



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Alessandra Campos da Silva

A influência da antibioticoterapia na tricuriase em fase crônica

Rio de Janeiro

2019

Alessandra Campos da Silva

A influência da antibioticoterapia na tricuriase em fase crônica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S586 Silva, Alessandra Campos da.
A influência da antibioticoterapia na tricuriase em fase crônica / Alessandra Campos da Silva – 2019.
66 f.

Orientador: Eduardo José Lopes Torres

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Antibióticos - Teses. 2. Tricuríase. 3. Doenças parasitárias - Teses. 4. Microbiota. I. Torres, Eduardo José Lopes. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 615.33

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alessandra Campos da Silva

A influência da antibioticoterapia na tricuriase em fase crônica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 07 de junho de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^ª. Dra. Renata Heisler Neves
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Jr.
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, que mesmo sem nunca ter sido inserida nesta imensidão do mundo acadêmico, me ensinou que eu podia conquistar tudo o que eu quisesse e sempre fez questão de me mostrar como a educação é capaz de mudar a vida das pessoas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que em todos os momentos de tormenta e vontade de desistir sempre me carregou no colo e me mostrou qual caminho seguir, ele acima de todos sabe o quão difícil foi chegar até aqui e fazer esse sonho sair do papel e virar realidade.

Agradeço a minha família, a base de todo o meu ser, minha mãe que me ensinou a ser assim como ela, uma mulher forte, batalhadora e sem medos, capaz de enfrentar o mundo para conquistar o que sonha. Meus irmãos, que são minha principal fonte de ligação com o passado e me ensinaram a compartilhar o muito e o pouco, ter crescido com vocês foi uma honra.

Aos meus amores que já se foram: pai e avós, sei que de onde quer que estejam, estão em paz e sentindo um enorme orgulho nesse momento.

Meu marido, companheiro da vida, que ao longo desses dois anos segurou minhas lágrimas e minhas angústias e mesmo sem saber as respostas das minhas incógnitas, nunca me fez deixar de acreditar que no fim tudo daria certo, obrigada meu amor, você é parte muito importante disso.

Meu orientador, que me abraçou e me acolheu nesses dois anos, confiou em meu potencial e me fez sentir parte importante desse grupo. Ah, esse grupo... nem que eu fizesse mil vezes uma pós graduação eu teria colegas e amigos de departamento tão especiais como vocês, que por estarmos todos no mesmo barco, muitas das vezes eram os únicos a entender o que se passava dentro do meu coração. Obrigada Dayane Oliveira, Ludmila Rocha, Makoto Enoki, Masinda Nguiditodos os outros colegas da parasitologia e microbiologia que foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Uma vez eu ouvi que ao ajudar um colega de profissão você gera admiração e não concorrência, e é exatamente esse sentimento eu tenho por vocês, profunda admiração, minhas amigas farmacêuticas que dividem comigo todos os dias o mesmo ambiente de trabalho, embarcaram comigo nessa loucura quando eu disse que havia passado para o mestrado, e sem pensar muito, estavam ali a postos para cobrir todas as minhas ausências, vocês sabem que se não fosse pelas profissionais e pessoas maravilhosas que vocês são nada disso seria possível.

Esse com certeza é o capítulo mais bonito desse trabalho, pois ao olhar para trás posso perceber que ninguém jamais consegue nada sozinho nesse mundo, e a todos que de alguma forma mesmo que indiretamente fizeram parte disso tudo, muito obrigada!

A intermitência do sonho é que nos permite suportar os dias de trabalho.

Pablo Neruda

RESUMO

SILVA, Alessandra Campos da. **A influência da antibioticoterapia na tricuriase em fase crônica**. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

As geohelmintíases são infecções parasitárias ocasionadas por nematoides e transmitidas pelo contato direto ou indireto do hospedeiro com solo contaminado com fezes humanas. A tricuriase humana é desenvolvida pela espécie *Trichuris trichiura*. A espécie *T. muris* tem sido usada como modelo experimental e se mostra como uma poderosa ferramenta para explorar os processos de estabelecimento e manutenção da infecção. A eficácia das drogas utilizadas contra as geohelmintíases tem diminuído com o tempo, pois são amplamente distribuídas para quimioterapia preventiva, sendo assim, a ameaça de resistência é real e imediata. Observa-se a necessidade do estudo de novas formas de tratamento para as doenças transmitidas pelo solo. Este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da antibioticoterapia na biologia parasitária do *Trichuris muris*, e os efeitos deste fármaco nas alterações teciduais provocadas pela infecção e que influência tem sobre a microbiota intestinal e as bactérias associadas ao processo de invasão tecidual em decorrência desta parasitose. Camundongos machos (*swiss webster*) foram infectados com 150 ovos de *T. muris*. Após o estabelecimento da infecção, os animais foram submetidos ao tratamento com Piperacilina + Tazobactan (8mg/dia) subcutâneo, durante oito dias. Amostras de fezes foram coletadas para realização do exame parasitológico e após 45 dias os animais foram eutanasiados e necropsiados. Diferentes tecidos foram coletados e processados para a realização de técnicas hematológicas/bioquímicas, imunológica e histopatológicas. Nossos resultados mostram que o tratamento não teve impacto sobre a biologia reprodutiva do parasito, a eliminação dos ovos nas fezes e a carga parasitária. Como esperado, os animais infectados apresentaram um espessamento significativo da mucosa intestinal, submucosa e camada muscular, onde caracterizamos um infiltrado polimorfonuclear, com poucos macrófagos, na mucosa intestinal e na submucosa um intenso infiltrado polimorfonuclear e linfoplasmocitário. A antibioticoterapia promoveu uma redução significativa no espessamento da submucosa epitelial, reduzindo o infiltrado inflamatório, com poucas células identificadas nesta camada. Nos aspectos imunológicos observamos uma diminuição da produção de IL-10 no soro dos animais infectados submetidos ao tratamento e uma redução de IL-6 e um aumento de TNF e INF- γ no linfonodo mesentérico e no soro desse grupo. Houve um aumento de IL-6 no ceco dos animais infectados em comparação com os tratados. Em relação as citocinas Th2, nossos dados sugerem, mesmo sem diferença significativa, uma redução na liberação de IL-4 e IL-10 no soro dos animais infectados submetidos ao tratamento. Bactérias invasoras foram identificados apenas na submucosa dos animais controles e infectados não tratados assim como a presença de enterobactérias foi observada apenas nesses dois grupos. Concluímos que a antibioticoterapia não tem impacto sobre a atividade reprodutiva do nematoide e nem na carga parasitária, indicando que este fármaco não tem ação contra o parasito. Porém, o tratamento reduziu significativamente a colonização bacteriana intestinal e isso teve como consequência a eliminação do processo de invasão bacteriana na submucosa epitelial, proporcionando uma redução significativa do infiltrado inflamatório intestinal. Avaliamos que a tricuriase, em fase crônica, desenvolve um aspecto infeccioso mais grave devido ao sinergismo que ocorre entre as lesões provocadas pelo verme adulto e invasão de bactérias oportunistas.

Palavras-chave: Antibiótico. Tricuriase. Parasitose. Microbiota.

ABSTRACT

SILVA, Alessandra Campos da. **The influence of antibiotic therapy on chronic phase trichuriasis**. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Geohelminthiasis are parasitic infections caused by nematodes and transmitted by direct or indirect contact of the host with soil contaminated with human feces. Human trichuriasis is developed by the species *Trichuris trichiura*. *T. muris* has been used as an experimental model and has proven to be a powerful tool for exploring infection establishment and maintenance processes. The effectiveness of drugs used against geohelminthiasis has diminished over time as they are widely distributed for preventive chemotherapy, so the threat of resistance is real and immediate. There is a need to study new forms of treatment for soil-borne diseases. This study aims to evaluate the impact of antibiotic therapy on the parasitic biology of *Trichuris muris*, and the effects of this drug on tissue changes caused by infection and its influence on the intestinal microbiota and the bacteria associated with the process of tissue invasion as a result of this parasitosis. Male mice (swiss webster) were infected with 150 *T. muris* eggs. After infection was established, the animals were treated with subcutaneous Piperacillin + Tazobactan (8mg / day) for eight days. Stool samples were collected for parasitological examination and after 45 days the animals were euthanized and necropsied. Different tissues were collected and processed for hematological / biochemical, immunological and histopathological techniques. Our results show that the treatment had no impact on the parasite's reproductive biology, fecal egg clearance and parasite load. As expected, the infected animals presented a significant thickening of the intestinal mucosa, submucosa and muscular layer, where we characterized a polymorphonuclear infiltrate, with few macrophages, in the intestinal mucosa and submucosa an intense polymorphonuclear and lymphoplasmic infiltrate. Antibiotic therapy promoted a significant reduction in epithelial submucosa thickening, reducing the inflammatory infiltrate, with few cells identified in this layer. In the immunological aspects we observed a decrease in IL-10 production in the infected animals serum treated and a reduction of IL-6 and an increase of TNF and INF- γ in the mesenteric lymph node and serum of this group. There was an increase in IL-6 in the caecum of infected animals compared to those treated. Regarding Th2 cytokines, our data suggest, even without significant difference, a reduction in IL-4 and IL-10 release in the serum of infected animals undergoing treatment. Invasive bacteria were identified only in the submucosa of untreated infected and control animals as well as the presence of enterobacteria was observed only in these two groups. We conclude that antibiotic therapy has no impact on nematode reproductive activity or parasite load, indicating that this drug has no action against the parasite. However, the treatment significantly reduced intestinal bacterial colonization and this resulted in the elimination of the bacterial invasion process in the epithelial submucosa, providing a significant reduction in the intestinal inflammatory infiltrate. We found that chronic trichuriasis develops a more serious infectious aspect due to the synergism that occurs between adult worm lesions and invasion of opportunistic bacteria.

