).

Além de alterações na microbiota, as infecções por helmintos também podem modificar o metabolismo do hospedeiro, com implicações para a modulação imune. Houlden, *et al.* (2015) mostraram que a infecção experimental de *Trichuris muris* em camundongos reduziu um grande número de produtos metabólicos quando comparados camundongos infectados com não infectados, e alterações na síntese de vitamina D, muitos ácidos graxos, glicerofosfolípidos, carboidratos e aminoácidos, o que mostra o efeito negativo da presença destes parasitos.

As respostas direcionadas às bactérias e helmintos são diferentes, com mecanismos efetores de Th1, Th17 para bactérias e Th2 para helmintos. Algumas bactérias são capazes de suprimir a resposta imune com indução de células T reguladoras, tais como o *Bacteroides fragilis* e o *Clostridium* spp. (ROUND; MAZMANIAN, 2010;

ATARASHI *et al.*, 2011). Com a quebra da homeostase, pode haver mudanças funcionais nas populações de bactérias, sendo que a genética do hospedeiro está diretamente relacionada a resposta imune e a microbiota do intestino, assim como os fatores ambientais têm grande influência, conforme descritos na Figura 3:

Figura 3 - O epitélio intestinal, microbiota intestinal, fatores ambientais e resposta imune.



Fonte: Adaptado de AHMED (2016).

2.6 BACTÉRIAS E ESQUISTOSSOMOSE

Com melhorias da saúde pública, percebe-se que hoje há um controle maior das infecções quando se compara ao ano de 1907, quando a esquistossomose foi identificada. Ao longo do séculos XX e XXI, doenças vem sendo estudadas e melhor compreendidas, assim como medicamentos vem sendo descobertos, e dentre eles a Penicilina, a qual foi descoberta em 1928. O que se percebe hoje é que entendê-las de maneira isolada tem sua importância, mas elucidar sua interação com o hospedeiro torna-se fundamental, uma vez que tanto bactérias quanto helmintos interagem entre si e diretamente com as células humanas (KATZ, ALMEIDA, 2003; MOHR, 2016).

A associação da esquistossomose com bactérias está relacionado com a carga bacteriana, virulência, capacidade invasiva, sorotipo, até fatores intrínsecos relacionados à resistência e à resposta imune do hospedeiro (MUNIZ-JUNQUEIRA *et al.*, 2009). Para os helmintos, no decorrer da infecção a resposta imunológica costuma ser Th2, e há relatos que a infecção com parasitos pode prejudicar a resposta imune contra bactérias e gerar fatores agravantes, tais como abscessos com *S. aureus* (LAMBERTUCCI *et al.*,

2001). Parasitos intestinais podem afetar o desenvolvimento cognitivo e junto a isto, em regiões endêmicas, pode haver a interação entre parasitos e bactérias, havendo a necessidade de entender esta associação (MAZIGO *et al.*, 2010).

O sistema imune dos hospedeiros é fundamental para eliminação dos invasores, e é através do processo fagocitário que o hospedeiro consegue se defender dos patógenos (DALE; BOXER; LILES, 2008). Em fases crônicas, macrófagos tem dificuldades em fagocitar, e assim, há déficit acentuado da capacidade de destruição de microrganismos, que resulta em ativação contínua do sistema imune (MUNIZ-JUNQUEIRA *et al.*, 1996). As funções fagocitárias e microbidas dos macrófagos são fundamentais para a defesa do organismo. Os patógenos que conseguem escapar a esses mecanismos microbidas têm certa vantagem, podendo sobreviver, multiplicar-se e levar a alterações crônicas, o que exige um tratamento complexo, e que pode acarretar maiores despesas para os serviços de saúde pública.

A infecção por espécies de *Schistosoma* tem a capacidade de suprimir a resposta imune. Sabin *et al.* (1996) demonstraram a capacidade da esquistossomose em modular a resposta imune em indivíduos avaliando junto à vacinação para tétano, o que mostrou uma resposta mista de Th1 e Th2. Outros estudos demonstram a influência do parasito com vírus, havendo produção de células T CD4+ e T CD8+, e assim, estas interações em hospedeiros coinfectados podem alterar a transmissão, a avaliação clínica e o controle de múltiplas doenças infecciosas (CHIODINI, 2001; PEDERSEN; FENTON, 2007). Em outro trabalho, já foi observado a capacidade de fungos, como o *Paracoccidioides brasiliensis*, em alterar a imunomodulação de granulomas esquistossomoticos por meio citocinas que auxiliam no processo inflamatório (ARAÚJO *et al.*, 2019)

A infecção por *S. mansoni* e *S. japonicum* acarreta vários processos patológicos, dentre eles, lesões no epitélio intestinal, o que, associado a resposta imunomoduladora pode levar a diminuição da barreira protetora contra bactérias. Desta forma, essas condições favorecem a translocação bacteriana da luz intestinal de animais e humanos para a circulação sanguínea. Alguns trabalhos relatam casos de septicemia bacteriana em infecções com *S. mansoni* (LAMBERTUCCI *et al.*, 1998; BARNHILL *et al.*, 2011; HSIAO *et al.*, 2016; COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018). Em um estudo por KAY *et al.* (2015), com crianças zimbabuenses infectados por *S. haematobium*, foi encontrado o gênero *Prevotella* mais frequente em amostras fecais. O uso de PZQ não reverteu a composição da microbiota, sugerindo que a exposição à helmintos na infância pode ter efeitos a longo prazo sobre a estrutura da comunidade de microrganismos. Em

estudos por Holzscheiter *et al.* (2014) demonstraram que bactérias comensais do hospedeiro, durante a infecção por *S. mansoni*, desempenharam um papel importante no resultado da formação de granulomas intestinais e respostas imunes específicas da esquistossomose, podendo influenciar na excreção do ovo.

Em um trabalho com camundongos, a translocação bacteriana foi observada em sangue periférico, e a presença de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi relatada (LIMA *et al.*, 2015). Schneeberger *et al.* (2018), trabalhando com crianças em área de risco para esquistossomose, analisou a associação de *S. mansoni* junto a microbiota e se o tratamento influencia na mudança de microbiota, mostrando que os filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Firmicutes estavam presentes na microbiota quando infectados com esquistossomose.

Uma vez na circulação, estas bactérias chegam até os vermes adultos de *S. mansoni* e *S. japonicum*, presentes nas veias mesentéricas, e se associam a eles, e nesta associação, as bactérias se fixam a moléculas presentes no tegumento do parasito e se instalam no interior de seu cólon (MUNIZ-JUNQUEIRA; TOSTA; PRATA, 2009). A associação das bactérias possibilita infecções bacterianas mais prolongadas, e o desenvolvimento de resistência a antibióticos e a ineficácia de tratamento de ambas as infecções, uma vez que as bactérias adquirem uma proteção extra por se associarem a outro organismo (BARNHILL *et al.*, 2011; COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018).

2.7 DESAFIOS PARA O TRATAMENTO

Uma das maiores dificuldades para tratamento e eliminação de bactérias é o que ocorre principalmente em hospitais, principal local onde bactérias podem apresentar resistência pelo uso contínuo de antibióticos que podem selecionar microrganismos que não respondem ao tratamento. Muitas bactérias podem persistir a infecção dentro de seus hospedeiros e isso pode estar relacionado a imunossupressão do hospedeiro, evasão pelo patógeno ao sistema imune e somado ao uso indevido de medicamentos, sem a correta orientação e muitos medicamentos usados indiscriminadamente por falta de uma correta identificação do patógeno, leva à resistência e seleção de microrganismos (WHO, 2012; FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017).

Cepas resistentes são selecionadas quando o medicamento não é utilizado de acordo com sua função e posologia correta, em que sua dose e tempo de uso são fundamentais para sucesso na terapêutica. Desta forma, a Organização Mundial da Saúde

(2016a) propôs cinco objetivos a serem alcançados, que seriam: conscientizar a população com educação, comunicação efetiva e treinamento de profissionais; fortalecer os conhecimentos na área; reduzir a incidência de infecções; desenvolver e otimizar o financiamento para novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e outras intervenções; e aperfeiçoar o uso de antimicrobianos em humanos e outros animais.

Com o aumento da resistência pelos microrganismos, muitas doenças têm seu tratamento comprometido além de maiores complicações que pode levar ao óbito, e junto a isto, maiores gastos da saúde pública para tentar suprir os problemas que vão desde o diagnóstico à cura definitiva (WHO, 2012; WILLIANS *et al.*, 2016).

Os agentes etiológicos mais descritos e considerados como bactérias resistentes são *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) (DHILLON; CLARK, 2009; WHO, 2016a). Esta diversidade, que leva a características próprias para identificação dos microrganismos, faz com que o tratamento seja atribuído conforme protocolo já estabelecido, e não com uma identificação minuciosa, e isto tem sido considerado como fator no aumento dos índices de mortalidade, principalmente em pacientes internados em hospitais (KADOSAKI; SOUZA; BORGES, 2012).

Já para esquistossomose, poucos são os medicamentos disponíveis para tratamento. Uma vez instalada, o tratamento exige acompanhamento e controle sanitário para ter a cura efetiva. Disponível no mercado, o PZQ teve sua descoberta na década de 70 (GROLL, 1984; SOUZA, 2008; VALE *et al.*, 2017). O medicamento provém da molécula isoquinoleínico-pirazínico que apresenta boa ação anti-helmíntica. Sua ação ocorre logo após seu uso, atuando no tegumento do parasito, nos canais de cálcio nas células do tegumento do helminto, aumentando a concentração desse íon, provocando a destruição tegumentar (PORDEUS *et al.*, 2008; TAVARES, 2009). A terapêutica no uso do PZQ para adultos é em dose única de 50 mg/kg via oral (OLLIARO *et al.*, 2011; BRASIL, 2017). Há a opção por Oxaminiquine, porém vem cada vez menos utilizado devido aos efeitos colaterais indesejados (VITORINO *et al.*, 2012; ARULEBA *et al.*, 2018).

Com o passar dos anos, já é relatado as dificuldades encontradas com uso do PZQ e sua redução de eficácia pelo uso contínuo e resistência do *S. mansoni*, o que mostra a importância da constante atualização e procura de novos fármacos para controle da doença (VALE *et al.*, 2017). Contudo, novas estratégias ainda devem ser desenvolvidas, pois a resistência ao PZQ compromete a eficácia do tratamento, assim como outras

infecções, que podem dificultar ainda mais a cura, uma vez que pode haver resistência ao uso de medicamentos (COUTO *et al.*, 2011).

Alguns fármacos para o tratamento da esquistossomose foram descontinuados, tais como Niridazol, o qual se liga covalentemente aos ácidos nucleicos e grupos sulfidrilas, além de suprimir a hipersensibilidade imunológica dos antígenos de ovos (THÉTIOT-LAURENT *et al.*, 2013); Metrifonato, com sua ação em inibição da enzima acetilcolinesterase presente no tegumento do parasito, e com o acúmulo de acetilcolina, há uma paralisia da musculatura do verme, que resulta em seu desprendimento da parede dos vasos sanguíneos (THÉTIOT-LAURENT *et al.*, 2013; Aruleba *et al.*, 2018); e Oltripaz, que com o esgotamento de suas defesas antioxidantes, o parasito pode ficar mais vulnerável a danos pelo estresse oxidativo induzido pelo hospedeiro (NARE; SMITH; PRICHARD, 1992). Porém, quando estes medicamentos são comparados ao PZQ apresentam vários efeitos adversos prejudiciais que acabaram não sendo mais utilizados na terapêutica de tratamento para esquistossomose.

Desta forma, estes fármacos necessitam de novos estudos ou aprimoramento das suas moléculas, mas não são mais utilizados devido aos problemas serem maiores que a efetividade contra o parasito. O controle e uso racional de antimicrobianos, que inclui tanto o uso para parasitos quanto para bactérias, tem o objetivo de um melhor tratamento, profilaxia e na minimização dos efeitos adversos, com segurança no tratamento proposto para o paciente. Uma vez que somente o PZQ tem condições favoráveis para o tratamento em massa da população, a vigilância para o uso correto e seguro é importante, pois o tratamento em larga escala quando mal aplicado pode acarretar prejuízos para a saúde pública (MOTA *et al.*, 2010; WANG, WANG, LIANG, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a composição da microbiota hepática e intestinal durante a fase aguda da esquistossomose em camundongos BALB/c e a possível interação das espécies *S. mansoni* e *S. japonicum* com bactérias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a microbiota intestinal de camundongos BALB/c infectados e não infectados com as espécies *S. mansoni* e *S. japonicum*;

Isolar e identificar as bactérias que compõe a microbiota do fígado de camundongos BALB/c infectados com as espécies *S. mansoni* e *S. japonicum*;

Identificar o perfil de sensibilidade à diferentes antibióticos das bactérias isoladas dos fígados.

Confirmar através das análises histológicas as alterações patológicas que possam proporcionar a translocação de bactérias do lúmen intestinal;

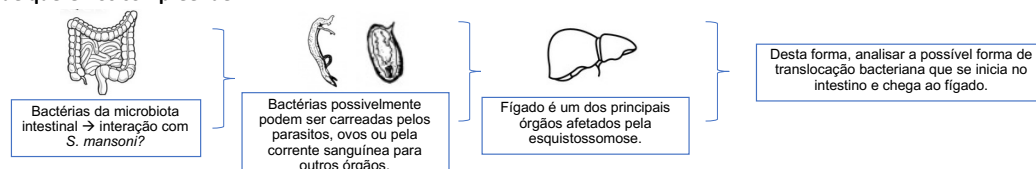
Comprovar a interação direta entre bactérias isoladas do fígado de camundongos infectados com vermes adultos e ovos de *S. mansoni*, através de testes de adesão de bactérias ao tegumento destes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

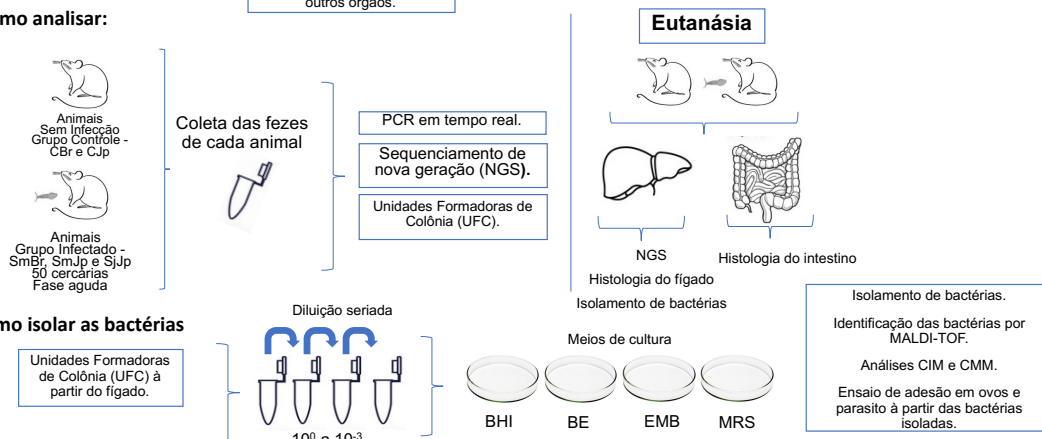
A Figura 4 mostra a descrição do delineamento experimental deste trabalho:

Figura 4 – Fluxograma do delineamento experimental.

1) O que queremos compreender:



2) Como analisar:



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

4.1 ANIMAIS

Camundongos fêmeas BALB/c com aproximadamente 2 meses de idade, pesando aproximadamente 25g, foram adquiridos dos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz e do biotério da Dokkyo Medical University (DMU). Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL - MG) antes da realização de qualquer experimentação animal, recebendo o número de registro no Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG - 04/2018 e no comitê de Ética da DMU - Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals in Dokkyo Medical University – Registration number: 19 - 991.

4.1.2 Infecções por espécies de *Schistosoma*

Para isolamento das cercárias, os caramujos infectados foram expostos à luz por 2 horas e o líquido contendo as cercárias foi transferido para um único béquer, originando um “pool” de cercárias provenientes de vários caramujos. A infecção dos camundongos foi realizada através da inoculação de 50 cercárias de *Schistosoma mansoni* (Cepa LE - Luiz Evangelista) por via subcutânea provenientes de infecções rotineiras realizadas pelo Moluscário do CPqRR/FIOCRUZ. De cada béquer foi retirado uma alíquota de aproximadamente 0,3 mL para serem contadas com auxílio de uma lupa. As alíquotas foram ajustadas a fim de se obter uma concentração equivalente a 50 ± 10 cercárias, em um volume de 0,3 mL. Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968). A infecção foi realizada utilizando uma seringa de aço-inox com volume ajustável. Após a infecção, os animais foram transportados para laboratório de experimentação animal do Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG e o biotério do Departamento de Medicina Tropical e Parasitologia da DMU. Nestes laboratórios, estes animais foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas e alimentados com ração comercial e água, durante 50 dias (fase aguda para esquistossomose).

A infecção por também foi realizada no laboratório Tropical Medicine & Parasitology da Dokkyo Medical University (Cepa Puerto Rico para *S. mansoni* e Cepa Yamanashi para *S. japonicum*) procedendo-se de modo como descrito anteriormente e mantidos no biotério da referida instituição, sendo estes animais mantidos em gaiolas devidamente identificadas e alimentados com ração comercial e água, durante 50 dias (fase aguda para esquistossomose).

4.2 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *S. mansoni*, *S. japonicum* E NÃO INFECTADOS

Na UNIFAL-MG, seis camundongos não infectados - controle (CBr) e seis camundongos com 50 dias de infecção por *S. mansoni* (SmBr), com mesma idade, foram manipulados individualmente de forma a favorecer a defecação. As fezes foram coletadas em tubos de 1,5 ml estéreis para determinação do peso. Após, as fezes foram transferidas para um tubo de 1,5 ml estéril contendo 1 ml de solução salina tamponada estéril (PBS). O material foi submetido à agitação em vórtex até a completa dissolução do material

fecal. O mesmo procedimento foi realizado com oito camundongos infectados com *S. mansoni* (SmJp), oito com *S. japonicum* (SjJp), e quatro animais não infectados (CJp) na DMU.

Após este procedimento, a eutanásia dos camundongos foi feita por meio de overdose anestésica com Ketamina e Xilazina (60-90 +5-10 mg/Kg) (GARCIA, 2016), e a coleta do fígado foi feita para isolamento de bactérias presentes neste órgão de maneira estéril em fluxo laminar. Parte do material, após pesado, destinou-se para metagenômica, parte foi para análises de crescimento bacteriano em placas, e outra parte para cortes histológicos. Além disto, foram coletados os intestinos dos animais infectados e não infectados para realização das análises histológicas.

4.2.1 PCR em Tempo Real

O material fecal foi analisado pela PCR em tempo real, sendo utilizada para Bactérias Totais e para o filo Bacteroidetes. Para os grupos CBr e SmBr, a análise foi feita com amostras em triplicata, e foram utilizados um volume final de 10 µL contendo os seguintes reagentes: SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), DNA como modelo de PCR e 20 µM de primers (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada com Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), usando as seguintes condições: 60°C por 10 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95 ° C por 15s e 60 ° C por 1 min, e estágio de dissociação de 95 ° C por 15 s, 60°C por 1 min, 95 ° C por 15 s e 60 ° C for 15 s (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001):

Tabela 1: Primers para PCR em tempo real

Primer	Forward	Reverse
Bactérias totais	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'
Bacteroidetes	5'-GTTTAATTCGATGATACGCGAG-3'	5'-TTAASCCGACACCTCACGG-3'
Firmicutes	5'-GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3'	5'-AGCTGACGACAACCATGCAC-3'
Proteobacteria	5'-GCTAACGCATTAAGTRYCCCG-3'	5'-GCCATGCRGCACCTGTCT-3'

4.2.2 Metagenômica

Metade do volume da suspensão da amostra de fezes dos grupos citados anteriormente foi centrifugado a 9800 g por 20 minutos a temperatura ambiente. O

sobrenadante obtido foi descartado e os sedimentos congelados a -80°C para a extração de DNA.

O DNA foi extraído do sedimento obtido através do kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme as instruções do fabricante. Para o sequenciamento de nova geração, fez-se a extração de DNA de fezes e fígado para posterior leitura em Qubitds DNA Broad range dos grupos experimentais. Para análise das fezes, foi feito o pool de 3 amostras de cada grupo experimental (CBr, SmBr, CJp, SmJp e SjJp) e desta forma, as amostras foram diluídas a $100\text{ ng}/\mu\text{L}$. Já o fígado, as amostras do grupos SmBr, SmJp e SjJp foram analisadas separadamente.

O estudo de metagenômica para identificação das bactérias presentes na microbiota intestinal de camundongos infectados e controle além das bactérias presentes no fígado foi feito através da parceria e protocolo estabelecido pela Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) e EUROFINS (Tóquio, Japão). Resultados do Japão em relação ao sequenciamento estão em processamento, e não foram incluídos neste momento.

Os dados obtidos pelo Miseq 2x250 pb (Illumina, Inc., San Diego, CA) foram analisados pelo programa Real Time Analysis (fornecido pela Illumina), que faz o *base call* das imagens do sequenciamento, convertendo-as em sequências no formato fastq, com cada base acompanhada de um escore de qualidade Phred (EWING *et al.*, 2008). A avaliação inicial das leituras do sequenciamento foi feita com o programa FastQC versão 0.11.4 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Inicialmente, as reads *forward* e *reverse* foram unidas produzindo um arquivo fastq montado, utilizando um script, implementado no *pipeline* Qiime (CAPORASO *et al.*, 2010). As etapas de controle de qualidade incluíram a filtragem de leituras de baixa qualidade e de tamanho truncado, e remoção de sequências que ocorrem menos que dez vezes, utilizando o programa VSEARCH (EDGAR, 2010). (<https://github.com/torognes/vsearch>), seguindo o *pipeline* recomendado pelo projeto brasileiro de microbiomas, com algumas modificações (ROGNES *et al.*, 2016)

A clusterização das sequências em Unidades Taxômicas Operacionais (OTUs) com 97% de similaridade foi realizada utilizando o método UPARSE do programa UCLUST (PYRLO *et al.*, 2014) (http://drive5.com/usearch/manual/uclust_algo.html). Possíveis quimeras foram removidas. As leituras foram então mapeadas contra as OTUs, e taxonomias foram atribuídas, utilizando o método RDP, implementado no *pipeline* QIIME (CAPORASO *et al.*, 2010). As sequências foram mapeadas pelo programa QIIME, utilizando o banco de dados Silva, versão 132, como referência.

Para a análise de diversidade baseada em OTU, a tabela OTU original foi rareficada para a mesma profundidade de sequenciamento (profundidade mínima das amostras), para minimizar os efeitos de amostragem. A rarefação α foi realizada utilizando as métricas de diversidade filogenética, Chao1 e espécies observadas. A diversidade β foi estimada computando distâncias UniFrac ponderadas e não ponderadas entre amostras utilizando o *pipeline* QIIME (CAPORASO *et al.*, 2010).

Em média 87 % das *reads forward* e *reverse* foram eficientemente montadas. Após o controle de qualidade, foram mantidas 239.892 leituras analisadas para as amostras. A média de leituras utilizadas por amostra foi de 48.527 (± 4.930). Os resultados de classificações taxonômica foram apresentados para diferentes níveis: Nível 1 = Reino, Nível 2 = Filo, Nível 3 = Classe, Nível 4 = Ordem, Nível 5 = Família.

Para realizar as análises de bioinformática foi utilizado o *pipeline* QIIME 2.0 <https://qiime2.org/>. Primeiramente as *reads* multiplexadas foram atribuídas em amostras biológicas. O programa DADA2, um pacote aberto implementado na linguagem R é utilizado para modelagem e correção de erros de amplicons, sem a construção de OTUs. Em várias comunidades simuladas, DADA2 identificou variantes mais reais e produziu menos sequências espúrias que outros métodos (CALLAHAN *et al.*, 2015). O pacote DADA2 tem um *pipeline* completo implementado para transformar os arquivos fastq em sequências de amostras inferidas, desmembradas e sem quimera. A filtragem de arquivos fastq foi realizada para cortar as sequências em um comprimento especificado, remover sequências mais curtas que esse comprimento e realizar filtros com base no número de bases ambíguas, em um escore mínimo de qualidade e nos erros esperados em uma leitura. Após, a etapa de desreplicação “denoising” foi realizada para se obter uma lista detalhada de sequências únicas e suas abundâncias e produzir pontuação de qualidade de posição do consenso para cada sequência única, tomando a média das qualidades posicionais das leituras componentes. Em seguida, quimeras foram removidas. DADA2 não cria OTUs e diferencia as variáveis de sequência relacionadas. Diferentemente de outros, esse *pipeline* realiza a fusão de paired-endreads após a etapa denoising. Isso ocorre porque o algoritmo de denoising do núcleo usa a relação empírica entre o índice de qualidade e as taxas de erro, atingindo maior precisão através do desmembramento antes da fusão. Como a fusão ocorre após da etapa denoising, é adotada a sobreposição exata, uma vez que se espera que quase todos os erros de substituição já tenham sido removidos.

Após a etapa de filtragem de qualidade ser concluída, os dados resultantes são explorados no programa Qiime2. Foram atribuídas taxonomias às sequências utilizando

um classificador Naive Bayes pré-treinado, utilizando o banco de dados Silva-132, e o plugin Q2-class-classifier.

4.2.3 Determinação do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia)

A suspensão de fezes de todos os grupos foi diluída seriadamente para determinação do número de unidades formadoras de colônias por miligrama de fezes (UFC/mg). As diluições das suspensões foram semeadas em meios BHI (Brain Heart Infusion), Bile-esculina, EMB (Eosin Methylene Blue agar), e MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) em diluições de 10^0 a 10^{-3} , e a contagem foi feita à partir de placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias.

O mesmo procedimento foi realizado no fígado, o qual foi triturado para determinação do número de unidades formadoras de colônias por miligrama (UFC/mg).

As colônias isoladas do fígado foram obtidas através de critério de seleção como formato, tamanho, cor da colônia e analisado o Gram para cada bactéria. Após coletadas, foram submetidas a mais um ciclo de purificação (estriamento em ágar BHI) para obtenção de culturas puras e determinação do perfil de resistência e sensibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em ágar, e determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Microbicida Mínima.

4.2.4 Identificação bacteriana por MALDI-TOF

As Bactérias isoladas em meio BHI a partir do fígado foram submetidas a crescimento em caldo BHI a 37°C por 18h para posterior análise, e aproximadamente $3 \cdot 10^7$ células de cada placa foram retiradas e transferidas para microtubos. Subsequentemente, 3 μL de solução orgânica (água/acetonitrila/ácido trifluoracético, 50:47,5:2,5) foram adicionados para cada microtubo contendo a bactéria isolada. Posteriormente mais 3 μL de ácido fórmico/acetonitrila (25:75) foram adicionados ao microtubo por bactéria isolada. Os microtubos foram imediatamente homogeneizados por 1 minuto, a então 1 μL de solução matriz (solução saturada de α -ciano-4-hidroxi-ácido cinâmico – CHCA - em 50% acetonitrila/2,5% ácido trifluoracético) foi adicionada a solução e gentilmente misturada (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A cepa de *Escherichia coli* K12 obtida da Coleção Pública Portuguesa da parceria com a Universidade do Minho foi usada *in situ* para extração de proteínas, a qual foi usada como padrão para a calibração

externa do MALDI-TOF. Células de *E. coli* K12 foram crescidas em meio ágar Luria-Bertani (LB – 1% bacto-triptona, 0,5% extrato de levedura de bactérias, 1% NaCl) a 37°C por 18h. 1 µg de material celular de uma única colônia *E. coli* K12 foi transferida para a placa de MALDI e a matriz de solução CHCA foi adicionada e gentilmente misturada para ser a cepa controle. Cada amostra foi feita em triplicata para avaliar a reprodutividade. Amostras foram então analisadas em MALDI-TOF espectrômetro microflex LT (BrukerDaltonics, Bremen, Germany), usando o sistema automático MALDI Biotyper 3.0, e os testes foram realizados na Universidade Federal de Lavras e Saarland University Medical Center.

4.2.5 Antibiograma

Os testes para determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos foram realizados com os isolados bacterianos obtidos do fígado do grupo SmBr. Os isolados foram inoculados em 10 mL de Caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C, por cerca de 24 horas.

As culturas bacterianas foram diluídas em salina estéril para atingir a escala de 0,5 na escala de Mac Farland. Esta diluição foi inoculada na superfície das placas contendo meio ágar Mueller Hinton com auxílio de swabs estéreis. Posteriormente, foram adicionados os discos de antibióticos e as placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Os antibióticos utilizados foram Clindamicina 2µg (Classe das Lincosaminas) Doxiciclina 30µg (classe das Tetraciclina) Gentamicina 10µg (Classe dos Aminoglicosídeos), Levofloxacino 5µg (Classe das Quinolonas), Eritromicina 15µg (classe dos Macrolídeos) e Sulfametoxazol+Trimetropima 23,75µg + 1,25µg (Classe das Sulfonamidas). Os antibióticos foram escolhidos por serem usados na terapêutica de infecções gastrointestinais. A leitura foi feita medindo-se os halos, e a interpretação de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M7-M10, 2015). Após confirmadas sensibilidade das bactérias aos antibióticos, as bactérias foram submetidas a análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima.

4.2.6 Concentração inibitória mínima (CIM)

Para a realização e análise destes ensaios foi adotado o procedimento descrito por Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI M100 (2015) para bactérias. Em tubo

de 1,5 mL, foi preparada a solução dos antibióticos Clindamicina, Doxiciclina, Eritromicina, Gentamicina, Levofloxacino, Sulfametoxazol+Trimetropima. Os antibióticos foram ressuspensos de acordo com a instrução dos fabricantes: Clindamicina, Doxiciclina, Eritromicina, Gentamicina foram diluídos em 5mL (concentração estoque 20mg/mL), Levofloxacino em 9mL (concentração estoque 11,1 mg/mL) e Sulfametoxazol+Trimetropima em 10mL (concentração estoque 2mg/mL).

Para os testes de determinação de atividade antimicrobiana, foram utilizadas as bactérias isoladas a partir do fígado dos animais dos grupos SmBr, SmJp e SjJp. Com o auxílio de alça de bacteriológica esterilizada, culturas puras de 24 horas dos micro-organismos crescidas em caldo BHI foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A suspensão gerada foi padronizada a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A suspensão foi diluída 10 vezes em solução salina 0,9% estéril e posteriormente, 1ml desta diluição foi transferido para 9mL de Caldo Miller Hinton (CMH). Aliquotas de 20 μ L desta última suspensão foram adicionadas aos respectivos poços da placa de 96 poços após diluição seriada dos antibióticos.

Alguns poços da placa foram utilizados como controles de crescimento do inóculo e de esterilidade do meio de cultura. Nos poços de controle de esterilidade, foram adicionados apenas 200 μ L de meio BHI. Nos poços para controle de crescimento dos micro-organismos avaliados, foram adicionados 180 μ L de meio CMH e 20 μ L do inóculo previamente preparado.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente foi adicionado o revelador resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) 0,2% (adição de 20 μ L por poço). A resazurina é um indicador de viabilidade celular, cujo mecanismo se baseia na redução da resazurina (cor púrpura) a resorufina (cor rósea), tendo correlação direta com a quantidade/proliferação de microrganismos e a quantidade de cor no poço. Após adição da resazurina, a placa foi incubada a 37°C por 2 horas, e após incubação, foi feita a leitura pela observação da mudança de cor (O'BRIEN *et al.*, 2000).

4.2.7 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Uma alíquota de 10 μ L foi retirada dos poços que não apresentaram crescimento significativo (coloração azul), e do primeiro poço onde ocorreu crescimento bacteriano (rosa/púrpura). Esta alíquota foi aplicada sobre a superfície de uma placa contendo ágar

Mueller Hinton. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas. A ausência de crescimento microbiano foi indicativo da ação bactericida sobre o micro-organismo testado. A menor concentração onde ocorreu atividade microbicida foi definida como a CMM.