Keywords: Antibiotic. Trichuriasis. Parasitose. Microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Proporção de crianças (1 - 14 anos de idade) nos países que requerem quimioterapia preventiva para helmintíase transmitida pelo solo.....	17
Figura 2 – Distribuição da tricuriase no Brasil 2010/2015.....	18
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>Trichuris muris</i>	19
Figura 4 – Ciclo biológico (ou de vida) de <i>Trichuris trichiura</i>	21
Figura 5 – Esquema demonstrando a técnica utilizada para a leitura da distensão sanguínea pelo método de Ameia modificado segundo o livro Células sanguínea: um guia prático.....	34
Figura 6 – Cortes histológicos do ceco de camundongo infectado por <i>T.muris</i> , corados por Giemsa observando a visão geral do tecido intestinal, mostrando bactérias invasoras nos animais que não foram submetidos ao tratamento.....	42
Figura 7– Ceco de animal controle não tratado comparado com ceco de animal controle tratado com antimicrobiano.....	43
Figura 8– Ceco de animal infectado não tratado comparado com ceco de animal infectado tratado com antimicrobiano.....	43
Figura 9– Parasito inserido no tecido de um animal infectado não tratado.....	44
Figura 10– Presença de infiltrado inflamatório na submucosa do ceco de um animal infectado que não foi submetido ao tratamento com antimicrobiano.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Contagem de ovos in vivo pelo método Kato-Katz.....	39
Gráfico 2 – Análise morfométrica das camadas do intestino grosso de animais controles e infectados do <i>T. muris</i>	44
Gráfico 3 – Análise morfológica das camadas do intestino grosso de animais controles e infectados do <i>T. muris</i>	45
Gráfico 4 – Dosagem de citocinas do linfonodo mesentérico.....	47
Gráfico 5 – Dosagem de citocinas do ceco.....	49
Gráfico 6 – Dosagem de citocinas do soro.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Peso dos camundongos, número de vermes recuperados na necropsia e taxa de ovoposição <i>in vitro</i> dos camundongos.....	38
Tabela 2 –	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos controles e infectados por <i>Trichuris muris</i>	40
Tabela 3 –	Média de células encontradas nas leituras das distensões sanguíneas.....	41
Tabela 4 –	Identificação microbiana das fezes dos camundongos através da técnica do MALDI-TOF.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALB	Albendazol
BB	Banda bacilar
Cf	Concentração final
Ci	Concentração inicial
CNT	Controle não tratado
CT	Controle tratado
DEC	Dietilcarbamazida
Eos	Eosinófilos
ES	Excreção e secreção
FL	Filariose linfática
Hct	Hematócrito
HE	Hemácias
HGB	Hemoglobina
IL-1	Isoleucina 1
IL-10	Isoleucina 10
IL-12	Isoleucina 12
IL-13	Isoleucina 13
IL-17	Isoleucina 17
IL-2	Isoleucina 2
IL-4	Isoleucina 4
IL-6	Isoleucina 6
ILC2	Células linfóides inatas do tipo 2
INF- γ	Interferon gama
INPEG	Inquérito Nacional de Prevalência de Esquistossomose e Geohelminthiases
INT	Infectado não tratado
IT	Infectado tratado
IVM	Ivermectina
KPC-Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Linf	Linfócitos
M	Mucosa

MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
MDA	Programa de administração de medicamentos em massa
Mon	Monócito
MS	Ministério da Saúde
Mu	Muscular
OMS	Organização mundial de saúde
PBPs	Proteínas de ligação da penicilina
PZQ	Praziquantel
RBC	Glóbulos vermelhos
RPM	Rotações por minuto
S.D	Desvio padrão
<i>S.Tm</i>	<i>Salmonella entérica sorovar Typhimurium</i>
Seg	Segmentado
Sm	Submucosa
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia
Vf	Volume final
Vi	Volume inicial
WBC	Glóbulos brancos
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mg	Miligrama
ml	Mililitro
μm	Micrometro
μl	Microlitro
g	Gramma
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius
mm^3	Milímetro cúbico

SUMÁRIO

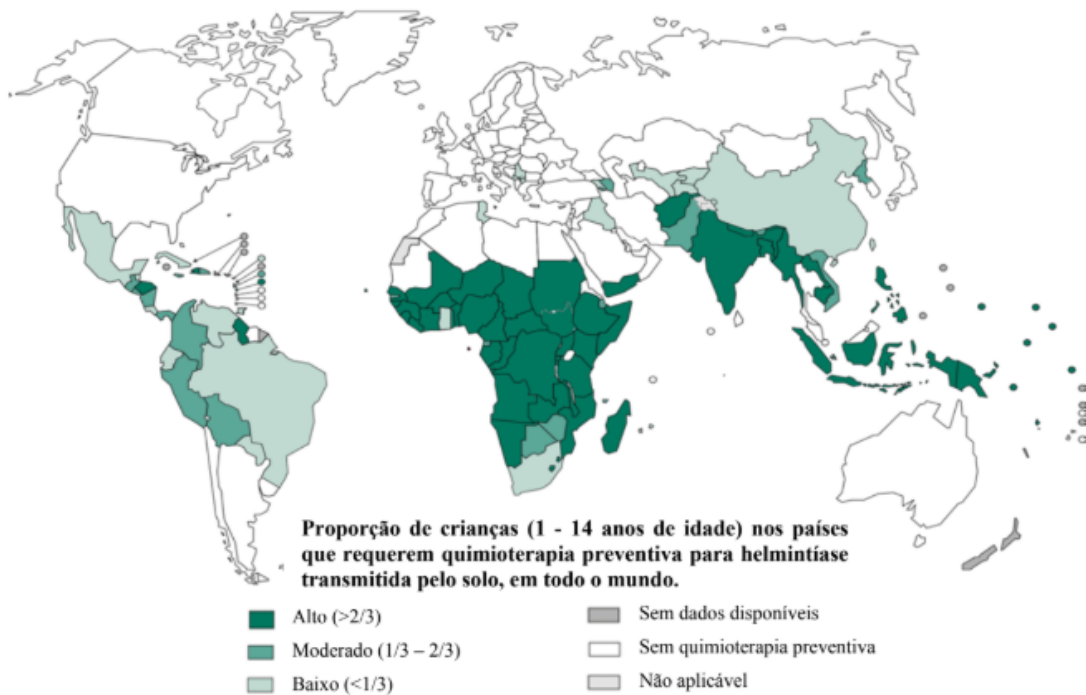
	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	29
1.1	Geral	29
1.2	Específicos	29
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	Infecção experimental	30
2.2	Tratamento com antimicrobiano	30
2.3	Isolamento da microbiota intestinal	32
2.4	Identificação microbiana	32
2.5	Eliminação de ovos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	33
2.6	Parâmetros sanguíneos	34
2.7	Fixação química	35
2.8	Lavado peritoneal e cálculo de macrófagos	35
2.9	Dosagem das citocinas presentes no soro, linfonodo mesentérico e ceco	35
2.10	Histopatologia	35
2.11	Análise morfométrica do tecido intestinal	36
2.12	Análise morfológica do tecido intestinal	36
2.13	Análises estatísticas	37
3	RESULTADOS	38
3.1	Eliminação de ovos nas fezes e ovoposição <i>in vitro</i>	39
3.2	Dosagens sanguíneas	39
3.3	Distensões sanguíneas	40
3.4	Morfometria	41
3.5	Morfologia da submucosa intestinal	45
3.6	Coprocultura	46
3.7	Dosagem de citocinas	47
3.8	Contagem de macrófagos peritneais	52
4	DISCUSSÃO	53
	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias intestinais são prevalentes em países em desenvolvimento que apresentam problemas estruturais de saneamento e educação em saúde associados a condições climáticas que favorecem o desenvolvimento dessas parasitoses. As geohelmintíases são infecções parasitárias provocadas por nematoides especificamente transmitidas pelo contato direto ou indireto do hospedeiro com solo contaminado com fezes humanas. Essas são doenças relacionadas à pobreza com alta prevalência nos continentes da América do sul e central e no continente Africano. São doenças negligenciadas, com pouco investimento em pesquisa, desenvolvimento de fármacos e vacinas, principalmente devido ao baixo interesse da indústria farmacêutica. Esses helmintos necessitam da passagem pelo solo para que ocorra o desenvolvimento das larvas infectantes dentro do ovo (transmissão passiva) ou o amadurecimento de larvas que penetram no tecido (transmissão ativa) (JOELINE et al., 2018). O intestino dos mamíferos tem sido colonizado por nematoides transmitidos pelo solo, ao longo da evolução e as principais espécies que infectam humanos são: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* (IF; RAPIN; HARRIS, 2018)

Em todo o mundo, aproximadamente 1,5 bilhão de pessoas, quase 24% da população mundial, estão infectadas por geohelmintos, sendo estas amplamente distribuídas pelos trópicos e subtropicais. Mais de 267 milhões de crianças em idade pré-escolar e mais de 568 milhões em idade escolar vivem em áreas com transmissão intensa desses parasitos e necessitam de tratamento e intervenções preventivas (WHO, 2016) (Figura 1). Os helmintos foram erradicados em grande parte dos países desenvolvidos como resultado de saneamento ao longo do século passado, porém continua sendo uma grande ameaça para a saúde em regiões mais pobres, com quase um quarto da população mundial em risco de infecção (OMS, 2017). Dentre as geohelmintíases, a tricuriase humana atinge cerca de 795 milhões de pessoas (OMS, 2013).