4.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E CAPTURA DE FOTOS

Os órgãos fígado e intestino foram fixados em solução de paraformaldeído pH = 7,4 a 0,1 mol. Os fragmentos dos órgãos foram processados (desidratados, diafanizados, e incluídos em parafina). Os órgãos em parafina foram cortados em micrótomo rotativo a 5 micrometros de espessura, com 3 cortes semi-seriados. As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina e após analisadas em microscopia de luz (ROCHA *et al.* 2017). Para obter imagens dos tecidos utilizou-se do microscópio AxioCam ICc3 da marca Zeiss acoplado ao programa AxioVision para observação de formação de granulomas, possíveis danos em tecido e presença de ovos de *S. mansoni* e *S. japonicum*.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ADESÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS

Os parasitos adultos de *S. mansoni* foram colocados em placas de 6 poços para realizar a oviposição por 5 dias. Após, houve a coleta dos ovos e os vermes adultos, então foram separados em 2 tubos de 50mL e fixados em formalina tamponada por 24h. A diluição das bactérias após o crescimento (*Bordetella hinzii*, *Escherichia coli*, *Haemophilus haemolyticus* e *Lactococcus garvieae*) foi realizada em caldo BHI até atingir a Densidade Óptica de 0,2 (600 nm). Desta diluição, 1ml do meio contendo a bactéria diluída foi colocado em tubos de 2ml. Para cada bactéria, 2 tubos foram utilizados para parasitos e 2 tubos para ovos. Três casais (6 parasitos) foram adicionados por tubo; e pelo menos 100 ovos foram colocados em cada tubo, sendo todos incubados por 1h a 37°C a 100 RPM. Os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 200 rpm, retirado o sobrenadante e adicionado 1mL de PBS estéril. O procedimento repetiu-se por mais duas vezes. O conteúdo dos tubos (vermes ou ovos) foi transferido para placa de cultura de 24 poços, e foi completado o volume com 1 mL de caldo BHI. Um controle positivo com meio de cultura e parasito; meio de cultura e ovos; e meio de cultura e bactérias foram também analisados. A cada poço foram adicionados 100 µL de resazurina na concentração de 0,02 mg/mL fo. As placas foram incubadas a 37°C, 40 rpm por duas horas. A mudança de coloração foi realizada através da leitura da densidade ótica, e como

as duas formas do corante (oxidada ou reduzida) tem comprimentos de onda diferentes ao absorver luz, as leituras de absorbância foram feitas a 570 (forma reduzida) e 600 nm (forma oxidada) em leitor de microplacas e calculada segundo a equação:

$$\text{Redução da resazurina} = [A_{570} - (A_{600} \times R_0)]$$

Nesta equação, A_{570} = absorbância a 570nm, A_{600} = absorbância a 600nm e R_0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C) - resazurina na ausência de bactérias [$R_0 = (A_{570}C / A_{600}C)$] (DINIZ, 2013; STIEFEL, 2016).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

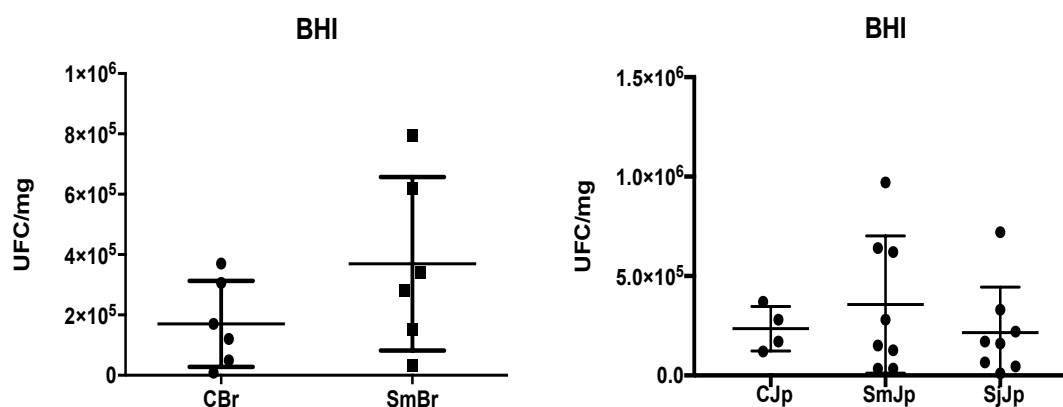
Para três ou mais grupos, os dados paramétricos foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Student- Newman-Keuls para comparações múltiplas. Para comparações entre dois grupos foram utilizados os testes t Student para dados paramétricos ou Teste Tukey. O nível de significância dos testes foi estabelecido para 5%. Resultados com valor de $p < 0,05$ são diferentes estatisticamente.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO DA MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *S. mansoni* E *S. japonicum* NAS FEZES

A partir das fezes, fez-se o cálculo de UFC/mg de fezes dos animais controle e dos animais infectados com *S. mansoni* e *S. japonicum*. Nas fezes dos animais provenientes do grupo CBr a quantificação bactérias variou de $8,35 \cdot 10^3$ a $3,7 \cdot 10^5$ UFC/mg, e nas fezes do grupo CJp, a variação foi de $1,2 \cdot 10^5$ a $3,7 \cdot 10^5$ UFC/mg. Para o grupo SmBr, os valores de UFC/mg de fezes variaram de $3,4 \cdot 10^4$ a $7,94 \cdot 10^5$. Já para os grupos SmJp e SjJp1 a variação de UFC/mg de fezes for $3,4 \cdot 10^4$ a $12,7 \cdot 10^5$ e $1,1 \cdot 10^4$ e $7,2 \cdot 10^5$, respectivamente. Os dados demonstram que não houve diferença significativa (CBr e SmBr- $p = 0,3637$ e CJp, SmJp e SjJp - $p = 0,5564$). Houve crescimento bacteriano com incontáveis colônias para os meios Bile esculina e EMB, tanto para CBr quanto para o grupo SmBr. Não houve crescimento no meio MRS para os grupos CBr e SmBr, porém foram observados o crescimento de incontáveis colônias para CJp, SmJp e SjJp.

Figura 5 - Unidades Formadoras de Colônia nas fezes.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: BHI - Brain Heart Infusion - Infusão de Coração e Cérebro; C - Controle; Sm. *Schistosoma mansoni*; Sj - *Schistosoma japonicum*.

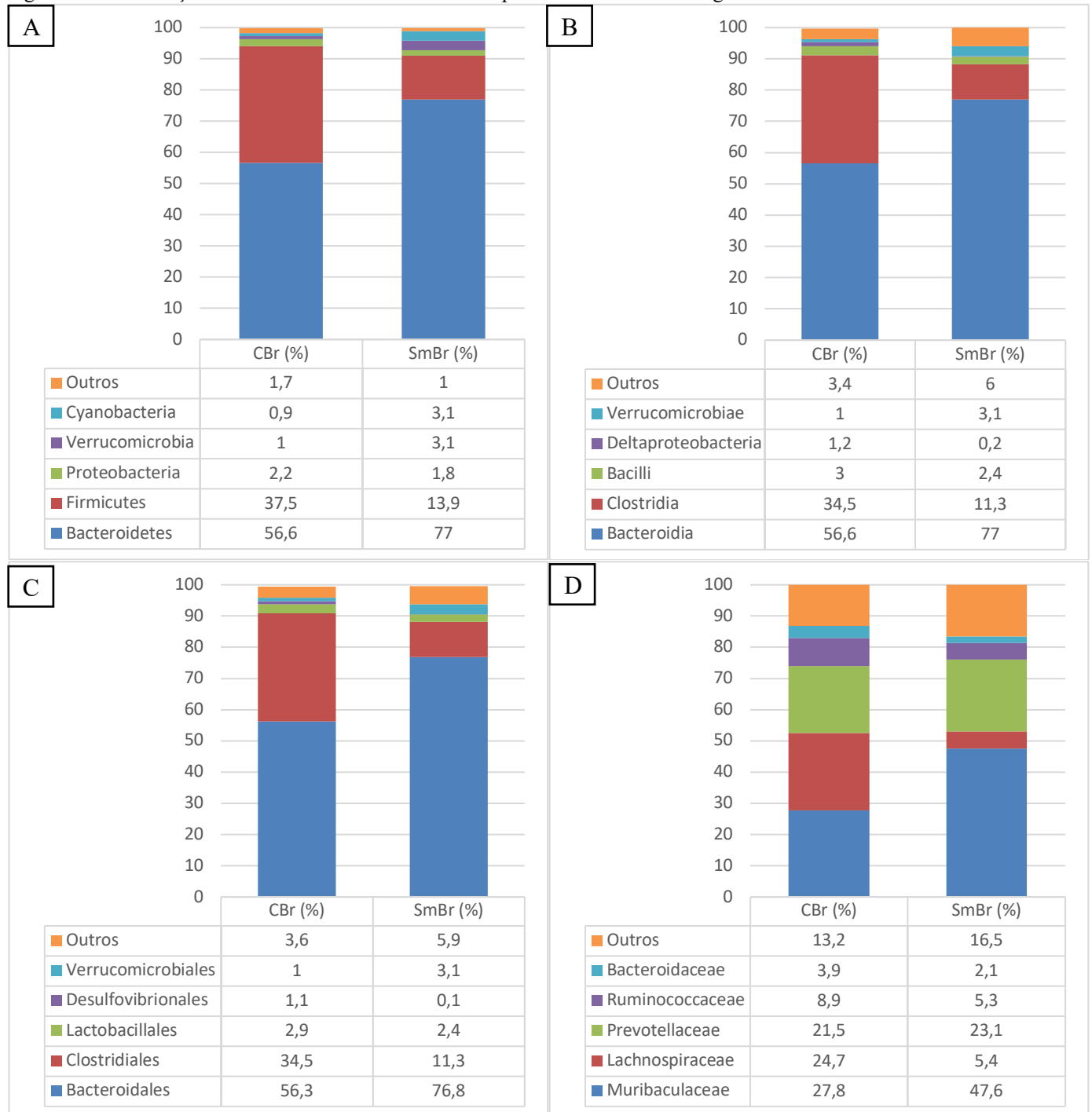
5.1.1 Análise Metagenômica nas fezes

A análise da microbiota presente nas fezes no grupo infectado SmBr demonstrou um aumento de bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes (56,6% para 77%) e uma diminuição do filo Firmicutes (37,5% para 13,9%) (Figura 6). Nota-se que não houve

grandes alterações para outros Filos, sendo pouca a diferença encontrada para os filos Proteobactéria, Verrucomicrobia e Cyanobacteria.

Em relação à Classe foi identificada alterações no número de bactérias da Classe Bacterozia (56,6% para CBr e 77% para SmBr) e Clostridia (34,5% para CBr e 11,3% para SmBr). Em relação à ordem, a Bacteroziales (56,3% para CBr e 76,8% para SmBr) e Clostridiales (34,5 para CBr e 11,3% para SmBr).

E por fim, já para Família, Lachnospiraceae (24,7% para CBr e 5,4% para SmBr); Muribaculaceae (27,8% para CBr e 47,6% para SmBr) e Prevotellaceae (21,5% para CBr e 23,1% para SmBr) são os que estão mais presentes quando se comparam os animais não infectados e os infectados com *S. mansoni* nas fezes.

Figura 6 - Classificação das bactérias de Filo até Família a partir de fezes camundongos infectados com *S. mansoni*

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: Sm - *Schistosoma mansoni*. A) Filo. B) Classe. C) Ordem. D) Família.

5.1.2 PCR em tempo real

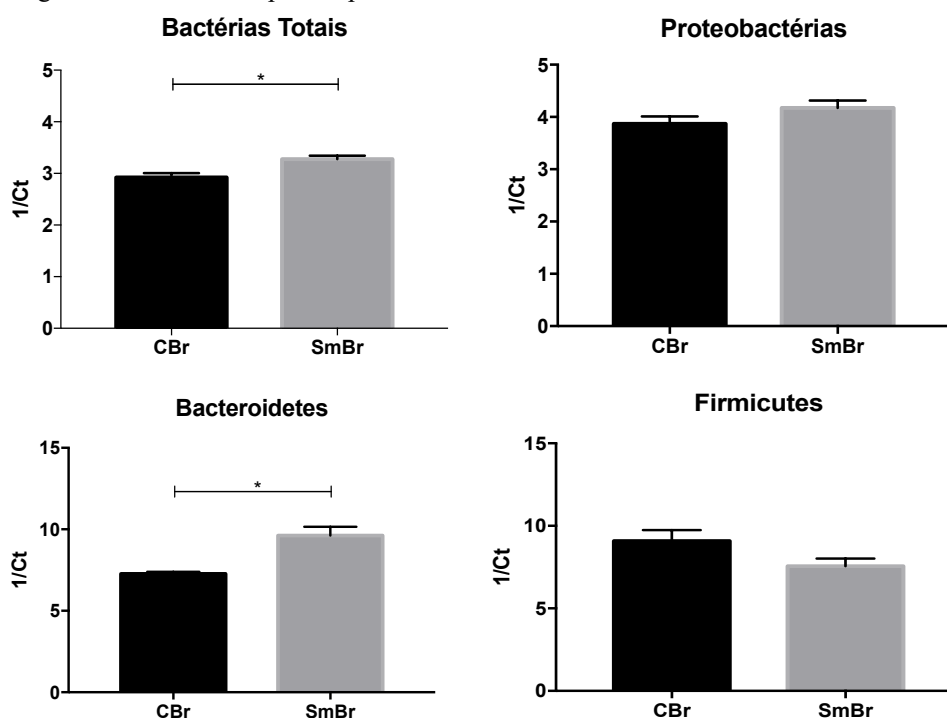
Para análise da PCR em tempo real para as fezes, conforme Tabela 2 e Figura 7, houve uma maior presença de DNA para Bactérias Totais para o grupo SmBr quando comparado ao grupo CBr ($p = 0,0441$). Em relação ao Filo Bacteroidetes houve maior presença de DNA para o grupo SmBr quando comparado ao grupo CBr ($p = 0,0256$). Para Firmicutes, houve diminuição para o grupo SmBr, e para Proteobacterias foi observado aumento, sendo que para ambos não houve diferenças estatísticas quando comparados CBr e SmBr.

Tabela 2 – Cts na PCR em tempo real para CBr e SmB com DNAs extraídos das fezes.

	CBr(C_t)	SmBr(C_t)
Bactérias totais	34,21 ($\pm 0,97$)	30,52 ($\pm 0,64$)
Bacteroidetes	13,76 ($\pm 0,25$)	10,40 ($\pm 0,57$)
Firmicutes	11,04 ($\pm 0,81$)	13,26 ($\pm 0,80$)
Proteobacterias	25,87 ($\pm 0,94$)	23,98 ($\pm 0,83$)

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Figura 7 – PCR em tempo real para Bacterias Totais e Filo Bacteroidetes



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: CBr – Controle; SmBr – Infectado com *Schistosoma mansoni*

5.2 ESTUDO DA MICROBIOTA DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *S. mansoni* E *S. japonicum*.

5.2.1 Contagem de bactérias presentes no fígado

Para identificação das bactérias em fígado dos animais controle e animais infectados com *S. mansoni* e *S. japonicum*, fez-se o plaqueamento em meios BHI, Bile Esculina, EMB e MRS. Desta forma, placas foram analisadas quanto ao crescimento de bactérias.

Para o grupo CBr e CJp em todos os meios e diluições, não houve crescimento bacteriano. Já para o grupo infectado SmBr, SmJp e SjJp apresentaram crescimento conforme tabela 3 a seguir:

Tabela 3 - Crescimento de bactérias de fígado de camundongos

	CBr (%)	CJp (%)	SmBr (%)	SmJp (%)	SjJp (%)
BHI	0/6 (0)	0/4 (0)	5/6 (85,7)	4/8 (50)	2/8 (25)
Bile Esculina	0/6 (0)	0/4 (0)	6/6 (100)	3/8 (37,5)	3/8 (37,5)
EMB	0/6 (0)	0/4 (0)	4/6 (66,6)	2/8 (25)	3/8 (37,5)
MRS	0/6 (0)	0/4 (0)	0/6 (0)	0/8 (0)	3/8 (37,5)

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: C - Controle. Sm - *S. mansoni*. Sj - *S. japonicum*. BHI - Brain Heart Infusion Infusão de Coração e Cérebro. EMB - Eosin Methylene Blue - Eosina azul de metileno. MRS - de Man, Rogosa e Sharpe.