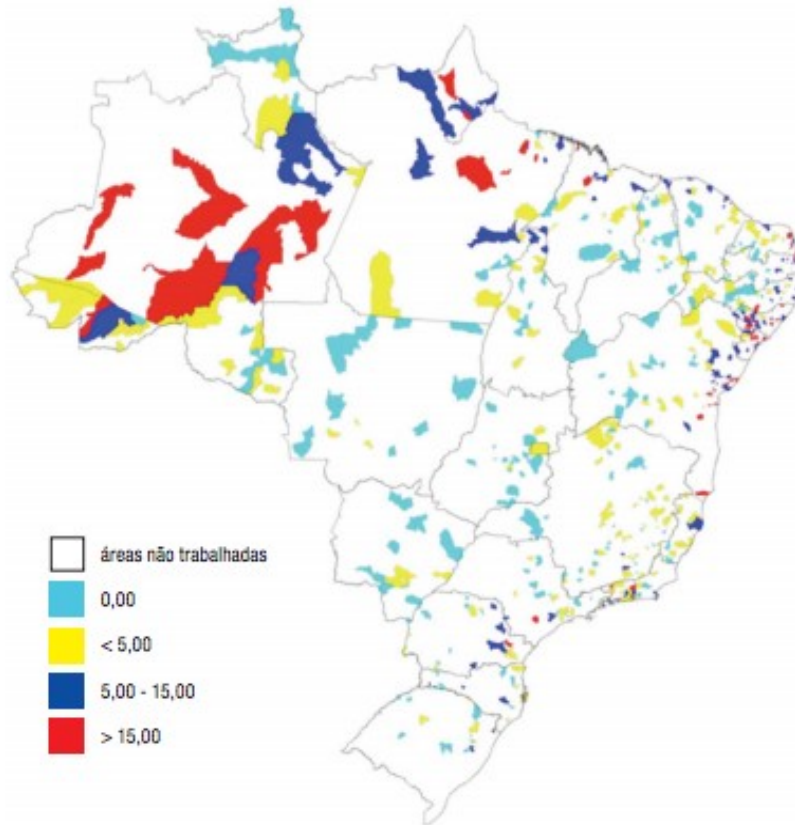
Figura 1 -Proporção de crianças (1 - 14 anos de idade) nos países que requerem quimioterapia preventiva para helmintíase transmitida pelo solo.



Fonte: Adaptada de WHO, 2015

De acordo com o INPEG (Inquerito Nacional de Prevalência e Esquistossomose e Geohelmintíases) realizado entre 2010 e 2015, de um total de 197.564 escolares examinados, a taxa de positividade foi de 5,41% isto é, 10.654 crianças infectadas por *Trichuris trichiura*. As maiores proporções estão nas regiões do Norte e Nordeste, destacando os estados do Amazonas (21,79%), Pará (20,69%), Sergipe (16,99%) e Alagoas (15,04%). Amapá, Acre, Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina e Rio de Janeiro, apresentam uma prevalência média de 5% e nos demais estados aproximadamente 2%. Destaca-se região Centro-Oeste, com exceção do Mato Grosso, onde a taxa de positividade gira em torno de 0,1% (KATZ, 2018) (Figura 2), este dado talvez esteja associado ao menor número de áreas selecionadas que retornaram os dados para serem inseridos no inquérito. Importante ressaltar que este inquérito é o mais atual e o mais completo para a esquistossomose e geohelmintíases, porém deve se levar em consideração em todos os dados a variável destacada para a região Centro-Oeste.

Figura 2: Distribuição da tricuriíase no Brasil 2010/2015



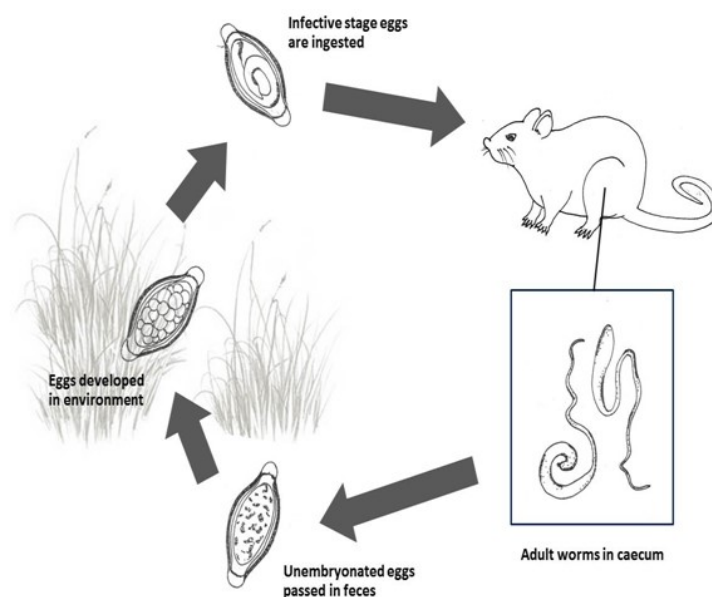
Fonte: Instituto Nacional de Prevalência de Esquistossomose e Geohelmintíases – INPEG, 2018

A tricuriíase humana é desenvolvida pela espécie *Trichuris trichiura* (OWEN, 1835), porém este gênero está muito adaptado ao parasitismo em mamíferos e existem cerca de 70 espécies de *Trichuris* identificados, incluindo os que são parasitos de interesse médico e veterinário. Todos são parasitos da região inicial do intestino grosso (ceco), desempenhando o mesmo processo de invasão e colonização tecidual em todos os seus hospedeiros. Além do impacto médico desencadeado pelo *T. trichiura*, destacamos as espécies de impacto veterinário, que são os parasitos de cães, *Trichuris vulpis*, de suínos o *Trichuris suis*, de bovinos e caprinos, que é o *Trichuris ovis* e o parasito de camundongos e amplamente utilizado para se estudar helmintíases intestinais como modelo experimental, a espécie *Trichuris muris* (HURST; ELSE, 2013).

O *T. muris* tem sido usado há muito tempo como modelo experimental e reconhecida como uma poderosa ferramenta para explorar os processos de estabelecimento e manutenção da infecção, além de auxiliar na investigação da interação parasito-hospedeiro e a resposta

imune desencadeada pelo mamífero em resposta ao contato e às lesões provocadas pelo nematoide durante a infecção. Ao longo dos anos, tornou-se também um importante modelo para explorar o sistema imunológico, pois esta infecção expõe a mucosa intestinal a antígenos que possuem um papel fisiologicamente relevante. Sendo assim o *T. muris* é um modelo experimental que contribui significativamente para o desenvolvimento científico dos princípios fisiopatológicos e imunológicos das helmintíases intestinais (HURST; ELSE, 2013) (Figura 3).

Figura 3-Ciclo de vida de *Trichuris muris*



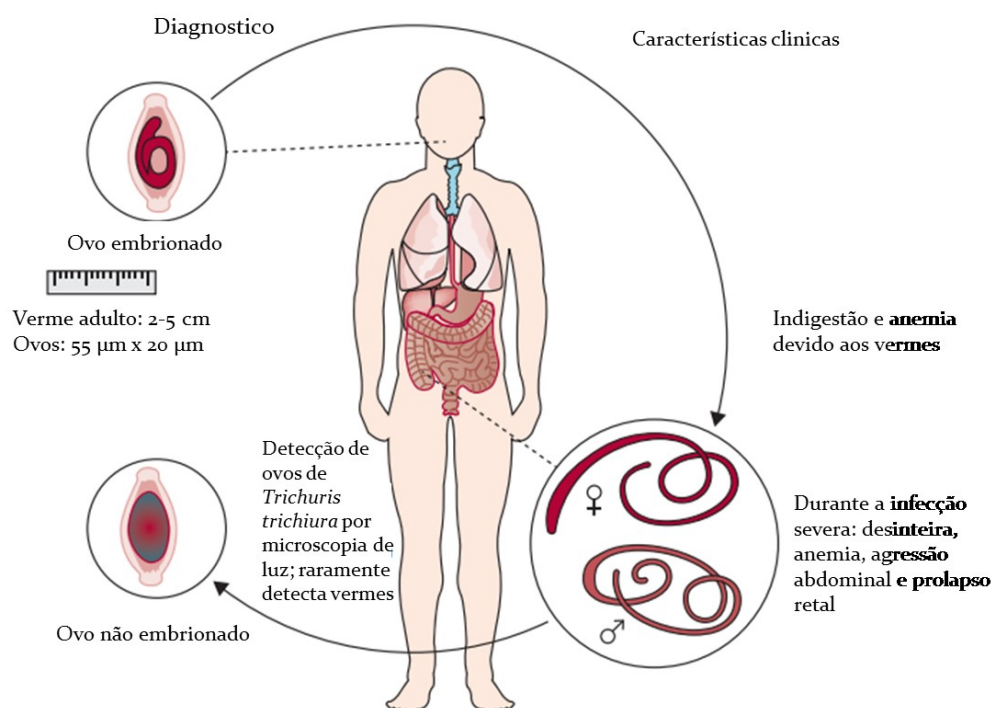
Fonte: cCERoPATH, 2015

Os nematoides *Trichuris* spp. estabelecem a infecção a partir da penetração das larvas no epitélio inestinal e o verme adulto se aloja no intestino grosso promovendo lesões na superfície da mucosa intestinal, o que permite a invasão de bactérias presentes na luz intestinal, como demonstrado previamente pelo nosso grupo ao investigar as lesões intestinais em fase crônica da infecção (OLIVEIRA, 2017). Os ovos eliminados pelas fêmeas saem junto às fezes sem possuir a larva formada. Em contato com o solo, e de acordo com as condições ambientais, como temperatura acima de 25° C e alta humidade, a larva L1 se desenvolve, tornando o ovo embrionado e infectante. Os novos hospedeiros se infectam ao ingerir acidentalmente ovos larvados presentes no solo, em hortaliças cruas não lavadas, em fômites e/ou nas mãos não higienizadas corretamente. Ao serem ingeridos, os ovos sofrem a ação das enzimas gástricas e, ao chegarem no intestino delgado, sofrem novas alterações com a mudança de pH e a atuação

de bactérias da microbiota intestinal. As bactérias interagem com os plugues polares, os fragilizam, o que viabiliza a eclosão do ovo e consequente liberação da larva L1, que sai por um dos plugues polares (opérculos) presentes nestes ovos (HAYES et al., 2010). Logo em seguida, na região do ceco, as larvas L1 se inserem pelas criptas de Lieberkuhn e penetram no tecido intestinal pelas células caliciformes. As larvas colonizam o tecido sob a cobertura do epitélio, permanecendo nesse sítio durante o crescimento até a fase adulta. A primeira muda, de L1 para L2, acontece entre 9 e 11 dias e com aproximadamente 13 dias sofrem a segunda muda, para L3. Após 22 dias se transformam em L4, finalmente atingindo a forma de adulto jovem com 32 dias após a ingestão do ovo. Nesta fase acontece o amadurecimento mais intenso dos órgãos reprodutivos e digestivos, promovendo um crescimento mais significativo do corpo na região posterior do nematóide, aumentando a espessura e, conseqüentemente, rompendo a superfície da mucosa epitelial intestinal, liberando esta região para o lúmen, porém mantendo-se ancorado pela inserção da região anterior no epitélio, formando um tipo de túnel epitelial (TILNEY et al., 2005; KLEMENTOWICZ et al., 2012; LOPES-TORRES et al., 2013) (Figura 4).

Como este nematóide não possui dentes, ganchos, nem outras estruturas de fixação, esta estratégia de permanecer a parte anterior de seu corpo inserida no epitélio garante a sua permanência no intestino durante o desenvolvimento do parasitismo. Conforme se desloca pelo tecido vai rompendo a região lateral das células da mucosa epitelial formando "túneis sinciciais" sob a mucosa epitelial (TILNEY et al., 2005). Nesta região do tecido (lateral) as células são mais frágeis porque o citoesqueleto não apresenta fibras de actina que são responsáveis por reforçar a estrutura celular, que permite o parasito romper e se estabelecer entre as organelas citoplasmáticas, de onde ele retira seus nutrientes e se mantém protegido pela sustentação celular garantida pelas regiões apical e basal das células intestinais (TILNEY et al., 2005). Após atingir a maturidade sexual, as regiões posteriores dos parasitos machos e fêmeas se encontram e ocorre a cópula e a fecundação. As fêmeas grávidas podem eliminar cerca de 3.000 a 20.000 ovos por dia e, depois de eliminados junto com as fezes no solo, estes ovos levam aproximadamente 37 dias para que a larva L1 esteja formada (KLEMENTOWICZ E et al., 2012).

Figura 4- Ciclo biológico (ou de vida) de *Trichuris trichiura*



Fonte: Adaptado JOURDAN et al., 2018

A presença do nematoide inserido na mucosa epitelial do intestino grosso promove alterações teciduais importantes, além de desencadear alterações hematológicas tanto nos parâmetros celulares quanto bioquímicos, tendo sido registrado uma diminuição nas taxas de hemoglobina (YIMAM et. al, 2016; OLIVEIRA 2017), deficiência de ferro plasmático (AZIRA et al, 2012) e a queda na síntese de vitamina A (HURST; ELSE, 2013). Além disso, de acordo com Oliveira (2017) animais infectados com *T. muris* apresentaram uma queda significativa no número de hemácias e no hematócrito assim como uma diminuição nas dosagens de ferro, indicando um quadro de anemia ferropriva nesses animais.

Infecções intestinais provocadas por geohelminhos, incluindo *Trichuris* spp, aumentam a contratilidade muscular do tecido intestinal e essa hipercontratibilidade tende a ser um dos mais importantes mecanismos inatos para a expulsão do *T. muris* e resistência à infecção (KLEMENTOWICZ et al., 2012). Khan et al 2005 sugeriram em seus estudos que durante a infecção por *Trichinella spiralis*, as células T helper (Th) 2 contribuem para o desenvolvimento de hipercontratibilidade do músculo intestinal e expulsão de vermes do intestino.

O tipo de resposta imune gerada contra *T. muris* é fundamental na mediação da susceptibilidade ou resistência à infecção. O desenvolvimento de uma resposta primária de perfil Th2 está associada à rápida expulsão do parasito, e o desenvolvimento de uma resposta Th1 permite o estabelecimento da infecção crônica e o aumento da imunopatologia (KLEMENTOWICZ et al., 2012). As células caliciformes são a principal fonte de mucinas no intestino e são consideradas um componente-chave dos mecanismos de defesa inatos contra várias infecções entéricas (WANG, 2016). A mucosa intestinal, é a primeira linha de defesa do organismo contra nematoides e é o muco secretado pelas células caliciformes que estabelece essa primeira barreira de defesa entre o epitélio e o parasito. Esse muco é composto basicamente por mucinas, resistina e intelectina (SAMBLAS et al, 2018).

Kyung-sun e colaboradores (2009) apresentaram relatos de casos clínicos e mostraram infiltrações eosinofílicas localizadas na mucosa intestinal, porém sem eosinofilia definitiva nas análises sanguíneas o que poderia auxiliar no diagnóstico. Infecções parasitárias, como as causadas por *Trichuris* spp. por exemplo, também sofrem influências da microbiota desde o primeiro contato do ovo com o tecido hospedeiro, pois bactérias auxiliam a eclosão das larvas de *Trichuris* no intestino (HAYES, 2010; VEJZAGIĆ et al., 2015).

Interação do *Trichuris*-hospedeiro e microbiota intestinal

O corpo humano abriga um ecossistema complexo referido como microbioma, este complexo de microorganismos inclui bactérias, fungos, protozoários e vírus (SAVAGE, 1977). Embora essa colonização tenha sido descrita há séculos, sua complexidade e diversidade só foi demonstrada recentemente. Atualmente a maioria das pesquisas se concentram nos grupos de bactérias, pois elas representam os membros mais abundantes desta comunidade microbiana e hoje em dia existe um número maior de ferramentas disponíveis para avaliá-las especificamente (RAPIN & HARRIS, 2018).

A microbiota bacteriana fornece várias funções que são vitais para a saúde dos mamíferos, sendo a sua presença necessária para manutenção da motilidade intestinal, para estimular o desenvolvimento imunológico e manter a homeostase imunológica (BROSSCHOT & REYNOLDS, 2018).

Bactérias são encontrados em todo o corpo humano, principalmente nas superfícies externas e internas, incluindo o trato gastrointestinal, pele, saliva, mucosa oral e conjuntiva. O número médio de bactérias que colonizam um corpo humano foi estimado em cerca de 3×10^{13} , o que ultrapassa o número de células eucariontes que formam o corpo, sendo o trato gastrointestinal o maior reservatório de bactérias e abriga uma densidade crescente desde sua porção proximal até o ânus. A importância de uma comunidade bacteriana intestinal rica e diversa tem sido demonstrada para uma variedade de processos fisiológicos do hospedeiro, incluindo o metabolismo, proteção contra infecção por resistência à colonização e maturação imunológica (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

Embora numerosos exemplos de associações entre helmintos intestinais e bactérias têm sido relatados nos últimos anos, ainda há muito a ser explorado sobre esse aspecto. Na literatura encontra-se poucas relações causais da interação de helmintos intestinais e o microbioma dos hospedeiros, conseqüentemente se explora pouco sobre as possíveis implicações desta interação sobre o impacto fisiopatológico da infecção. O impacto da infecção intestinal provocada por helmintos no microbioma tem sido investigado em um pequeno número de estudos conduzidos em regiões endêmicas para helmintos (BROSSCHOT & REYNOLDS, 2018). Os helmintos intestinais evoluíram no processo de adaptação parasitária junto com os microrganismos mutualistas que coabitam o intestino de mamíferos. Essas interações entre helmintos, bactérias e seus hospedeiros podem ter moldado não apenas as interações parasito-hospedeiro, mas também o equilíbrio hospedeiro-microbioma e também a relação entre parasito-microbioma. Atualmente a compreensão do impacto da interação helminto-hospedeiro-microbioma permanece muito limitado (RAPIN & HARRIS, 2018).

A interação entre bactérias e helmintos tem sido relatada em alguns estudos, por exemplo Lee e colaboradores em 2014 comparou a diversidade bacteriana intestinal entre indivíduos infectados com *T. trichiura* e *A. lumbricoides*, e registrou que existe uma maior diversidade bacteriana nas fezes dos indivíduos infectados por esses geohelmintos. Outro estudo que foca nessa relação bactéria-helminto é o de Cooper e colaboradores, 2013, porém esses autores não encontraram diferença na composição da microbiota fecal de indivíduos infectados com *T. trichiura* em comparação com pessoas submetidas ou não ao tratamento com anti-helmínticos. Além disso, trabalhos que focam na interação da microbiota com o sistema imune, destacando a susceptibilidade ou resistência contra helmintos, mostraram que parasitos

como *T. trichiura* e *A. lumbricoides* podem causar infecções que podem persistir por anos. (BROSSCHOT & REYNOLDS, 2018).

Infecções helmínticas normalmente induzem uma resposta do tipo 2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 a partir de células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) e Th2, além do recrutamento de eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos ativados alternativamente (KLEMENTOWICZ et al., 2012). Mecanismos efetores do tipo 2 são essenciais para a expulsão dos helmintos, porém muitas vezes são ineficazes devido a resposta regulatória concomitante induzida pelos helmintos, como por exemplo a excreção e secreção (ES) de produtos que são imunomoduladores por esses parasitos. Os produtos de ES contém proteínas e glicoproteínas imunomoduladoras que controlam a atividade de várias células imunológicas, podendo induzi-las diretamente para um papel regulador, como as células T reguladoras Foxp3 (Tregs). Provavelmente a produção de ES influencia para que haja manutenção do parasitismo, tornando a infecção crônica (BROSSCHOT & REYNOLDS, 2018).