E por fim, fez-se o cálculo de UFC/mg de fígado dos animais infectados com *S. mansoni* e *S. japonicum*. Para o grupo controle, não houve contagem de UFC/mg, pois não houve crescimento em nenhum meio de cultura (BHI, Bile Esculina, EMB e MRS). Para o grupo infectado os valores variaram (Tabela 4 a 6): SmBr - BHI - $0,16 \cdot 10^3$ a $1,63 \cdot 10^3$ UFC/mg, SmJp - $1,4 \cdot 10^{-1}$ a $2,2 \cdot 10^2$ UFC/mg e SjJp $3,3 \cdot 10^3$ a incontáveis; Bile esculina – SmBr - $0,14 \cdot 10^2$ UFC/mg a $0,38 \cdot 10^3$ UFC/mg, SmJp - $2 \cdot 10^{-1}$ UFC/mg a incontáveis UFC/mg e SjJp - incontáveis; EMB – SmBr - $0,13 \cdot 10^2$ a $0,58 \cdot 10^2$ UFC/mg, SmJp - $9 \cdot 10^{-1}$ a incontáveis e SjJp - incontáveis. Não houve diferença estatísticas ($p = 0,3068$) quando comparado os 3 grupos. Não houve crescimento em MRS para SmBr e SmJp, mas houve para SjJp.

Tabela 4 - Número de UFC/mg de fígado provenientes de camundongos infectados SmBr.

Meios	SmBr1	SmBr2	SmBr3	SmBr4	SmBr5	SmBr6
BHI	1,63.10 ³	0,16.10 ³	0	0,21.10 ¹	1,71.10 ²	0,32.10 ¹
Bile Esculina	0,38.10 ³	0,35.10 ²	0,14.10 ²	7,3.10 ⁻¹	I	I
EMB	0	0,58.10 ²	0	4,3.10 ⁻¹	0,27.10 ¹	0,13.10 ²
MRS	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: C - Controle. Sm - *S. mansoni*. I – Incontáveis. BHI - Brain Heart Infusion - Infusão de Coração e Cérebro. EMB - Eosin Methylene Blue - Eosina azul de metileno. MRS - de Man, Rogosa e Sharpe.

Tabela 5 - Número de UFC/mg de fígado provenientes de camundongos infectados SmJp.

Meios	SmJp1	SmJp2	SmJp3	SmJp4	SmJp5	SmJp6	SmJp7	SmJp8
BHI	-	-	-	1,4.10 ⁻¹	-	2,2.10 ²	0,2.10 ²	0,2.10 ²
Bile Esculina	-	-	-	2.10 ⁻¹	I	I	-	-
EMB	-	-	-	-	-	9.10 ⁻¹	I	-
MRS	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: C - Controle. Sm - *S. mansoni*. I – Incontáveis. BHI - Brain Heart Infusion - Infusão de Coração e Cérebro. EMB - Eosin Methylene Blue - Eosina azul de metileno. MRS - de Man, Rogosa e Sharpe.

Tabela 6 - Número de UFC/mg de fígado provenientes de camundongos infectados SjJp.

Meios	SjJp1	SjJp2	SjJp3	SjJp4	SjJp5	SjJp6	SjJp7	SjJp8
BHI	-	3,3.10 ³	-	-	-	-	-	I
Bile Esculina	-	I	-	-	-	I	-	I
EMB	-	I	-	-	I	-	-	I
MRS	-	I	-	-	-	-	I	I

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

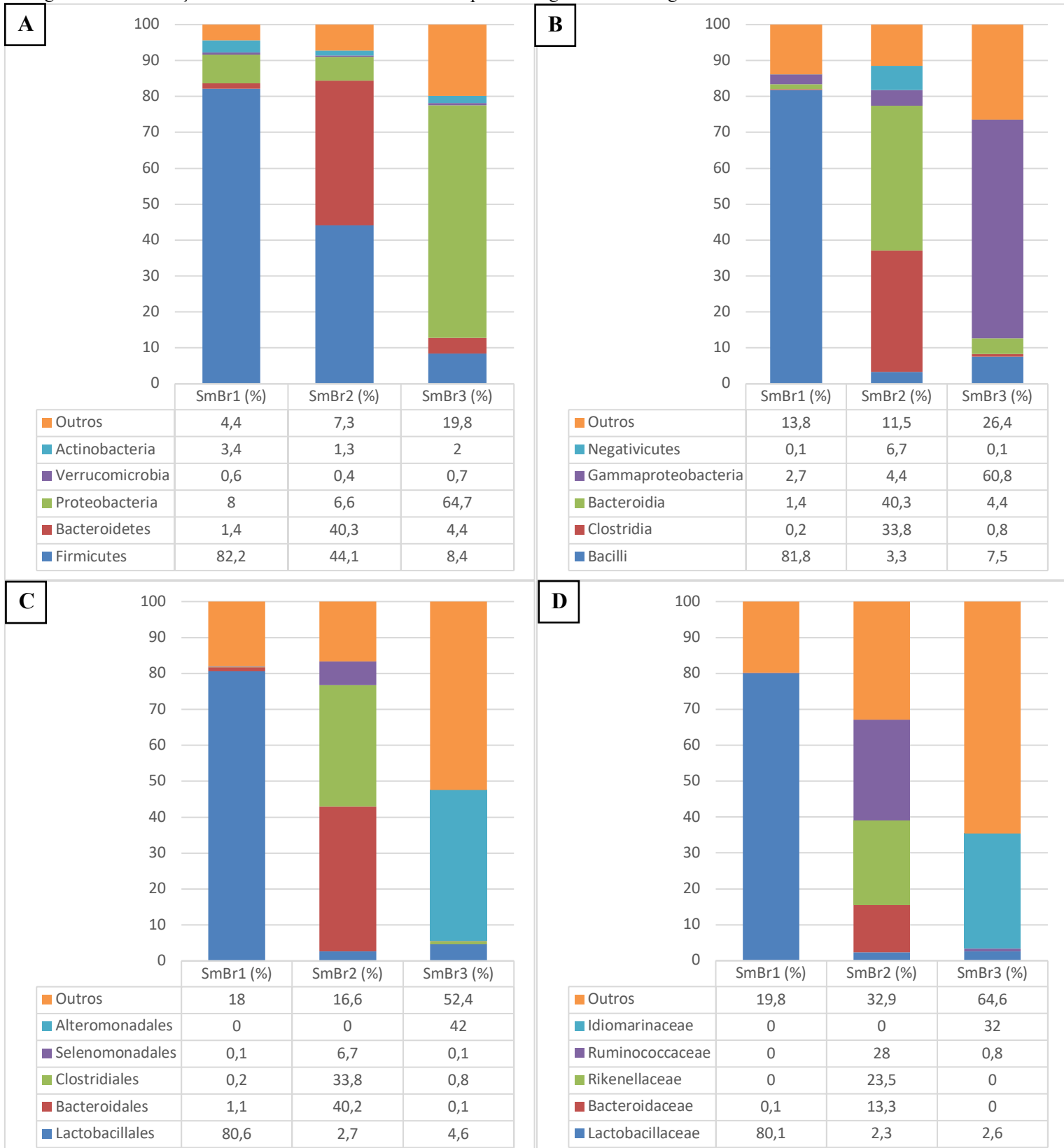
Legenda: C - Controle. Sm - *S. mansoni*. I – Incontáveis. BHI - Brain Heart Infusion - Infusão de Coração e Cérebro. EMB – Eosin Methylene Blue - Eosina azul de metileno. MRS - de Man, Rogosa e Sharpe.

5.2.2 Análise Metagenômica do fígado

A partir da análise metagenômica para SmBr, foi observado que não houve concordância em relação às bactérias encontradas, havendo maior diversidade nas classes taxonômicas entre os animais analisados. Isto se percebe já iniciando pelo Filo, em que Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobactérias são os que se destacam. Para Firmicutes, houve variação entre 8,4 a 82,2%; para Bacteroides, 1,4 a 40,3%; já para Proteobacteria, 6,6 a 64,7%. Desta forma, a variação foi-se ampliando, em que para a Classe, Bacteroidia

(1,4 a 40,3%), Clostridia (de 0,2 a 33,8%), Bacilli (de 3,3 a 81,8%) e Gammaproteobacteria (2,7 a 60,8%) são os que apresentaram maior variação.

Para a Ordem, Bacteriales (de 0,2 a 40,2%), Clostridiales (0,2 a 33,8%) Lactobacillales (de 2,7 a 80,6%), e Alteromonadales (42%) são os que se destacam. Para a Família, Rikenellaceae (23,5%), Bacteroidaceae (de 0,1 a 13,3%), Lactobacillaceae (de 2,3 a 80,1%), Ruminococcaceae (0,8 a 28%) e Idiomarinaceae (0 a 32%) são os que possuem maior variação (Figura 8):

Figura 8 - Classificação das bactérias de Filo até Família à partir de fígado camundongos infectados com *S. mansoni*.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: Sm - *Schistosoma mansoni*. A) Filo; B) Classe; C) Ordem; D) Família.

5.2.3 Identificação das bactérias provenientes do fígado - MALDITOF

Obteve-se 4 espécies de bactérias diferentes para SmBr, 2 espécies para SmJp e 3 para Sjjp (Tabela 7). Estas bactérias foram isoladas em meio BHI, Bile Esculina e EMB para purificação. As bactérias foram analisadas no equipamento MALDI-TOF, obtendo-se o seguinte resultado, de acordo com o National Center for Biotechnology Information (NCBI) – Centro Nacional de Informação Biotecnológica - do Filo Proteobacteria: *Bordetella hinzii*, *Haemophilus haemolyticus* e *Escherichia coli* para SmBr; já do Filo Firmicutes: *Lactococcus garviea* e para SmBr; *Staphylococcus nepalensis* *Staphylococcus sciuri* para SmJp; e *Enterococcus galinarum*, *Staphylococcus sciuri* e *Paenibacillus* para Sjjp, conforme tabela 7:

Tabela 7 - Identificação de bactérias à partir do fígado dos animais infectados SmBr, SmJp e Sjjp.

Bac	Ágar	Identificação da bactéria	Gram	Formato	Identificação - MALDITOF	
SmBr	1	BHI	Pequena, branca com borda irregular	Negativo	Cocos	<i>Bordetellahinzii</i>
SmBr	2	BHI	Grande, branca com borda arredondada	Negativo	Bacilo	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
SmBr	3	BHI	Grande, branca com borda irregular	Negativo	Bacilo	<i>Escherichia coli</i>
SmBr	4	BHI	Pequena, branca com borda irregular	Positivo	Cocos	<i>Lactococcus garvieae</i>
SmBr	5	BE	Grande, branca com borda arredondada	Negativo	Bacilo	<i>Escherichia coli</i>
SmBr	6	EMB	Grande, rosa com borda arredondada	Negativo	Bacilo	<i>Escherichia coli</i>
SmJp	1	BHI	Pequena, branca com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
SmJp	2	BE	Pequena, negra com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
SmJp	3	BE	Grande, branca com borda irregular	Positivo	Diplococos	<i>Staphylococcus sciuri ssp.</i>
SmJp	4	BHI	Média, branca com borda regular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
SmJp	5	BE	Pequena, negra com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
SmJp	6	EMB	Pequena, verde com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
SmJp	7	BHI	Pequena, branca com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
SmJp	8	BE	Pequena, negra com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
SmJp	9	BHI	Pequena, branca com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
SmJp	10	BHI	Pequena, branca com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
Sjjp	1	BHI	Grande, incolor com borda irregular	Positivo	Diplococos	<i>Staphylococcus sciuri ssp.</i>
Sjjp	2	BHI	Média, branca com borda irregular	Positivo	Cocos	<i>Enterococcus galinarum</i>
Sjjp	3	BE	Pequena, branca com borda circular	Positivo	Cocos	<i>Enterococcus galinarum</i>
Sjjp	4	BE	Grande, negra com borda circular	Positivo	Diplococos	<i>Staphylococcus sciuri ssp.</i>
Sjjp	5	BHI	Grande, amarela com borda circular	Positivo	Estreptobacilo	<i>Paenibacillus sp.</i>

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: BHI - Brain Heart Infusion - Infusão de Coração e Cérebro; EMB - EosinMethylene Blue - Eosina azul de metileno.
BE – Bile esculina.

5.2.4 Antibiograma das bactérias isoladas do fígado

Todas as bactérias analisadas (*Bordetella hinzii*, *Haemophilus haemolyticus*, *Escherichia coli* e *Lactococcus garvieae*) foram resistentes a Clindamicina. Para Doxiciclina: o halo de inibição variou de 11 (*E. coli*) a 28mm (*L. garvieae*); Eritromicina: o halo de inibição variou de 12 (*E. coli*) a 35mm (*B. hinzii*); Gentamicina: o halo de inibição variou de 21 (*L. garvieae* e *E. coli*) a 25 mm (*H. haemolyticus*); Levofloxacino: o halo de inibição variou de 29 (*B. hinzii*) a 40 mm (ambas *E. coli*); e Sulfametoxazol + trimetoprima: o halo de inibição variou entre resistente - sem halo - (*L. garvieae*) a 33mm (*B. hinzii*) (CLSI, 2016), conforme pode ser visto na tabela 8 a seguir:

Tabela 8 - Halos (em milímetros) de bactérias isoladas de fígado de animais infectados com *S. mansoni* partir de Antibiograma.

	Sensibilidade	<i>B. hinzii</i>	<i>H. haemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Cli	≥21 mm	R	R	R	R	R	R
Dox	≥14mm	25	24	22	28	24	11
Eri	≥13mm	35	21	13	32	12	12
Gen	≥15mm	20	25	23	23	21	21
Lev	≥16mm	29	35	40	33	40	31
Sut	≥16mm	33	29	30	R	29	30

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: R – Resistente (sem halo). Clindamicina (Cli), Doxiciclina (Dox), Eritromicina (Eri), Gentamicina (Gen), Levofloxacino (Lev), e Sulfametoxazol + Trimetoprima (Sut).

O protocolo foi realizado somente com as bactérias isoladas do fígado de animais do grupo SmBr, e tais antibióticos selecionados foram testados com as bactérias do fígado dos grupos SmJp e SJJp.

5.2.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

As tabelas 9, 10 e 11 trazem os valores de CIM e CMM (CLSI, 2016), para os diferentes antibióticos frente às bactérias isoladas do fígado. Para Clindamicina, *B. hinzii* e *L. garvieae* apresentaram-se com CIM e CMM de 0,31µg/mL; *H. haemolyticus* apresentou CIM e CMM de 0,62µg/mL e *E. coli* teve CIM e CMM ≥10µg/mL. Para Doxiciclina, *B. hinzii* e *H. haemolyticus* tiveram CIM e CMM de 0,62µg/mL; *L. garvieae* e *E. coli* apresentaram-se com CIM de 0,31µg/mL, com CMM de 0,31µg/mL para a primeira e 5 a 10µg/mL para a segunda, sendo todas sensíveis ao fármaco (CIM ≤4µg/mL).

Para Eritromicina, *B. hinzii*, mostrou CIM e CMM de 0,07µg/mL; *H. haemolyticus*, CIM e CMM de 0,62µg/mL; *L. garvieae*, CIM e CMM de 0,31µg/mL e *E. coli* com CIM de 0,15 a ≥10 µg/mL e CMM ≥10µg/mL, sendo assim, somente *B. hinzii* sensível ao fármaco (CIM ≤0,5µg/mL). Em relação a Gentamicina, para *B. hinzii*, seu CIM foi de 0,31µg/mL e CMM de 1,25µg/mL; para *H. haemolyticus*, CIM e CMM de 0,62µg/mL; *L. garvieae* apresentou-se com CIM e CMM de 0,62µg/mL e para *E. coli*, CIM e CMM variou de 0,15 a 0,31µg/mL. Desta forma, todas as bactérias foram sensíveis ao fármaco (CIM ≤ 4µg/mL).