Nosso grupo mostrou que a presença de *T. muris* no intestino altera a composição da microbiota intestinal, e apenas nos animais infectados foi detectado uma quantidade de *Bacteroides* sp. de forma a ser contabilizado por unidades formadoras de colônias (UFC) e um predomínio de anaeróbios totais e *Proteus* sp. (OLIVEIRA, 2017). Os danos teciduais causados pelo *T. muris* no intestino grosso do hospedeiro, pode estar associado com a presença de bactérias na submucosa epitelial. A interação microbiota intestinal do hospedeiro com *Trichuris* está associada a eclosão da larva L1, foi mostrado que a adesão de *Escherichia coli* nos opérculos do ovo de *T. muris*, sugerem que essa interação, associada à temperatura adequada, proporciona uma fragilização destes tampões mucoides, que são os plugues polares, favorecendo a eclosão da larva (HAYES et al., 2010; KLEMENTOWICZ et al., 2012). Outro fator interessante desta interação também está relacionado ao tipo de resposta imune. A IL-12 e o IFN- γ desencadeiam um perfil de resposta Th1 e bactérias induzem o hospedeiro a produzir estas citocinas após o contato de células do sistema imune com polissacarídeos presentes em *Bacteroides fragilis* (MAZMANIAN et al., 2005). Já foi dito que camundongos que apresentam resposta Th1 tornam-se susceptíveis à infecção por *T. muris*, diferente dos que apresentam um perfil Th2 que são resistentes principalmente em decorrência da atuação de IL-4 e IL-13 (HURST; ELSE, 2013b).

Resistência a anti-helmínticos

Programas de controle para geohelmintíases (STH), esquistossomose, filariose linfática (FL) e oncocercose tornaram-se possíveis pela disponibilidade de medicamentos baratos e eficientes que podem ser administrados às comunidades impactadas por essas infecções e que recebem atendimento de programas de tratamento em massa (MDA). Esses fármacos essenciais são albendazol (ALB) ou mebendazol, para o tratamento de STH, praziquantel (PZQ) para esquistossomose, ALB e dietilcarbamazida (DEC) ou ALB e ivermectina (IVM) para FL e IVM para oncocercose. Muitos países implementaram com sucesso programas de MDA, e a administração em massa desses medicamentos é simples e pode ser realizada por qualquer profissional da saúde ou outros profissionais que não são da área, pois não depende de treinamento técnico especializado (SMITS, 2009).

Apesar da eficiência dos anti-helmínticos citados pessoas em área de risco estão sujeitas a reinfecção deixando essas populações expostas e em permanente risco. Embora a infecção com uma baixa carga parasitária seja geralmente assintomática, a alta carga de vermes e as infecções crônicas que duram muitos anos podem ter consequências graves, incluindo comprometimento de desenvolvimento físico, cognitivo, bem como anemia, obstrução intestinal (RAPIN & HARRIS, 2018), prolapso retal, dentre outras complicações intestinais que podem se tornar crônicas como o desenvolvimento de hipersensibilidade intestinal.

O esquema terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde (MS) e OMS contra a tricuriase humana, está baseado no tratamento em dose única de albendazol 400 mg ou mebendazol 500 mg (WHO, 2013). A eficácia de um anti-helmíntico depende da capacidade do composto ativo em alcançar a localização do parasito e ligar-se a receptores específicos em concentrações suficientes para exterminá-lo (SMITS, 2009). A tricuriase é a geohelmintíases que apresenta maior resistência ao tratamento recomendado pelos órgãos oficiais e no Brasil o MS sugere o tratamento com um comprimido de albendazol de 400mg. Em decorrência dos relatos de resistência, trabalhos sugerem a coadministração do albendazol com ivermectina porém esta resistência tem sido pouco estudada e pode ter uma relação com características morfofisiológicas do parasito (SMITS, 2009) e não eliminamos a possibilidade de ter uma relação com a microbiota.

Análises recentes mostraram que o albendazol e o mebendazol, usados para tratar a tricuriase, podem resolver apenas cerca de um terço das infecções, e altas taxas de reinfeção são comumente encontradas. Com o desempenho insatisfatório dos anti-helmínticos atuais e a disponibilidade de seqüências genômicas completas, abre a possibilidade de oportunidades para se explorar novos medicamentos (COOPER et al., 2014).

Abordando a morfofuncionalidade dos nematoides tricurídeos apontamos para a região especializada localizada na porção anterior dos vermes adultos. A banda bacilar (BB) sugere ser fundamental para o processo de interação parasito-hospedeiro, envolvendo mecanismos de liberação de produtos ES, imunomodulação e absorção de nutrientes. A BB está em contato íntimo com o tecido hospedeiro e abriga mais de 50.000 células especializadas, as glândulas bacilares, além dos esticócitos e das inflações cuticulares (LOPES-TORRES et al., 2013). Não se sabe se a alimentação do verme realmente ocorre pela boca, pois o *Trichuris* não possui a faringe muscular, presente em outros nematoides, que seria responsável por bombear o alimento até o intestino. A função específica da BB não foi descrita, porém já foi associada a secreção de substâncias e absorção de nutrientes. Os *Trichuris* spp. podem secretar enzimas digestivas juntamente com moléculas imunomoduladoras e absorver moléculas nutricionais através dos poros das células bacilares (COOPER et al., 2014). Além disso essas células podem ter a capacidade de detoxificar agentes nocivos ao parasito. De acordo com Hansen et al. (2016), a BB tem um papel associado à resistência anti-helmíntica. A hipótese é que estes nematoides absorvem o fármaco pelos poros, e promovem a desintoxicação, aumentando a resistência desses helmintos às doses convencionais de benzimidazóis, que normalmente são eficientes para outros nematoides.

Antibioticoterapia

Recentemente alguns trabalhos vem associando a antibioticoterapia como alternativa para o tratamento de alguns nematoides filarídeos. Estudos mostraram que ocorre uma extensa apoptose de células germinativas adultas, embriões e células somáticas de microfilárias após a depleção de *Wolbachia* de nematoides filarídeos (LANDMANN et al., 2011). O desenvolvimento de apoptose ocorre logo após a depleção de bactérias com tetraciclina em infecções experimentais de *B. malayi* em animais e em experimentos *in vitro* (LANDMANN et al., 2011).

A depleção da *Wolbachia* após a administração de doxicilina em pacientes com Oncocercose foi capaz de afetar drasticamente a fertilidade dos vermes o que levou a uma redução sustentada da microfilaremia após 12 meses de administração isolada do antimicrobiano. Quando essa administração foi seguida de uma dose única de ivermectina quatro meses após o uso da doxicilina, foi observada a ausência completa de microfilaremia, sendo assim, a combinação da doxicilina com ivermectina pareceu ser mais eficiente em relação ao tratamento com ivermectina sozinha (HOERAUF et al., 2003).

Atualmente o uso de antimicrobianos para tratar doenças parasitárias já é uma realidade na medicina veterinária. A doxicilina pode ser utilizada como tratamento para a dirofilariose canina, visto que a eliminação da bactéria *Wolbachia* por antibioticoterapia pode trazer uma série de efeitos deletérios para o helminto como: inibição do desenvolvimento larvar e esterilidade das fêmeas, impedindo assim a conclusão do ciclo biológico do parasita. *Wolbachia* são organismos endosimbiontes obrigatórios, isto é, são requeridos para o desenvolvimento do parasito *Dirofilaria immitis* em todos os estágios (ETTINGER & FELDMAN, 2004).

Justificativa

A tricuriase faz parte das diversas helmintíases que são mundialmente negligenciadas. Mesmo que essas doenças tenham tido uma acentuada queda nas taxas de prevalência nos últimos anos, elas ainda permanecem altas e cerca de 465 milhões de pessoas estão infectadas por *Trichuris trichiura*.

Sabe-se que existe um acometimento intestinal provocado por nematoides tricuriídeos na fase crônica e uma estreita relação das bactérias intestinais com o agravamento da tricuriase (OLIVEIRA,2017). O rompimento do epitélio intestinal ocasionado por este nematoide deixa exposta e vulnerável a mucosa intestinal do hospedeiro (LOPES TORRES et al, 2013), favorecendo um contato direto de partes mais internas do tecido intestinal com a microbiota comensal e até mesmo com bactérias que estejam transitando pelo próprio trato gastrointestinal. Isso nos faz refletir sobre a relação destes microorganismos nas alterações promovidas pela infecção. Com o aprofundamento do conhecimento desta interação dos nematoides e bactérias intestinais, podemos fazer um mapeamento das alterações observadas no hospedeiro e qual é o grau de influência do helminto e das enterobactérias neste processo. Por isso, visando aprofundar e melhor descrever o processo de evolução das lesões observadas em fase crônica

desta infecção, neste trabalho pretendemos trazer novas informações sobre as alterações sanguíneas, intestinais e da interação do parasito com a microbiota intestinal do mamífero.

De forma alarmante, a eficácia das drogas mais utilizadas contra as geohelintíases (albendazol e mebendazol) tem diminuído com o tempo. Essas drogas são amplamente distribuídas para quimioterapia preventiva, estando em uso a mais de 50 anos, sendo assim, a ameaça de resistência é real e imediata (MOSER et al, 2017). Observa-se assim a necessidade do estudo de novas formas de tratamento para a geohelminíases.

Há necessidade da investigação do impacto que as bactérias invasoras causam na evolução da infecção, sabendo que existe essa invasão bacteriana na mucosa intestinal e que essa invasão causa um intenso infiltrado inflamatório no sítio da infecção, questiona-se: ao controlar essa invasão bacteriana, sem interferir na atividade dos nematóides, haverá algum impacto na evolução da infecção?

1-OBJETIVO

1.1-Geral

Avaliar qual é o impacto da antibioticoterapia na biologia do parasito, nos aspectos parasitológicos e no processo inflamatório desencadeado na fase crônica da infecção de *Trichuris muris* em camundongos e qual é a influência deste tratamento sobre as enterobactérias.

1.2-Específicos

- Avaliar *in vivo* se a antibioticoterapia vai ter impacto na carga parasitária e na eliminação de ovos nas fezes;
- Verificar se o tratamento com o antimicrobiano interferiu na ovoposição do *T. muris in vitro*;
- Caracterizar os efeitos do tratamento em relação as alterações morfológicas e morfométrica do ceco, provocadas pela infecção;
- Avaliar qual é o impacto do tratamento na microbiota intestinal;
- Verificar se a antibioticoterapia influencia no processo de invasão tecidual bacteriana;
- Quantificar as células peritoneais nos animais infectados submetidos ou não ao tratamento com antibióticos;
- Analisar a influência do tratamento com o antibiótico nas citocinas (IL-10, IL-17, TNF, IFN- γ , IL-2, IL4 e IL-6) em linfonodo mesentérico, no ceco e circulante (soro).

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1-Infecção experimental

Camundongos macho (Swiss webster) com quatro semanas de vida foram infectados por gavagem com 150 ovos embrionados de *Trichuris muris* em 200 µL de água estéril. Os grupos foram formados com 30 animais infectados e 14 controles, gavados apenas com 200µL de água estéril. Após sete, nove e onze dias da infecção, todos os animais foram submetidos ao processo de imunomodulação, inoculados com 50µl de fosfato sódico de dexametasona (8 mg/mL) e acetato de dexametasona (10 mg/mL) (Duo-decadron®) via intramuscular. No 35º dia após a infecção realizamos exames de fezes por sedimentação espontânea pelo método de Hoffman, Pons e Janer, 1934, essa técnica utiliza sedimentação fecal espontânea, nesse método, as amostras fecais são diluídas em água e filtradas através de uma tira de gaze para um vidro de sedimentação cônico, essa técnica é amplamente utilizada em estudos epidemiológicos, devido ao seu baixo custo. Após a confirmação da presença de ovos separamos em novos grupos, onde parte foi submetida ou não ao tratamento com o antimicrobiano piperacilina sódica + tazobactam sódico na concentração de 8 mg/ml (Eurofarma). Dos 30 camundongos infectados, 16 foram submetidos ao tratamento com por via subcutânea e nos outros 14 infectados foi injetado apenas cloreto de sódio 0,9% estéril. No grupo controle, cinco animais foram submetidos ao tratamento com o mesmo fármaco e em nove animais também foi injetado apenas cloreto de sódio 0.9% estéril. Foram nove dias de tratamento e, em seguida, foram pesados e eutanasiados em câmara de CO₂ e necropsiados. Os grupos foram denominados: Controle não tratado (CNT), Controle tratado (CT), Infectado não tratado (INT), Infectado tratado (IT). Esta infecção foi mantida no biotério da disciplina de Parasitologia/FCM e todas os procedimentos realizados no Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto, com base na aprovação do comitê de ética CEUA/UERJ número 020/2018.

2.2-Tratamento com antimicrobiano

A escolha do antimicrobiano, a dosagem, tempo de duração do tratamento e a via de administração utilizadas em nossos experimentos foram baseadas no trabalho de Perez et al. (2011). Segundo o fabricante Eurofarma, a piperacilina sódica + tazobactam sódico é um antimicrobiano de uso hospitalar, indicado para o tratamento de infecções bacterianas

sistêmicas e/ou locais causadas por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos aeróbios e anaeróbios sensíveis à piperacilina/tazobactam ou à piperacilina. Piperacilina/tazobactam apresenta atividade contra a maioria das cepas dos seguintes microrganismos, tanto *in vitro* quanto nas infecções clínicas indicadas: *Staphylococcus aureus* (apenas cepas suscetíveis à meticilina), *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* (excluindo cepas resistentes à ampicilina e negativas para β -lactamase), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, grupo do *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* (apenas cepas suscetíveis à ampicilina ou penicilina), *Staphylococcus epidermidis* (apenas cepas resistentes à meticilina) *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, (apenas cepas suscetíveis à penicilina) *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus do grupo viridans*, *Citrobacter koseri*, *Moraxella catarrhalis*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Salmonella* entérica, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides distasonis*, *Prevotella melaninogenica*.

A piperacilina sódica + tazobactam sódico é uma associação de antibacterianos injetáveis que consiste no antibiótico semissintético piperacilina sódica e o inibidor da β -lactamase tazobactam sódico para administração intravenosa. Assim, piperacilina/tazobactam combina as propriedades de um antibiótico de amplo espectro e um inibidor da β -lactamase. A piperacilina sódica exerce sua atividade bactericida pela inibição da formação do septo e da síntese da parede celular. A piperacilina é ativa *in vitro* contra várias bactérias aeróbicas gram-positivas e gram-negativas e bactérias anaeróbicas. A piperacilina apresenta atividade reduzida contra bactérias que dispõem de β -lactamases que inativam quimicamente a piperacilina e outros antibióticos β -lactâmicos. O tazobactam sódico, que tem muito pouca atividade antimicrobiana intrínseca, devido à sua pequena afinidade com as PBPs, pode restaurar ou potencializar a atividade da piperacilina contra muitos desses organismos resistentes. O tazobactam é um inibidor potente de muitas β -lactamases classe A (penicilinasas, cefalosporinasas e enzimas com espectro estendido), apresentando atividade variável contra carbapenemases classe A e β -lactamases classe D. Como outros antibióticos β -lactâmicos, a piperacilina, com ou sem tazobactam, demonstra atividade bactericida dependente de tempo contra organismos suscetíveis. (Eurofarma, 2013)

2.3-Isolamento da microbiota intestinal

Para a realização do cultivo de bactérias foram colhidas fezes recém eliminadas de camundongos de todos os grupos imediatamente antes da necrópsia. As fezes foram pesadas (1 g), maceradas, diluídas em 3 ml de PBS (Tampão fosfato-salino) e após sedimentação espontânea, 200 μ L do sobrenadante foi retirado e distribuído por diluição em série (1/10, 1/100 e 1/1000), em placas de 96 orifícios (Jet-Biofil).

Para o cultivo utilizamos os meios de cultura MacConkey (Micro Med) e CLED (Oxoid). Em cada placa de cultura semeamos com o auxílio de alça bacteriológica (em triplicata) referente a cada diluição obtida nas placas de 96 orifícios. Após o semeio o material foi incubado em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas. Após a incubação as colônias foram reisoladas em meio TSA (Acumedia) e congeladas à -80 °C em criotubo contendo TSB (Kasvi), para serem analisadas posteriormente.

2.4-Identificação microbiana

A identificação das espécies de bactérias foi realizada através da técnica do MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*) em 25 colônias semeadas em TSA com 22 horas de incubação à 37°C. Essas colônias foram aplicadas em áreas demarcadas da placa de aço inoxidável polida fornecida pelo fabricante do equipamento (MSP 96 target polished steel BC, Bruker Daltonics, Alemanha) e coberto com 1 μ L da matriz HCCA (constituída por uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico a 10mg/ml em acetonitrila a 50% e ácido tricloroacético a 2,5%). Os espectros foram gerados com auxílio do espectrômetro de massa Microflex LT (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando o software FlexControl no modo automático (MBT_FC.par). A calibração do aparelho foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os espectros obtidos foram analisados com auxílio do software BioNumerics v7.1 (Applied Maths, Bélgica), com o qual foi realizada a construção de diagramas baseados no coeficiente de Pearson e no algoritmo Neighbor Joining. Essas análises foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica - LIMM da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2.5-Eliminação de ovos *in vivo* e *in vitro*

Para a realização da contagem de ovos eliminados nas fezes, foram colhidas fezes frescas de cada camundongo dos grupos infectados durante toda a etapa de tratamento (3 coletas) e em três fases distintas do tratamento (antes do tratamento, no quinto e no último dia de tratamento). A contagem dos ovos foi realizada através do método de Kato modificado por Katz e Cols, 1960. O método de Kato-Katz consiste em uma simplificação do método de Kato (KATO & KIMURA, 1954), introduzida por Katz e col. Sobre uma pequena amostra de fezes colocada sobre papel absorvente deposita-se uma tela de nylon que comprimida com auxílio da espátula fará com que parte das fezes passe através de suas malhas. Estas são recolhidas com a espátula e comprimidas no orifício de uma placa perfurada, que já deverá estar sobre uma lâmina, até que este se encontre cheio. Retirar o excesso de fezes com a lateral da espátula. Levantar a placa perfurada, inclinando, inicialmente, uma das extremidades e retirá-la de modo a permanecer sobre a lâmina de vidro um cilindro de amostra fecal. Sobre este cilindro é colocada uma lâmina de celofane, previamente embebida em solução de DIAFIX (solução diafanizadora e fixadora, que permite a conservação dos ovos). (CHAVES et al, 1979). Após a necropsia, o número total de vermes adultos recuperados dos animais infectados foi quantificado.

Em relação a capacidade de ovoposição dos parasitos, apenas fêmeas inteiras e vivas foram selecionadas com auxílio de lupa e colocadas em uma placa de 24 poços estéril. Cinquenta fêmeas recuperadas de cada grupo de animais submetidos ou não à antibioticoterapia foram colocadas em poços separados (10 por poço) contendo 500µL de meio de cultura RPMI com antibiótico e antifúngico (Gentamicina 10µg/mL e Fugisona/Anphotericina B 2,5µg/mL) e incubados à 36°C em estufa de CO₂ por 24h.