Para Levofloxacino, *B. hinzii* apresentou CIM e CMM de 0,62µg/mL; *H. haemolyticus* e *E. coli* com CIM e CMM de 0,31µg/mL e *L. garvieae*, CIM e CMM de 0,31µg/mL. Assim, somente *B. hinzii* não foi sensível ao fármaco (CIM ≤ 0,5µg/mL).

Por fim, para Sulfametoxazol + Trimetoprima, para *B. hinzii*, *H. haemolyticus* e *E. coli* apresentou CIM e CMM de ≤0,31µg/mL; para *L. garvieae*, CIM e CMM de 0,62µg/mL. Desta forma, nenhuma bactéria foi sensível ao fármaco (CIM ≤0,05µg/mL).

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para bactérias isoladas dos animais do grupo SmBr.

	S	<i>B. hinzii</i>		<i>H. haemolyticus</i>		<i>E. coli</i>		<i>L. garvieae</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i>	
		CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
Cli	≤0,5	≤0,31	≤0,31	0,62	0,62	≥10	≥10	≤0,31	≤0,31	≥10	≥10	≥10	≥10
Dox	≤4	0,62	0,62	0,62	0,62	0,31	5	≤0,31	≤0,31	0,31	10	0,31	5
Eri	≤0,5	0,078	0,078	0,62	0,62	≥10	≥10	≤0,31	≤0,31	≥10	≥10	≥10	≥10
Gen	≤4	0,31	1,25	0,62	0,62	0,31	0,31	0,062	0,062	0,15	0,15	0,31	0,31
Lev	≤0,5	0,62	0,62	≤0,31	≤0,31	≤0,31	≤0,31	0,031	0,031	≤0,31	≤0,31	≤0,31	≤0,31
Sut	≤0,05	≤0,31	≤0,31	≤0,31	≤0,31	≤0,31	≤0,31	0,62	0,62	≤0,31	≤0,31	≤0,31	≤0,31

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: Concentração em µg/mL. Clindamicina (Cli), Doxiciclina (Dox), Levofloxacino (Lev), Gentamicin(Gen), Eritromicina (Eri) e Sulfametoxazol + Trimetoprima (Sut). S – Sensibilidade µg/mL.

Para Clindamicina, *S. nepalensis* apresentou com CIM e CMM de 0,62µg/mL a ≥10µg/mL; *S. sciuri* apresentou CIM de 1,25µg/mL e CMM de 2,5µg/mL. Para Doxiciclina, *S. nepalensis* teve CIM de 0,15µg/mL a ≥10µg/mL, já *S. sciuri* teve CIM de 0,15µg/mL e CMM 5µg/mL, sendo ambos sensíveis ao fármaco (CIM ≤4µg/mL) (Tabela 10).

Para Eritromicina, *S. nepalensis* mostrou CIM e CMM de 0,31 µg/mL a 10 µg/mL; *S. sciuri*, CIM de 0,62µg/mL e CMM 5µg/mL, sendo assim, somente *S. nepalensis* apresentou sensibilidade ao fármaco (CIM ≤0,5µg/mL). Em relação a Gentamicina, para *S. nepalensis*, seu CIM e CMM foi de ≤0,07µg/mL a 0,15µg/mL; para *S. sciuri*

apresentou-se com CIM de 0,07µg/mL e CMM de 0,15µg/mL. Desta forma, ambas as bactérias foram sensíveis ao fármaco (CIM ≤ 4µg/mL).

Para Levofloxacino, *S. nepalensis* apresentou CIM e CMM de 0,31µg/mL a 5µg/mL; *S. sciuri* com CIM e CMM de 0,62µg/mL. Assim, somente *S. nepalensis* apresentou sensibilidade ao fármaco (CIM ≤ 0,5µg/mL).

Por fim, para Sulfametoxazol + Trimetoprima, para *S. nepalensis* apresentou CIM e CMM de 1,25µg/mL a 10µg/mL; para *S. sciuri*, CIM de 5µg/mL e CMM de ≥10. Desta forma, nenhuma bactéria foi sensível ao fármaco (CIM ≤ 0,05 µg/mL). Todos os resultados estão descritos na tabela 10:

Tabela 10 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbica Mínima (CMM) para SmJp.

	S	<i>S. nepalensis</i> (1)		<i>S. nepalensis</i> (2)		<i>S. sciuri</i> (3)		<i>S. nepalensis</i> (4)		<i>S. nepalensis</i> (5)	
		CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
Cli	≤0,5	2,5	≥10	0,62	2,5	1,25	2,5	2,5	5	1,25	5
Dox	≤4	0,62	≥10	0,31	2,5	0,15	5	0,31	5	0,31	5
Eri	≤0,5	2,5	≥10	0,31	5	0,62	5	0,62	≥10	0,62	5
Gen	≤4	≤0,07	0,15	≤0,07	≤0,07	≤0,07	0,15	≤0,07	0,15	≤0,07	0,15
Lev	≤0,5	0,62	1,25	0,62	1,25	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	5
Sut	≤0,05	2,5	≥10	≥10	≥10	5	≥10	≥10	≥10	1,25	≥10

	S	<i>S. nepalensis</i> (6)		<i>S. nepalensis</i> (7)		<i>S. nepalensis</i> (8)		<i>S. nepalensis</i> (9)		<i>S. nepalensis</i> (10)	
		CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
Cli	≤0,5	1,25	2,5	1,25	5	1,25	2,5	0,62	0,62	0,62	1,25
Dox	≤4	0,31	≥10	0,31	2,5	0,62	2,5	0,31	0,62	0,31	0,62
Eri	≤0,5	1,25	≥10	0,62	≥10	0,62	5	0,31	2,5	0,31	0,62
Gen	≤4	≤0,07	≤0,07	≤0,07	≤0,07	≤0,07	≤0,07	≤0,07	≤0,07	≤0,07	≤0,07
Lev	≤0,5	0,62	1,25	0,62	0,62	0,62	2,5	0,31	0,31	0,31	0,31
Sut	≤0,05	≥10	≥10	≥10	≥10	≥10	≥10	≥10	≥10	1,25	≥10

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: Concentração em ug/mL. Clindamicina (Cli), Doxiciclina (Dox), Levofloxacino (Lev), Gentamicina (Gen), Eritromicina (Eri) e Sulfametoxazol + Trimetoprima (Sut). S - Sensibilidade µg/mL.

Para Clindamicina, *S. sciuri* apresentou com CIM de 0,62µg/mL e 1,25 µg/mL e CMM de 2,5µg/mL; *E. galinarum* apresentou CIM e CMM ≥10µg/mL e *Paenibacillus* CIM e CMM ≥10µg/mL. Para Doxiciclina, *S. sciuri* apresentou com CIM de ≤0,07µg/mL e 0,15 µg/mL e CMM de 0,31µg/mL e 5µg/mL; *E. galinarum* apresentou CIM de 0,62 µg/mL e 1,25 µg/mL e CMM ≥10µg/mL; e *Paenibacillus* CIM e CMM ≥10µg/mL, sendo *S. sciuri* e *E. galinarum* sensíveis ao fármaco (CIM ≤4µg/mL) (Tabela 11).

Para Eritromicina, *S. sciuri* mostrou CIM 0,31µg/mL e 0,62µg/mL e CMM de 5µg/mL; *E. galinarum*, CIM de 1,25µg/mL e CMM ≥10µg/mL; e *Paenibacillus* com CIM 2,5µg/mL e CMM 10µg/mL, sendo assim, somente *S. sciuri* apresentou sensibilidade ao fármaco (CIM ≤0,5µg/mL). Em relação a Gentamicina, para *S. sciuri*,

seu CIM e CMM foi de $\leq 0,07 \mu\text{g/mL}$; para *E. galinarum* apresentou-se com CIM de $5 \mu\text{g/mL}$ e CMM até $10 \mu\text{g/mL}$ e *Paenibacillus* com CIM $2,5 \mu\text{g/mL}$ e CMM $5 \mu\text{g/mL}$. Desta forma, *S. sciuri* foi sensível ao fármaco (CIM $\leq 4 \mu\text{g/mL}$).

Para Levofloxacino, *S. sciuri* apresentou CIM $0,15 \mu\text{g/mL}$ a $0,62 \mu\text{g/mL}$ e CMM de $0,31 \mu\text{g/mL}$ a $0,62 \mu\text{g/mL}$; *E. galinarum* com CIM de $1,5$ a $2,5 \mu\text{g/mL}$ e CMM $\geq 10 \mu\text{g/mL}$; e *Paenibacillus* com CIM e CMM de $5 \mu\text{g/mL}$. Assim, somente *S. sciuri* apresentou sensibilidade ao fármaco (CIM $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$).

Por fim, para Sulfametoxazol + Trimetoprima, para *S. sciuri* apresentou CIM e CMM de $10 \mu\text{g/mL}$; para *E. galinarum* CIM de $0,62 \mu\text{g/mL}$ e $2,5 \mu\text{g/mL}$ e CMM de ≥ 10 . Desta forma, nenhuma bactéria foi sensível ao fármaco (CIM $\leq 0,05 \mu\text{g/mL}$). Estas bactérias estão descritas na Tabela 11:

Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para SjJp

	<i>S. sciuri</i>			<i>E. galinarum</i>		<i>E. galinarum</i>		<i>S. sciuri</i>		<i>Paenibacillus</i>	
	S	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
Cli	$\leq 0,5$	0,62	2,5	≥ 10	≥ 10	≥ 10	≥ 10	1,25	2,5	≥ 10	≥ 10
Dox	≤ 4	$\leq 0,07$	0,31	0,62	≥ 10	1,25	≥ 10	0,15	5	≥ 10	≥ 10
Eri	$\leq 0,5$	0,31	5	1,25	≥ 10	1,25	≥ 10	0,62	5	2,5	≥ 10
Gen	≤ 4	$\leq 0,07$	$\leq 0,07$	5	5	5	≥ 10	$\leq 0,07$	$\leq 0,07$	2,5	5
Lev	$\leq 0,5$	0,15	0,31	2,5	≥ 10	1,25	≥ 10	0,62	0,62	5	5
Sut	$\leq 0,05$	≥ 10	≥ 10	2,5	≥ 10	0,62	≥ 10	≥ 10	≥ 10	≥ 10	≥ 10

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: Concentração em $\mu\text{g/mL}$. Clindamicina (Cli), Doxiciclina (Dox), Levofloxacino (Lev), Gentamicina (Gen), Eritromicina (Eri) e Sulfametoxazol + Trimetoprima (Sut). S - Sensibilidade $\mu\text{g/mL}$.

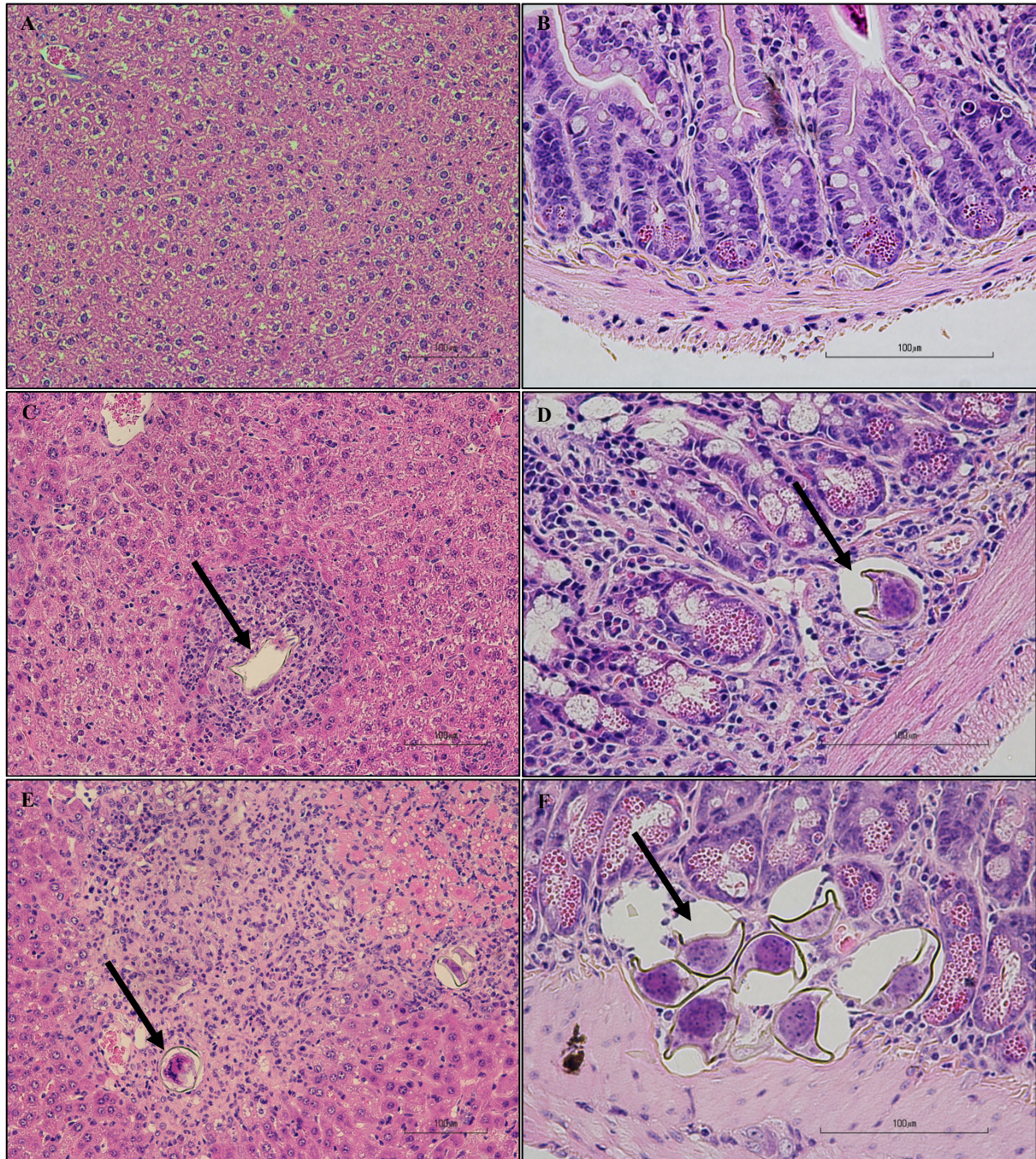
5.3 CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO E INTESTINO

A análise histopatológica do fígado de animais controle indicou a presença de hepatócitos com núcleos celulares eucromáticos e bem definidos. Evidências morfológicas de degeneração hidrópica também foram observadas (Figura 9A). Os fígados dos animais infectados por *S. mansoni* e *S. japonicum* apresentaram maior celularidade intersticial, retenção hepática de ovos do parasito, e a presença de granulomas esquistossomóticos com tamanho variável. A bainha granulomatosa apresentou elevada celularidade, formada pelo acúmulo de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN). As características tintoriais de intensa acidofilia citoplasmática e morfologia nuclear bilobada, indicou predomínio de eosinófilos entre os leucócitos PMN para animais infectados com *S. mansoni* (Figura 9C). E para os animais infectados com *S. japonicum*, predomínio de PMN, principalmente neutrófilos (Figura

9E). Divergências na celularidade e na distribuição de material amorfo na bainha granulomatosa indicou a presença de granulomas em diferentes estágios evolutivos. Assim, grandes granulomas exsudativos-produtivos e granulomas involutivos-fibrócitos mais antigos coexistiram no fígado de animais infectados

A análise histopatológica do intestino indicou que os animais não infectados (Figura 9B) apresentaram criptas intestinais com epitélio bem definido, enterócitos e células caliciformes com morfologia normal, borda estriada evidente, lâmina própria com moderada celularidade principalmente formada por células mononucleares. Perfil citoplasmático vesiculoso também foi identificado na base das criptas intestinais dos animais controle. O intestino de animais infectados por *S. mansoni* (Figura 9D) e *S. japonicum* (Figura 9F) apresentaram criptas intestinais dilatadas com lúmen mal definido, dilatação citoplasmática das células caliciformes. Além disso, foi identificada retenção de ovos do parasito na camada mucosa e aumento da celularidade da lâmina própria, a qual foi constituída por acúmulo de células MN e PMN, com a evidente presença de numerosos eosinófilos.