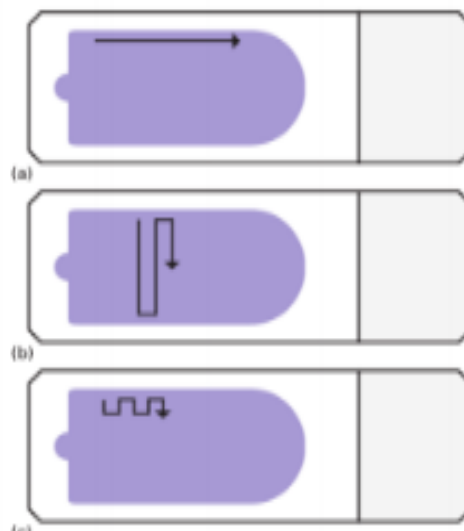
Para a recuperação de ovos os parasitos foram retirados e o meio de cultura foi centrifugado à 3000RPM por 5min para a concentração dos ovos. O sobrenadante foi desprezado e os ovos novamente ressuspensos em água destilada estéril. Ao final das 48h os ovos foram quantificados em alíquotas de 10 µL em quadruplicata e sem seguida feita a média por grupo.

2.6-Parâmetros sanguíneos

O sangue periférico foi coletado da cauda dos animais durante a necropsia para realizar a distensão sanguínea, essas amostras foram secas a temperatura ambiente, fixadas e coradas com o kit de coloração Panótico (Laborclin). A leitura foi realizada por microscopia de luz no microscópio Olympus Standard modelo CX-21, do ponto de vista qualitativo, para realização da contagem diferencial dos leucócitos. A análise das distensões foi feita pelo método de Ameia modificado (Figura 5), com a finalidade de compensar a má distribuição dos leucócitos entre o centro e a borda da distensão, já que os diferentes tipos de leucócitos não se distribuem uniformemente sobre a lâmina (BAIN, 2009). Durante a necropsia também coletamos sangue por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa de 1mL e agulha 25x0,8 mm, sem o uso de anticoagulante. O material foi dividido em dois tubos, uma alíquota de 500 μ L para análise hematológica (EDTA) e uma alíquota de 50 μ L do soro foi centrifugada por 3000 r.p.m por cinco minutos para análises bioquímicas e 100 μ L deste soro foi congelado à -80°C , para a realização das análises das citocinas circulantes.

As análises hematológicas foram realizadas no laboratório de análises clínicas do Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos – ICTB na Fiocruz. Todas as análises foram realizadas em equipamentos certificados e padronizados para dosagens em animais de experimentação.

Figura 5: Esquema demonstrando a técnica utilizada para a leitura da distensão sanguínea pelo método de Ameia modificado segundo o livro *Células sanguínea: um guia prático*.



2.7-Fixação química

Após a necrópsia fragmentos do ceco foram removidos, lavados em solução salina 0,9% estéril e em seguida fixados por imersão em formalina 10% em tampão fosfato, por um período mínimo de 48h antes do processamento.

2.8-Lavado peritoneal e cálculo de macrófagos

Primeiramente as seringas utilizadas para a lavagem peritoneal foram preparadas contendo 5ml de meio de cultura RPMI sem antibiótico e sem antifúngico na cabine de fluxo laminar. Durante a necrópsia, a barriga do animal foi aberta, sem romper a cavidade peritoneal e injetado o meio RPMI, o peritônio foi levemente massageado para desprender os macrófagos e em seguida o meio contendo macrófagos foi recuperado e transferido para um tubo. Os tubos contendo os macrófagos recuperados foram homogeneizados e 10 μ L foram repassados para uma câmara de Neubauer. Após a contagem de macrófagos na câmara foram realizados os cálculos pela fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$.

2.9- Dosagem das citocinas presentes no soro, linfonodo mesentérico e ceco

Após o procedimento para obtenção do lavado peritoneal, os linfonodos mesentéricos e fragmentos com 1,5 mm de diâmetro dos cecos foram retirados com o auxílio de uma caneta de biópsia (Miltex® - Biopsy Punch), em seguida pesados e macerados (500 μ L em meio RPMI) com o auxílio de um êmbolo de seringa e uma peneira. Em seguida, a solução obtida foi transferida para um tubo para a posterior dosagem das citocinas através do método Citometric Bead Array (CBA) utilizando o (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17, (BD Science Catálogo 560485), onde seguiu-se as recomendações do kit.

2.10-Histopatologia

Os fragmentos fixados foram posteriormente desidratados em séries alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e absoluto) por 15 minutos em cada etapa. As amostras foram diafanizadas em Xilol três vezes por 15 minutos cada e infiltradas em parafina em duas séries de 30 minutos.

Os tecidos emblocados em parafina foram cortados (3 μm) com o uso do micrótomo (Laica - modelo RM2125RTS) e coletados em lâminas de vidro. Para a realização da morfometria, as amostras foram acondicionadas na estufa à 60°C durante 30 minutos e diafanizadas em xilol. Em seguida foram hidratadas em série alcóolica decrescente (Absoluto - 90% - 70%) por um minuto em cada etapa. As lâminas foram lavadas em água destilada e introduzidas no primeiro corante, a hematoxilina, por 40 minutos. Após esse período, foram lavadas em água corrente durante quatro minutos e em água destilada por 30 segundos. Em seguida foram imersas em etanol à 80% por um minuto e posteriormente coradas na eosina por dois minutos. Em seguida, foram novamente lavadas em água corrente durante dois minutos, depois em água destilada durante dois minutos, desidratadas em séries alcoólica crescente (70%, 90% e absoluto) e montadas em lâminas permanentes (Entellan®) para posterior análise morfométrica.

2.11-Análise morfométrica do tecido intestinal

Utilizando o microscópio Olympus BX 41, equipado com a câmera digital Bel photomics 5,0 mp, foi feita a análise morfométrica, onde as três camadas teciduais do intestino grosso/ceco (mucosa, submucosa e camada muscular) foram medidas. Para esta análise, foi utilizado o total de cinco animais por grupo. Na objetiva de 10X um campo do corte histológico foi registrado e, com o auxílio do programa Bel View versão 6.2.3.0 (Bel Engineering, Monza Itália), foram feitas cinco medições em diferentes áreas deste tecido para cada uma das três camadas (mucosa epitelial, submucosa e camada muscular) de animais infectados e controle.

2.12-Análise morfológica do tecido intestinal

Para melhor visualização da morfologia das células intestinais, realizamos a coloração com Giemsa. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em estufa à 37 °C, por 30 minutos, banhadas por duas etapas de xilol por cinco minutos em cada, desidratadas em seis séries alcoólicas de etanol absoluto durante um minuto em cada, lavadas em água corrente durante dois minutos e coradas com Giemsa por 30 minutos ou até que ocorresse o espelhamento deste corante sob a lâmina. Em seguida o material foi lavado em água corrente, submetido a uma série de ácido acético por 15 segundos e banhado em álcool isopropílico durante três minutos. Ao finalizar, os tecidos corados foram cobertos com Entellan® e as lâminas permanentes foram montadas. As imagens foram adquiridas com o uso da câmera digital Nikon DS-Ri1 acoplada ao microscópio de luz Nikon Eclipse 80i em sistema de campo

claro e interferencial (DIC). Foram analisados animais de cada grupo, sendo as análises realizadas em triplicata. Para padronizar a região avaliada na análise, quadrados com $50 \mu\text{m}^2$ foram criados com o auxílio do programa Bel View versão 6.2.3.0 (Bel Engineering, Monza Itália). Na região da mucosa intestinal, para identificação e contabilização das células presentes tanto nas criptas quanto no infiltrado entre as criptas, os quadrados de $50 \mu\text{m}^2$ foram localizados entre as criptas de Lieberkühn em sua região basal. Na região da submucosa intestinal, os quadrados de $50 \mu\text{m}^2$, foram centralizados ao longo da camada. Dentro de cada área de $50 \mu\text{m}^2$ foi quantificado o número e os tipos de células presentes. Procuramos utilizar no tecido o mesmo campo usado na morfometria. Para a identificação de bactérias nos tecidos infectados e controles observamos toda a extensão da mucosa e submucosa sob objetiva de imersão.

2.13-Análises estatísticas

Com os dados obtidos em cada experimento, foram realizadas análises estatísticas através dos softwares Graph Pad Prism 5 e Graph Pad InStat, comparando os grupos controles tratados e não tratados e infectados tratados e não tratados. Utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney para a análise da morfometria e das dosagens de citocinas, onde consideramos como significativo $P < 0,05$.

3-RESULTADOS

Os camundongos iniciaram a eliminação de ovos nas fezes no 35º dia após a infecção. Pode-se observar que estes camundongos apresentavam perda de peso em relação aos controles, porém não houve diferença significativa. A média do peso dos camundongos controles sem tratamento antimicrobiano foi de $36,50 \text{ g} \pm 3,16$ e dos submetidos ao tratamento foi de $38,86 \text{ g} \pm 2,65$. A média do peso dos camundongos infectados sem tratamento foi de $36,82 \text{ g} (\pm 2,70)$ e dos animais infectados e submetidos a antibioticoterapia foi de $37,47 \text{ g} (\pm 4,82)$ (Tabela 1). As fezes dos animais infectados apresentaram um aspecto purulentas e/ou aquosas, porém não observamos diferença neste aspecto em relação ao tratamento. Durante a necrópsia foi possível identificar alterações macroscópicas nos grupos, o intestino grosso (ceco) dos animais infectados não submetidos ao tratamento com antimicrobiano apresentou um aspecto hipertrofiado e enrijecido em comparação com os animais que foram submetidos ao tratamento antimicrobiano e aos controles. Em relação a carga parasitária foram recuperados uma média de $47 (\pm 39,65)$ vermes por animal infectado sem tratamento e $31,93 (\pm 13,24)$ vermes por animal infectado e tratados, apesar de ter sido observado um número maior de vermes nos animais que não foram submetidos ao tratamento antimicrobiano, ao comparar estatisticamente esses valores, não foi possível observar diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,56$) (Tabela 1).