Figura 9 - Fígado e intestino de camundongos infectados por *S. mansoni* e *S. japonicum* em fase aguda e não infectados corados com Eosina e Hematoxilina.



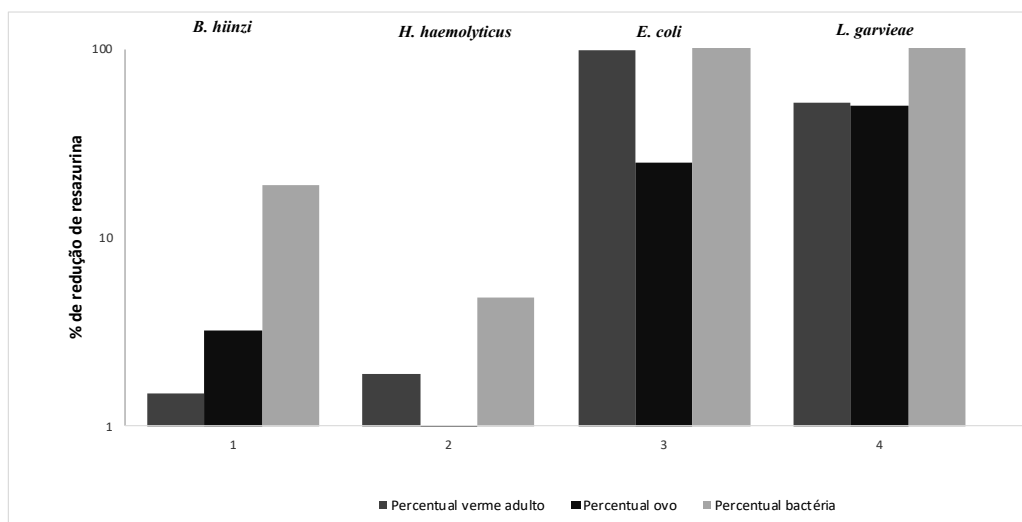
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Legenda: A - Fígado de camundongo do grupo controle sem alterações. Objetiva de 20x. B - Intestino de camundongo do grupo controle. Objetiva de 40x. C - Granuloma hepático do grupo infectado por *S. mansoni*. A seta indica o ovo de *S. mansoni*. Objetiva de 20x. D - Intestino de camundongo do grupo infectado por *S. mansoni*. A seta indica o ovo de *S. mansoni*. Objetiva de 40x. E - Granuloma hepático do grupo infectado por *S. japonicum*. Objetiva de 20x. F - Intestino de camundongo do grupo infectado por *S. japonicum*. A seta indica o ovo de *S. japonicum*. Objetiva de 40x.

5.4 ADESÃO DE BACTÉRIAS

Após a leitura das placas, foi possível observar que para *S. mansoni*, quando comparado ao controle, a porcentagem de variação da redução da resazurina indicando atividade bacteriana devido adesão aos vermes adultos no meio foi de 1,49% para *Bordetella hinzi* e 98,11% para *E. coli*, havendo diferença estatística quando comparado *B. hinzi* com *E. coli* ($p < 0,01$) e *L. garvieae* ($p < 0,05$). Já para os ovos, a variação de adesão bacteriana foi de 0,71% para *H. haemolyticus* e 50,02% para *L. garvieae*, não havendo diferença estatística.

Figura 10 - Porcentagem de redução da resazurina na adesão de bactérias em ovos e vermes adultos de *S. mansoni*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

6 DISCUSSÃO

A esquistossomose ainda é uma doença que afeta milhões de pessoas, apesar de ter tratamento. Negligenciada por ser uma doença de países em desenvolvimento, poucos estudos são desenvolvidos para tratamentos mais eficientes, e cada vez mais os parasitos vem ganhando resistência ao PZQ que ainda é o único fármaco eficiente utilizado para tratamento (LENZI; ROMANHA, 2008; CORRÊA *et al.*, 2019).

Neste contexto, o processo interação patógeno-hospedeiro é complexo, e exige o entendimento de vários fatores. Entre estes fatores, um quesito que vem sendo estudado comparativamente é a composição da microbiota de camundongos saudáveis e não saudáveis, pois pode haver variação de acordo com infecções de diferentes patógenos (JENKINS *et al.*, 2018). O estudo das bactérias do intestino é importante, pois a literatura já mostra que muitas doenças crônicas, tais como diabetes mellitus, arteriosclerose, carcinoma, obesidade, entre outras, estão relacionadas a microbiota intestinal, pois os microrganismos têm um papel fundamental para o sistema imune, no desenvolvimento epitelial e também no metabolismo (VALDES *et al.*, 2018).

A fase aguda da esquistossomose em modelo murino, assim como no homem, também ocorre entre aproximadamente 45 e 60 dias após a infecção dos camundongos pelas cercarias (LENZI *et al.*, 2006). Uma vez iniciado a ovoposição pelas fêmeas, os ovos são depositados no plexo mesentérico inferior do intestino, sendo que uma parte retorna para circulação sanguínea, e outra parte atravessa o intestino, ganhando a luz intestinal que podem ser eliminados com as fezes do hospedeiro (LENZI; ROMANHA, 2008). As espículas laterais do *S. mansoni* auxiliam no processo inflamatório no intestino para a passagem dos ovos perante a barreira de tecido intestinal, para posteriormente serem eliminados. Esta característica não é observada nos ovos de *S. japonicum*, mas o processo inflamatório também ocorre ao redor dos ovos deste parasito devido ao verme que produz substâncias que estimulam o sistema imune do hospedeiro. Com a passagem destes ovos, o carreamento de bactérias pode ocorrer, e assim, a translocação bacteriana. A translocação de bactérias das fezes para outros órgãos é relatada na literatura (KAY *et al.*, 2015; SCHNEEBERGER *et al.*, 2018). Lima *et al.* (2015) mostraram a translocação de bactérias do intestino para os linfonodos, baço e fígado em camundongos infectados com *S. mansoni* pode ocorrer, e uma das espécies encontradas nestes animais estudados foi a *E. coli*. Zhao *et al.* (2019) também estudou a associação entre a microbiota e *S. japonicum*, e mostra que a microbiota do intestino pode ser usada como um potencial

biomarcador para o diagnóstico de uma infecção pelo parasito, sendo possível avaliar a progressão da esquistossomose. A presença destas bactérias em outros órgãos é preocupante devido a própria evolução da esquistossomose, e até mesmo por uma possível resistência destas bactérias frente ao tratamento, e em casos graves, levar a sepse.

Sendo assim, neste trabalho, foi proposto estudar a interação do *S. mansoni* e *S. japonicum* com a microbiota. A partir da análise da composição da microbiota intestinal, as fezes dos camundongos foram coletadas e colocadas em diferentes meios, e observamos que houve crescimento bacteriano nos meios BHI, Bile Esculina, EMB e MRS, mas que não foram observadas diferenças significativas (Figura 5). Uma vez que bactérias do intestino são essenciais para o aproveitamento de nutrientes de alimentos e proteção imunológica (GLENDINNING *et al.*, 2014), era esperado o crescimento à partir das fezes, e isto pode ser observado tanto no grupo CBr e CJp quanto os grupos infectados SmBr, SmJp e SjJp.

A presença de *S. mansoni* e *S. japonicum* no hospedeiro também altera a microbiota intestinal (HOLZSCHEITER *et al.*, 2014; KAY *et al.*, 2015; JENKINS *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019). Os resultados deste trabalho, assim como observado no trabalho de Jenkins (2018), mostraram que houve alteração da composição de bactérias do Filo Bacteroidetes e Firmicutes em camundongos infectados SmBr quando comparados ao grupo CBr. Enquanto Bacteroidetes estão relacionados a uma dieta rica e carboidratos, Firmicutes estão relacionados a uma dieta rica em proteínas e lipídios, e isto vai de encontro com a alimentação típica que varia de acordo a cultura da população residente (SEKIROV *et al.*, 2010; GLENDINNING *et al.*, 2014).

Foi observado neste trabalho que nas fezes houve um aumento de Bacteroidetes e uma diminuição de Firmicutes no grupo infectado SmBr (Figura 6). Consequentemente, houve aumento da família Prevotellaceae (provindos das subdivisões de Bacteroidetes) e diminuição da família Lachnospiraceae (provindos das subdivisões de Firmicutes). A primeira família está relacionada a uma alimentação rica em polissacarose, como celulose e xilanos, sendo que foi observado um aumento no percentual de Bacteroidetes no trabalho de Kay *et al.* (2015) em crianças infectadas por *S. mansoni*, o que pode estar relacionado com a alimentação desta população estudada. Já a segunda família, está relacionada ao processo inflamatório na formação de granulomas (JENKINS *et al.*, 2018). Outro fator a ser considerado é que os animais analisados estavam na fase aguda da esquistossomose, e de acordo com a literatura, em doenças com graves processos inflamatórios ocorre diminuição de Firmicutes (HOLD,

2014; MAJOR; SPILLER, 2014), sendo assim, o processo inflamatório decorrente dos ovos do parasito também podem influenciar na diminuição deste Filo na microbiota residente encontrada nas fezes.

Outros grupos de bactérias são relatadas na literatura, tais como filo Proteobacteria. No trabalho de Jenkins *et al.* (2018), este filo está em terceiro lugar após Bacteroidetes e Firmicutes tanto nos grupos CBr quanto no grupo infectado SmBr. Dentre os gêneros mais importantes dentro do Filo Proteobacteria, estão os patogênicos *Escherichia e Salmonella*, que podem ser preocupantes em um processo de sepse devido cepas resistentes e formação de biofilme que levam a tratamentos onerosos (O'NEILL, 2016). Em nosso trabalho, observou-se diminuição de Proteobacterias nas fezes (1,5% no grupo CBr para 0,7% no grupo SmBr) (Figura 6), porém, observou-se este aumento no fígado (de 1,4% até 40,3%) (Figura 8). O aumento do Filo Proteobacteria está relacionado a desequilíbrio da microbiota intestinal (SHIN; WHON, BAE, 2015), que podem levar a inúmeros problemas de saúde devido esta alteração.

Esta diversidade de filos encontrada na literatura, em que Jenkins *et al.* (2018) e Zhao *et al.* (2019) mostram que Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacterias são os filos mais encontradas nas fezes de camundongos infectados com *S. mansoni*, também é relatada por Ajibola *et al.* (2018), porém o aumento de Proteobacterias nas fezes foi um pouco mais acentuado que Bacteroidetes. Esta diversidade pode estar relacionada ao desenvolvimento da doença, e pela espécie de *Schistosoma* estudada, uma vez que o primeiro trabalho foi desenvolvido com *S. mansoni*, o segundo com *S. japonicum* e o último, com *S. haematobium*, sendo que a fêmea desta espécie lança seus ovos junto a urina, e não nas fezes, tais como as duas primeiras espécies (AJIBOLA, 2018; ZHAO *et al.*, 2019). Em nosso trabalho, observamos uma diversidade de espécies bacteriana no fígado dos animais estudados mantidos sob mesmas condições, e uma vez que a diversidade de filos pode ocorrer nas fezes, supõe-se que havendo passagem de bactérias nas fezes para outros órgãos, essa possa acontecer de maneira aleatória. Outro fator deve ser levado em consideração quanto se propõe analisar a microbiota é o modelo animal a ser utilizado. Jenkins *et al.* (2018) utilizou camundongos *Swiss* para analisar a diversidade da microbiota intestinal na infecção com *S. mansoni*, enquanto em nosso trabalho utilizamos camundongos BALB/c, sendo mais um fator para que a microbiota não apresente o mesmo padrão já relatado. E em relação a análise da microbiota no fígado, não há relatos de literatura que analisaram este órgão.

O processo de translocação ocorre devido a alguns fatores, tais como o aumento

de crescimento de bactérias, o sistema imune do hospedeiro debilitado, e aumento da permeabilidade da mucosa intestinal (BERG, 1995; HOLZSCHEITER *et al.*, 2014), sendo que o intestino também apresenta microbiota comensal que em homeostasia com o hospedeiro não provoca doenças (SEKIROV *et al.*, 2010). Porém, em desequilíbrio ou processos patológicos, a passagem destas bactérias pode ocorrer para outros locais do organismo.

No presente trabalho, analisando os fígados de camundongos infectados e não infectados por *S. mansoni* e *S. japonicum*, foi observado que nos grupos CBr e CJp não houve crescimento bacteriano, enquanto foi observado presença de bactérias nos fígados dos animais infectados dos grupos SmBr, SmJp e SjJp. As bactérias do fígado foram cultivadas em meio BHI, Bile Esculina, EMB e MRS, porém não foram observadas diferenças significativas em relação ao crescimento destes microrganismos (Tabela 3).

Após crescimento e isolamento das bactérias nestes meios, 4 espécies de bactérias foram identificadas no fígado por MALDI-TOF (Tabela 7) para o grupo SmBr: *Bordetella hinzi*, *Haemophilus haemolyticus*, *Escherichia coli* que são pertencentes ao Filo Proteobacteria e *Lactococcus garvieae*, pertencente ao Filo Firmicutes; para SmJp, 2 espécies: *Staphylococcus nepalensis* e *Staphylococcus sciuri*, ambos do filo Firmicutes; e SjJp com três espécies: *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus galinarum* e *Paenibacillus* também do filo Firmicutes, sugerindo que, assim como nas fezes, também houve um desequilíbrio da microbiota intestinal nos animais de nosso estudo. *Bordetella hinzi* já foi encontrada em camundongos de estudo em laboratórios (HAYASHIMOTO *et al.*, 2008), sendo considerada uma bactéria oportunista patogênica. Outras bactérias são relatadas por translocação, tais como do gênero *Salmonella* (LIMA *et al.*, 2012), mostrando que estas bactérias podem se associar ao parasito e prolongar as infecções. *Haemophilus haemolyticus* e *Staphylococcus nepalensis* já foram encontradas no pulmão devido infecções respiratórias e também relacionados a fibrose pulmonar (NORSKOV-LAURITSEN, 2014; D'ALESSANDRO-GABAZZA *et al.*, 2020). *Staphylococcus sciuri* já foi relatado em peritonite após isolada de um paciente (MESERVEY *et al.*, 2020), e *Paenicillus*, em que já há relato de espécies isoladas à partir da microbiota intestinal de crianças (TIDJANI ALOU *et al.*, 2017)

O *S. mansoni* e *S. japonicum* apresentam em seu ciclo de vida no hospedeiro definitivo, passagem pelo pulmão e o coração antes de sua chegada ao fígado (LENZI *et al.*, 2006). Esta passagem dos parasitos pelo pulmão dos animais de nosso estudo pode ser a razão de haver este tipo de bactéria carregada até o fígado, mesmo que não haja

manifestação de doença para esta bactéria, uma vez que esta pode ser comensal junto ao animal que a alberga (NORSKOV-LAURITSEN, 2014).

Para *E. coli*, em estudo relatado no Egito, a esquistossomose apresentou-se junto a febre prolongada, pois houve infecção junto a esta bactéria (FARID, TRABOLSI, HAFEZ, 1984). Sendo muito encontrada no trato gastrointestinal, o estudo com *E. coli* mostra-se importante, pois é fonte de contaminação comum em diversos locais. As enterobactérias são relatadas na literatura associadas à esquistossomose (MUNIZ-JUNQUEIRA; TOSTA; PRATA, 2009). Este resultado nos leva a crer que a houve passagem de bactérias do intestino para outros locais, uma vez que *E. coli* foi encontrada no fígado (HOLZSCHEITER *et al.*, 2014; JENKINS *et al.*, 2018), além de outros trabalhos, tais como o de Schneeberger *et al.* (2018) já terem relatado o aumento do filo Proteobacteria em pessoas infectadas esquistossomose, sendo *E. coli* pertencente a este filo, e esta já relatada ser encontrada em fígado de camundongos infectados com esquistossomose (LIMA, 2015). *Lactococcus garvieae* e *Enterococcus galinarum* já foram relacionadas a endocardite (HIRAKAWA, *et al.*, 2011), porém apresenta baixa virulência, e já com casos relatados em idosos (CHOKSI; DADANI, 2017; DIAS *et al.*, 2019).

Com bactérias associadas ao parasito, o tratamento contra estas infecções pode tornar-se mais difícil. Neste trabalho, a resistência ou sensibilidade aos antibióticos foi analisada para 8 espécies de bactérias isoladas a partir do fígado. As bactérias analisadas para SmBr foram resistentes a Clindamicina (Tabela 8), pois este antibiótico não é indicado para tratamento de infecções do trato gastrointestinal (FALAGAS; GORBACH, 1995; LAMONT *et al.*, 2011; CLSI, 2016; PPAKONSTANTINOU *et al.*, 2018). Em relação aos outros antibióticos, Gentamicina apresentou o melhor resultado em relação a sensibilidade para todos os grupos infectados com esquistossomose, Concentração Inibitória Mínima e Concentração Microbicida Mínima contra as bactérias (Tabelas 9 a 11) e é um medicamento já usado na terapêutica de problemas relacionados a infecções intestinais (HAYWARD, *et al.*, 2018).

Neste processo de desenvolvimento da esquistossomose e translocação, além deste carreamento para outros órgãos, em uma associação com *S. mansoni* e *S. japonicum*, bactérias poderiam se associar ao parasito que poderia dificultar o tratamento de ambas as infecções. A associação de salmonelas e *S. mansoni* (MUNIZ-JUNQUEIRA; TOSTA; PRATA, 2009; BARNHILL, 2011), mostra que o tratamento deve ser diferenciado, pois se a esquistossomose não é tratada, a salmonelose pode ser mais resistente,

principalmente na doença hepatoesplênica. Para *S. japonicum*, já foi demonstrado que uma associação de *S. typhimurium* modifica a resposta imunológica para esquistossomose, normalmente polarizada Th2, mas quando associada, mudando para Th1, provavelmente estimulada pela infecção adicional pela bactéria (ZHU *et al.*, 2017). Além disto, associado a *Salmonella*, o parasito adulto poderia ajudar a bactéria a ter resistência a tratamentos com antibióticos devido a proteínas fimbriais que confeririam esta proteção (BARNHILL, 2011). O aumento de Proteobacteria no fígado também foi observada em nosso trabalho, o que sugere que bactérias deste filo de alguma forma estão sendo carregadas até este órgão.

Embora possamos descrever adequadamente a enorme diversidade da microbiota humana, o papel da maioria das espécies bacterianas na saúde e nas doenças permanece amplamente desconhecido. Evidências experimentais dos últimos anos destacam um papel fundamental para a microbiota intestinal nas doenças inflamatórias e infecciosas gastrointestinais. Para esta proposta, foi estabelecida uma análise quantitativa do conteúdo bacteriano em amostras fecais utilizando o gene 16S rRNA, em que outros trabalhos tentam entender a associação de parasitos e microbiota (KAY *et al.*, 2015; JENKINS *et al.*, 2018). Nosso estudo revelou variações significativas na microbiota do intestino e do fígado entre os grupos experimentais.

Os resultados na PCR (Figura 7) também demonstraram que a composição microbiana das fezes foi significativamente diferente nos grupos controle e infectado. Quando comparado o grupo CBr e SmBr, as Bactérias Totais foram mais presentes na amostra com *S. mansoni*. Além disto, foi encontrado abundância de Bacteroidetes quando em SmBr, assim como também houve diminuição para Firmicutes para o mesmo grupo, estando de acordo com o que foi encontrado no sequenciamento. Curiosamente, vários autores têm demonstrado diferentes comportamentos quanto à abundância Bacteroidetes e Firmicutes e em doenças infecciosas. No estudo de Ajibola *et al.* (2019), ambos são filos dominantes no ambiente intestinal, e no estudo de Schneeberger *et al.* (2018), a abundância de Firmicutes foi observada no grupo controle. No processo de identificação, bactérias não cultiváveis podem ter seu crescimento prejudicado, ou problemas durante alguma etapa analítica de amostra podem dificultar a identificação, e dependendo da metodologia utilizada poderia justificar o encontro diferenciado destas bactérias (BLAINEY, 2013).

Cortes histológicos de fígado e intestino foram analisados (Figura 9). Sendo o intestino o local de possível início de translocação bacteriana, granulomas esquistossomóticos foram observados neste órgão e também no fígado dos animais

infectados. Assim, muitas das bactérias identificadas no fígado em nosso estudo podem ter sido trazidas junto aos ovos ou vermes adultos, uma vez que também foi verificado este processo de adesão de bactérias isoladamente. Um trabalho envolvendo *Mycobacterium tuberculosis* e *S. mansoni* em modelo animal mostrou que as infecções bacterianas foram mais intensas, e os hospedeiros infectados isoladamente tiveram menor mortalidade, havendo uma hipótese que a infecção por *S. mansoni* prejudica a resposta Th1 voltada para bactérias, o que aumentou a mortalidade para os animais que estavam com as duas infecções (ELIAS *et al.*, 2005). Uma vez observado em nosso trabalho granulomas com células PMN e MN, a infecção ocorreu de forma a favorecer o processo inflamatório, e supõe-se que o desenvolvimento da infecção no intestino favoreceu a translocação de bactérias para o fígado dos animais infectados.

Pelo resultado de redução da resazurina, a adesão das bactérias foi analisada em vermes adultos e ovos (Figura 10), e as espécies *E. coli* e *L. gaviae* apresentaram maior adesão ao parasito e ovos. As interações eletrostáticas e hidrofóbicas estão relacionadas ao processo de adesão das bactérias em superfícies, assim como outras interações químicas (TILAHUN *et al.*, 2016), e *S. mansoni* apresenta 28 proteínas em seu tegumento, podendo ser estruturais, transportadoras e enzimas de membrana (BRASCHI, WILSON, 2006). Estas proteínas podem estar relacionadas ao processo de adesão destas bactérias, uma vez que apresentam regiões hidrofóbicas que poderiam facilitar a adesão de bactérias (TILAHUN *et al.*, 2016). Visto que em nosso trabalho foi observado a adesão de bactérias aos ovos e parasitos, pode-se sugerir que está havendo uma associação no organismo dos animais infectados, facilitando a passagem de bactérias da microbiota do intestino para outros locais do organismo.

7 CONCLUSÃO

Há uma diferença nos Filos que compõe a microbiota intestinal quando se compara animais CBr (Firmicutes em maior quantidade que Bacteroidetes) com animais infectados SmBr (Bacteroidetes em maior quantidade que Firmicutes). Esta diferença foi possível ser observada por meio da PCR, pois a quantidade de bactérias do Filo Bacteroidetes nas fezes do grupo SmBr é maior que no grupo CBr. Similarmente, houve uma diminuição da quantidade de bactérias do filo Firmicutes no grupo SmBr, quando analisados pela metagenômica.

Há evidências de que pode ocorrer a passagem de bactérias do intestino para outros órgãos, visto que estas também foram identificadas no fígado de animais infectados SmBr, SmJp e SJJp, e que não foram identificadas bactérias no fígado dos grupos CBr e CJp. As espécies identificadas de bactérias foram diferentes, conforme a espécie de *Schistosoma*, bem como cepas de *S. mansoni*, o que mostra que microbiota varia dependendo de condições multifatoriais.

Uma vez analisados a sensibilidade destas bactérias frente a antibióticos, o uso de mais de um medicamento pode ser utilizado em casos mais graves. Em casos de associação de ambas infecções, deve haver atenção dobrada para se alcançar melhor eficácia no tratamento.

Foi possível verificar através de cortes histológicos o desenvolvimento da esquistossomose desde o intestino chegando ao fígado, pela presença de ovos dos parasitos e o processo inflamatório decorrente da reação granulomatosa. Tendo em vista a identificação de bactérias no fígado, nos leva a supor que uma alteração da microbiota ocorreu nos animais infectados e que estas bactérias podem estar participando deste processo inflamatório.

Em experimentos isolados, foi possível mostrar que a adesão de bactérias ocorre na superfície de vermes adultos e ovos, podendo este ser o caminho de chegada até o fígado e outros órgãos do organismo, através da translocação bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, p. 473–493, 2019.
- AHMED, I. *et al.* Microbiome, metabolome and inflammatory bowel disease. **Microorganisms**, v. 4, n. 2, p. 20, 2016.
- AJIBOLA, O. *et al.* Urogenital schistosomiasis is associated with signatures of microbiome dysbiosis in Nigerian adolescents. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 829, 2019.
- ANDERSEN, L. O. *et al.* A retrospective metagenomic approach to studying Blastocystis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, 2015.
- ANDERSSON, A. F. *et al.* Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. **PLoSOne**, v. 3, n. 7, 2008.
- ANDRADE, Z. A. A patologia da esquistossomose humana. *In*: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, p. 576-608.
- ARAÚJO, M. P. *et al.* Impact of *Paracoccidioides brasiliensis* coinfection on the evolution of *Schistosoma mansoni*- induced granulomatous liver injury in mice. **BioMed Research International**, p. 1–12, 2019.
- ARULEBA, R. T. *et al.* PZQ therapy: how close are we in the development of effective alternative anti-*Schistosomal* drugs? **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 19, 31 Dec. 2018.
- ARRIETA, M. C. *et al.* The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Frontiers Immunology**, v. 5, p. 427, 2014.
- ATARASHI, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. **Science**, v. 331, n. 6015, p. 337-41, 2011.
- BARNHILL, A. E. *et al.* *Schistosoma*-associated *Salmonella* resist antibiotics via specific fimbrial attachments to the flatworm. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 123, 2011.
- BERG, R. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 149–154, 1995.
- BELKAID, Y.; HARRISON, O. J. Homeostatic immunity and the microbiota. **Immunity**, v. 46, p. 562-576, 2017.

BIK, E. M. *et al.* Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 732-7, 2006.

BOUSKRA, D. *et al.* Lymphoid tissue genesis induced by commensals through nod1 regulates intestinal homeostasis. **Nature**, v. 456, p. 507, 2008.

BLAINEY, P. C. The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 407–427, 2013.

BRASCHI, S.; WILSON, R. A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Molecular & Cellular Proteomic**, v. 5, p. 347–356, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em saúde**. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde : volume 3**. 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CHIODINI, P. L. Chemotherapy for patients with multiple parasitic infections. **Parasitology**, v. 83, p. 122, e. 9, 2001.

CHOKSI, T. T.; DADANI, F. Reviewing the emergence of *Lactococcus garvieae* : a case of catheter associated urinary tract infection caused by *Lactococcus garvieae* and *Escherichia coli* coinfection. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2017, p. 1–4, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 26th ed. Wayne, 2015. CLSI supplement M100S.

CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of aerobic bacteria. Approved Standard**. 10th ed. M07-A10. Wayne, 2015.

COLE, J. R. *et al.* The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, 2009.

COLLEY, D. G. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet**, London, v. 383, n. 9936, p. 2253–64, 2014.

COUTO, F. F. *et al.* *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 153–157, 2011.

CORRÊA *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of six artemisinin derivatives against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, Jan. 2019.

COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood Journal**, v. 112, n. 4, p. 935-45, 2008.

D’ALESSANDRO-GABAZZA, C. N. *et al.* A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1539, Dec. 2020.

DHILLON, R.; CLARK, J. Infection in the intensive care unit (ICU). **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 20, e. 4, p. 175-182, 2009.

DIAS, M. T. A. *et al.* *Enterococcus gallinarum* causing native valve endocarditis. **European Journal of Case Reports in Internal Medicine**, v. 6, n. 3, p. 1, Mar. 2019.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

ELIAS, D. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 23, p. 1326-1334, 2005.

EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

FALAGAS, M. E.; GORBACH, S. L. Clindamycin and metronidazole. **Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 845–867, 1995.

FARID, Z.; TRABOLSI, B.; HAFEZ, A. *Escherichia coli* bacteraemia in chronic schistosomiasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 78, p. 661-662, 1984.

FILHO-LIMA, J. V.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations

against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. **Applied Microbiology**, v. 88, p. 365–370, 2000.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 453-464, 2017.

FOULONGNE, V. *et al.* Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. **PLoS ONE**, v. 7, n. 38499, 2012.

GARCIA, E. K. I. **Doses de agentes para ratos**. Alfenas: UNIFAL-MG, 2016. Disponível em: <http://www.unifal-mg.edu.br/ceua/system/files/imce/pdfs/RecomendacoesRTMV/Tabela-de-doses-UNIFAL-atualizado-06-07-2016.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2021.

GLENDINNING, L. *et al.* The microbiota and helminths: sharing the same niche in the human host. **Parasitology**, v. 141, n. 10, p. 1255–1271, 2014.

GOODRICH, J. K. *et al.* Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 532-536, 2016.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The human microbiome: our second genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 13, p. 151–170, 2012.

GROLL, E. Praziquantel. **Advances in Pharmacology and Chemotherapy**, v. 20, p. 219-238, 1984.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512–519, 2003.

HAYWARD, R. S. *et al.* Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 223–238, 2018.

HAYASHIMOTO, N. *et al.* Study of a *Bordetella hinzii* isolate from a laboratory mouse. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 5, p. 440–446, 2008.

HIRAKAWA, T. F. *et al.* Endocardite por *Lactococcus garvieae*: primeiro relato de caso da América Latina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, n. 5, p. e108–e110, Nov. 2011.

HOLD, G. L. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 5, p. 1192, 2014.

- HOLLISTER, E. B.; GAO, C.; VERSALOVIC, J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1449-1458, 2014.
- HOLZSCHEITER, M. *et al.* Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 175, n. 2, p. 246–257, 2014.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science**, v. 336, 2012.
- HOULDEN, A. *et al.* Chronic *Trichuris muris* infection in C57BL/6 mice causes significant changes in host microbiota and metabolome: effects reversed by pathogen clearance. **PLoS ONE**, v. 10, n. 0125945, 2015.
- HSIAO, A. Interaction between *Salmonella* and Schistosomiasis: A Review. **PLoS Pathology**, v. 12 e.1 2, p. e1005928, 2016.
- HUDAULT, S.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germ-free mice against *Salmonella typhimurium* infection. **Gut**, v. 49, p. 47-55, 2001.
- HUTTENHOWER, C. *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2014.
- ILLIANO, P.; BRAMBILLA, R.; PAROLINI, C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. **FEBS J**, v. 287, p. 833–855, 2020.
- IVANOV, I. I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, p. 485-498, 2009.
- JENKINS, T. P. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12072, 2018.
- KADOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar Analysis of use and bacterial resistance to antimicrobial in level hospital. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 2, p. 128-135, 2012.
- KATZ, N. **Inquérito nacional de prevalência da Esquistossomose mansoni e geohelmintos**. Belo Horizonte: CPqRR, 2018. 76 p. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662>. Acesso em: 12 jan. 2021.

- KAU, A. L. *et al.* Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. **Nature**, v. 15, n. 474(7351), p. 327-336, 2011.
- MOHR, K. I. History of antibiotics. **Research Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 398, p. 237-272, 2016.
- KAY, G. L. *et al.* Differences in the Faecal Microbiome in *Schistosoma haematobium* Infected Children vs. Uninfected Children. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003861, June 2015.
- KEBBI-BEGHDADI, C.; GREUB, L. Importance of amoebae as a tool to isolate amoeba-resisting microorganisms and for their ecology and evolution: the *Chlamydia* paradigm. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 4, p. 309-324, 2014.
- KELLY, P. H. *et al.* The GutMicrobiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* é essencial para a sobrevivência de *Leishmania infantum*. **mBio** , v. 8, n. 1, p. 01121-16, 2017.
- KIM, S.; JAZWINSKI, S. M. The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 64, p. 513-520, 2018.
- KOSTIC, A. D.; HOWITT, M. R.; GARRETT, W. S. Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans. **Genes & Development**, v. 27, p. 701–718, 2013.
- KOTLOFF, K. L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382 , n. 9888, p. 209-222, 2013.
- LANZA, V. F. *et al.* The plasmidome of firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to zntimicrobials. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, Apr. 2015.
- LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 105, n. 4, p. 422–435, July 2010.
- LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Invited review pyogenic abscesses and parasitic diseases. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 43, e. 2, p. 67-74, 2001.
- LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Schistosomiasis and associated infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 135-139, 1998.
- LAMONT, R. F. *et al.* Treatment of abnormal vaginal flora in early pregnancy with clindamycin for the prevention of spontaneous preterm birth: a systematic review and metaanalysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 205, n. 3, p. 177–190, 2011.

LENZI, H. L., *et al.* Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, e. 1, p. 219-231, 2006.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S. *Schistosoma* granuloma is like a small multicelular organism that operates as a complex system. *In*: CARVALHO, O. S.; COELHO; P. M. Z.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. Cap. 19.

LIMA, K. M. *et al.* Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica. **Acta Gastroenterol Latino**, v. 42, n. 4, p. 309–320, 2012.

LIMA, K. *et al.* Post-splenectomy infections in chronic schistosomiasis as a consequence of bacterial translocation. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 314–320, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, Dec. 2001.

MAIA, L. F.; OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

MAJOR, G.; SPILLER, R. Irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and the microbiome. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, v. 21, n. 1, p. 15–21, 2014.

MATHERS, C. D.; BOERMA, T.; MA FAT, D. Global and regional causes of death. **British Medical Bulletin**, v. 92, p. 7–32, 2009.

MAZIGO, H. D. *et al.* Co-infections with *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni* and intestinal helminths among schoolchildren in endemic areas of Northwestern Tanzania. **Parasites Vectors**, v. 3, p. 44, 2010.

MCGUCKIN, M. A. *et al.* Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 265-278, 2011.

MCGUIRE, A. L. *et al.* Ethical, legal, and social considerations in conducting the Human Microbiome Project. **Genome Research**, v. 18, n. 12, p. 1861–1864, 2008.

MESERVEY, A. *et al.* *Staphylococcus sciuri* peritonitis in a patient on peritoneal dialysis. **Zoonoses and Public Health**, v. 67, n. 1, p. 93–95, Feb. 2020.

- MOTA, L. M. *et al.*, Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 2, 2010.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. *et al.* Antibody response to *Salmonella typhi* in human *Schistosomiasis mansoni*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 29, n. 5, 1996.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; TOSTA, C. E.; PRATA, A. Salmonelose septicêmica prolongada associada à esquistossomose: evolução do conhecimento e mecanismos imunopatogênicos. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 436-445. 2009.
- NARE, B.; SMITH, J. M.; PRICHARD, R. K. Mechanisms of inactivation of *Schistosoma mansoni* and mammalian glutathione S-transferase activity by the anti *Schistosomal* drug oltipraz. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, p. 1345-1351, 1992.
- NORSKOV-LAURITSEN, N. Classification, identification, and clinical significance of *haemophilus* and *aggregatibacter* species with host specificity for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 214–240, 2014.
- O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.
- OLIVEIRA, M. M. E. *et al.* Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the sporothrix species complex. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102–110, 2015.
- OLLIARO, P. L. *et al.* A Multicentre Randomized Controlled Trial of the Efficacy and Safety of Single-Dose Praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for Treating Intestinal Schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1165, 2011.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review of antimicrobial resistance**. London: HM Government and Wellcome trust, 2016.
- PALMER C. *et al.* Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 177, 2007.
- PAPAKONSTANTINO, E. *et al.* Generalized reactions during skin testing with clindamycin in drug hypersensitivity: a report of 3 cases and review of the literature. **Contact Dermatitis**, v. 78, n. 4, p. 274–280, 2018.
- PEARCE, E. J. *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production of Th2 responses to a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 159-166, 1991.

PEDERSEN, A. B.; FENTON, A. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 9, p. 133, 2007.

PELLEGRINO J.; KATZ N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 233-90, 1968.

PÉREZ, P. F. *et al.* Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacilli*: an *in vitro* study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5037–5042, 2001.

PORDEUS, L. C., *et al.* A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n. 3, p. 163-75, 2008.

PYLRO, V. S. *et al.* Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, Dec. 2014.

RABIZADEH, S.; SEARS, C. New horizons for the infectious diseases specialist: how gut microflora promote health and disease. **Current Infectious Disease Reports**, v.10, n. 2, p. 92-8, 2008.

RAKOFF-NAHOUM; S.; MEDZHITOV, R. Role of the innate immune system and host-commensal mutualism. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 308, p. 1-18, 2006.

ROCHA, A. E. P. *et al.* Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 178, p. 21–29, July 2017.

ROGNES, T. *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, Oct. 2016.

ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**. v. 16, p. 341–352, 2016.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 107, n. 27, p. 12204-9, 2010.

RUSSELL, S. L. *et al.* Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. **EMBO Reports**, v. 13, p. 440, 2012.

SABIN, E. A. *et al.* Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, e. 1, p. 269-272, 1996.

SCHMITZ-ESSER, S. *et al.* Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental *Acanthamoeba* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74 n. 18, p. 5822-5831, 2008.

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

SERIKOV, I. *et al.* Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859–904, 2010.

SHIN, N.-R.; WHON, T. W.; BAE, J. W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496–503, 2015.

SILVA, A.; SANTANA, L. B.; JESUS, A. R., A Resposta imune na forma aguda da Esquistossomose Mansonii. *In*: CARVALHO, O. S; COELHO; P. M. Z; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008.

SMITH, K.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 59-69, 2007.

SONNENBURG, J. L.; ANGENENT, L. T.; GORDON, J. I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? **Natural Immunology**, v. 5, p. 569–573, 2004.

SOUZA, A. L. R. **Avaliação do efeito do praziquantel veiculado em dispersões lipídicas no tratamento de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni***. 2008.79 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Escola de Farmácia, UNESP, Araraquara, 2008.

STIEFEL, P. *et al.* A simple and rapid method for optical visualization and quantification of bacteria on textiles. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 39635, 2016.

STODDART, B.; WILCOX, M. H. Pathology of drug-associated gastrointestinal disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, p. 513-518, 2002.

SUAU, A. *et al.* Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4799-4807, 1999.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2: ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

TAYLOR, M. J. *et al.* 16S rDNA phylogeny and ultrastructural characterization of *Wolbachia* intracellular bacteria of the fi arial nematodes *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Wuchereria bancrofti*. **Experimental Parasitology**. v. 91, p. 356–361, 1999.

THÉTIOT-LAURENT, S. A-L. *et al.* Schistosomiasis Chemotherapy. **Angewandte Chemie**, v. 52, p. 7936–7956, 2013.

THOMAS, C. M. *et al.* Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. **PLoS One**, v. 7 n. 2, 2012.

TIDJANI ALOU, M. *et al.* *Paenibacillus phocaensis* sp. nov., isolated from the gut microbiota of a healthy infant. **New Microbes and New Infections**, v. 16, p. 13–24, Mar. 2017.

TILAHUN, A. *et al.* Review on Biofilm and Microbial Adhesion. **International Journal of Microbiological Research**, v. 7 n. 3, p. 63-73, 2016.

TUDDENHAM, S.; SEARS, C. L. The intestinal microbiome and health. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, p. 464-70, 2015.

TURNBAUG.H, P. J. *et al.* The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. **Nature**, v. 18, n. 449(7164), p. 804–810, 2007.

URSELL, L. K *et al.* The Intestinal Metabolome - an Intersection Between Microbiota and Host. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1470–1476, 2014.

VALE, N. *et al.* Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, 2017.

VALDES, A. M. *et al.* Role of the gut microbiota in nutrition and health. **BMJ**, v. k2179, 2018.

VERMA, A. K., *et al.* Real-time analysis of gut flora in *Entamoeba histolytica* infected patients of Northern India. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 12, p.183, 2012.

VIAUD, S. *et al.* The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 971-976, 2013.

VILLARINO, N. F. *et al.* Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A**, v. 113, n. 8, p. 2235-2240, 2016.

VITORINO, R. R. *et al.* Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

WALK, S. T. *et al.* Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth *Heligmosomoides polygyrus*. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, p. 1841-1849, 2010.

WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y.-S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1871–1877, 2012.

WANG, X. *et al.* *In vitro* utilization of amylopectin and high-amylose maize (Amylomaize) starch granules by human colonic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4848-54, 1999.

WEXLER, H. M. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 593–621, Oct. 2007.

World Health Organization. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana.**

Genebra, 2012. Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf?ua=

Acesso em: 12 jan. 2021.

World Health Organization. **Plan on Antimicrobial Resistance.** Genebra, 2016a.

Disponível em: [http://www.globalhealthdynamics.co.uk/wp-](http://www.globalhealthdynamics.co.uk/wp-content/uploads/2015/06/AMR2015-June-3.pdf)

[content/uploads/2015/06/AMR2015-June-3.pdf](http://www.globalhealthdynamics.co.uk/wp-content/uploads/2015/06/AMR2015-June-3.pdf). Acesso em: 12 jan. 2021.

World Health Organization. **Schistosomiasis.** Genebra, 2020. Disponível em:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 12 jan.

2021.

World Health Organization. Weekly epidemiological record. **Schistosomiasis and soil transmitted helminthiases: number of people treated in 2015.** Genebra, 2016b.

Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/251908/1/WER9149_50.pdf?ua=1. Acesso em:

12 jan. 2021.

World Health Organization. **Status of the health-related SDGs.** World Health

Statistics, Genebra, 2017.

WILLIAMS, M. R. Antimicrobial resistance in the environment. **Water Environment Research**, v. 88, n. 10, 2016.

WILLING, B. P.; RUSSELL, S. L.; FINLAY, B. B. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. **Nature Reviews**, v. 9, p. 233-243, 2011.

WU, S. *et al.* Worm burden-dependent disruption of the porcine colon microbiota by *Trichuris suis* infection. **PLoS One**, v. 7, n. 35470, 2012.

YANG, L. *et al.* Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome. **Gastroenterology**, v. 137, n. 2, p. 588-97, 2009.

ZHAO, Y. *et al.* Alterations of the mice Gut microbiome via *Schistosoma japonicum* ova-Induced granuloma. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

ZHU, X. *et al.* *Salmonella typhimurium* Infection Reduces *Schistosoma japonicum* Worm Burden in Mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1349, Dec. 2017.

ZOETENDAL, E. G. *et al.* Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 2, p. 465–472, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Carta do Comitê de Ética – UNIFAL-MG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG, CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise da composição da microbiota de camundongos com a forma aguda da esquistossomose e influência a resposta da antibioticoterapia", registrada com o nº 04/2018, sob a responsabilidade de Marcos José Marques, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 13/04/2018 a 31/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/C / isogênico
Nº de animais	62
Sexo	Fêmeas
Origem	Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ

Alfenas, 13 de Abril de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG

ANEXO B – Carta do Comitê de Ética – DOKKYO



*Laboratory Animal Research Center,
Dokkyo Medical University
880 Kita-Kobayashi, Mibu,
Shimotsuga-Gun, Tochigi, 321-0293, Japan
Tel : 81-282-87-2137
Fax: 81-282-86-2377*

CERTIFICATE

DATE: Oct 10th, 2019

Name in Full Matheus Pereira de Araújo

This is to certify that Dr Araújo took a predetermined lecture in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals in Dokkyo Medical University. And the Animal Care and Use Committee in Dokkyo Medical University issue the following researcher registration number.

Registration number : 19 – 991

You should fill out this registration number into your protocol document. You are not allowed to carry out your animal experiment without this registration number. This registration number won't be changed as long as you belong to the Dokkyo Medical University. You must take a lecture for re-registration every 2 years.

*Shuichi Ueda, DM, PhD.
Chairperson, Animal Care and Use Committee,
Dokkyo Medical University*

ANEXO C – Resumo do projeto desenvolvido no Japão –
Molecular Studies for Pathogen Detection

Abstract

Schistosomiasis, the disease caused by the blood flukes *Schistosoma* spp., still affects millions of people around the world. *Schistosoma mansoni* is endemic in Africa, the Middle East, Central and South America including Brazil and *Schistosoma japonicum* in Asia. Blood flukes mainly affect the hepatic portal system and depends on the snail, the intermediate host, to complete its life cycle and spreading the disease. Schistosomiasis is considered a neglected disease and few studies are developed for new types of identification or treatments. In this way, the objective of this study was to use molecular techniques for environmental detection of the parasite and intermediate host; and study the relationship host-parasite and the interaction host-microbiome-parasite using genomic and proteomic methodologies in the mouse/*Schistosoma* spp. model. This project was approved by mutual agreement by Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) of Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Department of Tropical Medicine and Parasitology of Dokkyo Medical University (DMU). The first part was the use of molecular techniques in helminthology (Polymerase Chain Reaction - PCR, Real-Time PCR, cloning, and sequence analysis), for studies on environmental DNA from Brazilian samples and developmental stages specific-genes of *Schistosoma* spp. In the second part, a review and update activities in parasitological diagnosis, *Schistosoma* spp. proteomics and metagenomics were developed, using the animal model for studies on schistosomiasis with the maintenance of cycle in mouse/snail for cultivation *in vitro*. For the understanding of the interaction between the parasite and the host, it was used the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) for proteomic characterization of *S. mansoni* and *S. japonicum*. For the last, tests *in vitro* on drug resistance and the use of Next Generation Sequencing (NGS) for the characterization of the microbiota in *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* infection by metagenomic analysis. The tools used for the research of environmental DNA were useful for the study of samples coming from the southeast of Brazil, showing that from 18 water samples from 5 municipalities, *B. glabrata* and *S. mansoni* DNA was found in 4 and 10 collection points, respectively, and the DNA of both was found in three municipalities (article being finalized). The proteomics test showed differences from *S. mansoni* and *S. japonicum*, with the presence of more bacteria isolated from the first parasite. The drug resistance test and metagenomic are being finalized and further results will be analyzed. Concluding, these results are important for publications that are fundamental for the expertise in the field of environmental detection and the host-pathogen interaction. Given the importance of infections by *Schistosoma* spp. and the lack of options for new treatments, this study contributed to an attempt to reduce the morbidity and mortality caused by helminth and the possibility of a new form for detecting and tracking the intermediate host and parasite from schistosomiasis.

ANEXO D – Artigo em correção de Inglês

Manuscript Number

Article Summary Line: Environmental DNA from water to identify *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*

Running Title: Usefulness of environmental DNA for *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* surveillance and control of low-schistosomiasis-endemic areas in Brazil

Keywords: schistosomiasis, environmental DNA, real-time PCR, water-borne, ecoepidemiology, one-health

Matheus Pereira de Araújo^{1,2}, Marcos José Marques¹, Raquel Lopes Martins Souza¹, Luiz Felipe Leomil Coelho¹, Vinícius Ferreira Paterno¹, Masashi Kirinoki², Satoru Kawai², Áureo Almeida de Oliveira³, Sueleny Silva Ferreira Teixeira³, Florence Mara Rosa⁴, Megumi Sato⁵, Marcello Otake Sato^{2*}

Affiliations:

¹Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

²Dokkyo Medical University, Mibu, Tochigi, Japan

³Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

⁵Niigata University, Niigata, Niigata, Japan

*Corresponding author

Address for correspondence: Marcello Otake Sato, Department of Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University, Kitakobayashi 880, Mibu, Shimotsuga, Tochigi, 321-0293, Japan; email: marcello@dokkyomed.ac.jp

Phone: +81 0282-87-2134; FAX: +81 0282-86-6431

Abstract

Schistosomiasis is a neglected parasitic disease that affects millions of people worldwide in under developing countries. In Brazil, chemotherapy succeeded in the control of severe clinical cases. However, despite the low endemicity, several areas are still in active transmission, with the presence of the disease's intermediate host, *Biomphalaria glabrata*, and infected people. More sensitive methods for detecting the level of dispersion and presence of the intermediate host are required. Using environmental DNA (eDNA) and screening through quantitative PCR (qPCR), this work aimed to demonstrate a method of detecting *Schistosoma mansoni* and *B. glabrata* in the municipalities of Minas Gerais, Brazil. With the use of 18 water samples from the municipalities, *S. mansoni* and *B. glabrata* DNA was found in 10 and 4 municipalities, respectively, and the DNA of both was found in three municipalities. Thus, a new effective detection tool for parasites and intermediate hosts that can be used to manage the disease in suspicious areas and with low endemicity is presented in this paper.