Tabela 1- Peso dos camundongos, número de vermes recuperados na necropsia e taxa de ovoposição *in vitro* dos camundongos.

Grupos	Peso em g \pm DP	Número de vermes recuperados	Média de ovos por fêmea
CNT	$36,50 \pm 3,16$	-	-
CT	$38,86 \pm 2,65$	-	-
INT	$36,82 \pm 2,70$	$47 \pm 39,65$	$0,25 \pm 17$
IT	$37,47 \pm 4,82$	$31,93 \pm 13,24$	$0,24 \pm 21$

Legenda: CNT-Controle não tratado. CT-Controle tratado. INT-Infectado não tratado. IT-Infectado tratado.

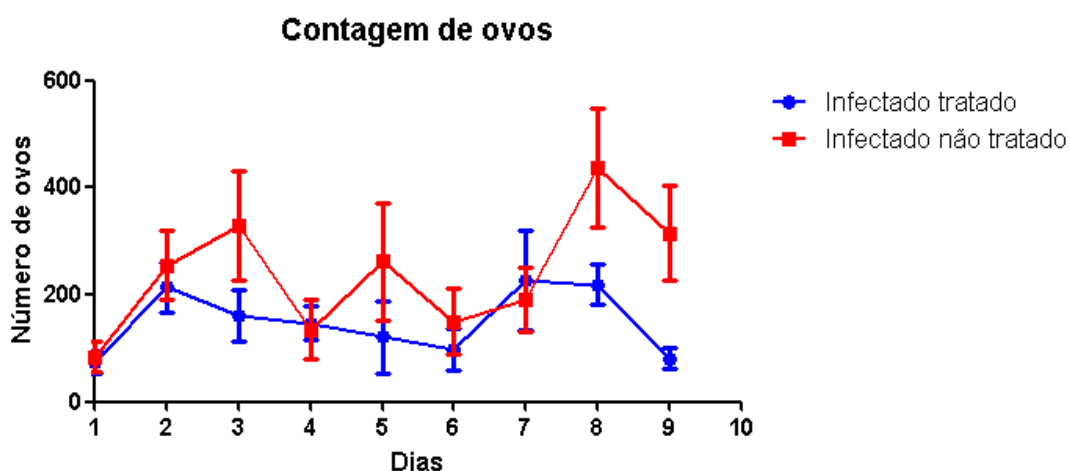
\pm - Desvio padrão.

Fonte: A Autora, 2019

3.1- Eliminação de ovos nas fezes e ovoposição *in vitro*

Foi realizada a quantificação de ovos eliminados nas fezes e de vermes adultos recuperados durante a necropsia, não havendo diferença significativa de ovos eliminados *in vivo* (INT: $188,85 \pm 73,55$ e IT: $155,81 \pm 62,74$ ($P=0,29$)) (Gráfico 1) e *in vitro* ($P=0,08$) entre os grupos analisados (Tabela 1).

Gráfico 1- Contagem de ovos *in vivo* pelo método Kato-Katz



Legenda- Quantificação do número de ovos de *Trichuris muris* eliminados nas fezes dos camundongos tratados e não tratados com antimicrobiano a partir do primeiro dia antes do tratamento até o último dia em que foram submetidos a antibioticoterapia. Estatística: Teste Mann-Whitney.

Fonte: A Autora, 2019

3.2-Dosagens sanguíneas

Ao analisarmos o hemograma, as séries vermelhas dos dois grupos controles (CNT: $10,77 \pm 0,72$; CT: $10,71 \pm 0,08$) e dos dois grupos infectados (INT: $10,25 \pm 2,16$; IT: $10,02 \pm 0,51$), observamos que eles não apresentaram diferença significativa no número de hemácias ($P= 0,47$). Também não foi possível observar diferença significativa no hematócrito dos grupos controles (CNT: $58,30 \pm 4,45$; CT: $57,85 \pm 1,34$) e nem nos grupos infectados (INT: $57,3 \pm 9,19$; IT: $54,08 \pm 0,69$) ($P=0,44$). A hemoglobina apresentou-se normal entre os grupos controles (CNT: $15,97 \pm 0,93$; CT: $15,80 \pm 0,42$) e entre os grupos infectados (INT: $15,6 \pm 1,70$; IT: $14,73 \pm 0,69$), sem diferença significativa ($P= 0,26$). Na análise da série branca do hemograma, houve aumento no número de leucócito total no grupo que não foi submetido ao

tratamento (INT: 14,7±6,93), porém sem diferença significativa quando comparado com o grupo infectado tratado (IT: 9,27±1,75) (P=0,62) (Tabela 2).

Tabela 2- Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos controles e infectados por *Trichuris muris*.

Dosagens sanguíneas	Grupos			
	Controle não tratado (CNT) (média±D.P)	Controle tratado (CT) (média±D.P)	Infectado não tratado (INT) (média±D.P)	Infectado tratado (IT) (média±D.P)
WBC (mil/mm ³)	10,33±6,22	10,50±1,98	14,7±6,93	9,27±1,75
RBC (milhões/mm ³)	10,77±0,72	10,71±0,08	10,25±2,16	10,02±0,51
HGB (g/dl)	15,97±0,93	15,80±0,42	15,6±1,70	14,73±0,69
Hct (%)	58,30±4,45	57,85±1,34	57,3±9,19	54,08±0,69
MCV (fm ³)	54,00±0,87	54,00± 1,70	56,25±2,90	53,98±1,14
MCH (pg)	14,83±0,21	14,75±0,49	15,4±1,56	14,68±0,37
MCHC (g/dl)	27,40±0,53	27,30±0,14	27,3±1,41	27,25±0,23
Plaquetas(mil/mm ³)	1235,0±291,01	738,50±224,15	1353,5±318,91	1192,0±225,29

Legenda: WBC-Glóbulos brancos. RBC-Glóbulos vermelhos. HGB-Hemoglobina. Hct-Hematócrito. MCV-Volume corpuscular médio. MCH-Hemoglobina corpuscular média. MCHC-Concentração de hemoglobina corpuscular média. CNT-Controle não tratado. CT-Controle tratado. INT-Infectado não tratado. IT-Infectado tratado. DP-Desvio padrão.

Fonte: A Autora, 2019

3.3-Distensões sanguíneas

Analisando as distensões sanguíneas foi possível observar uma eosinofilia nos infectados, em especial no grupo que foi submetido ao tratamento antimicrobiano e sem alterações nas demais células como basófilos, bastões, segmentados, linfócitos e monócitos (Tabela 3).

Tabela 3- Média de células encontradas nas leituras das distensões sanguíneas.

Célula	Basófilo (média±D.P)	Eosinófilo (média± D.P)	Bastão (média±D.P)	Segmentado (média±D.P)	Linfócito (média±D.P)	Monócito (média±D.P)
CNT	0	1,50±0,71	1	40,67±8,74	56,67±6,43	3
CT	0	2,67±1,15	0	36,88±11 26,55±12,9	61,38±12,11	3,6±0,89
INT	7	4,73±4,45*	0	4	65,27±13,54	3,14±3,02
IT	1±0	15,44±17,74*	0	20,88±9,55	63,67±14,09	6,75±4,37
Estatística	P = 0,4909	P = 0,0484*	-	P = 0,4807	P = 0,3908	P = 0,1453

*(p < 0,05). Análise estatística pelo Teste Mann-Whitney. CNT-Control não tratado. CT-Control tratado. INT-Infestado não tratado. IT-Infestado tratado. DP-Desvio padrão.

Fonte: A Autora, 2019

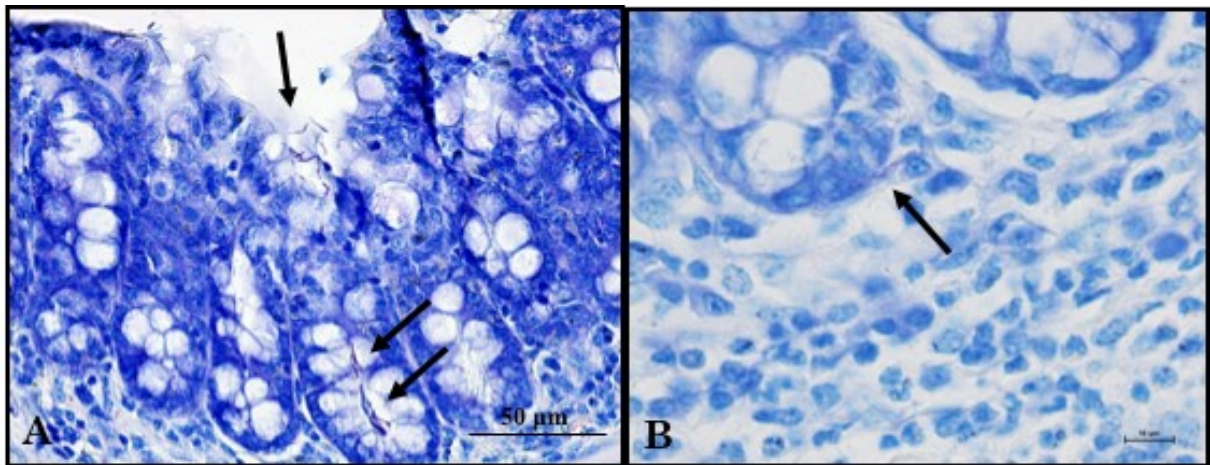
3.4-Morfometria

A análise morfométrica do intestino grosso (ceco) (Gráfico 2) dos animais infectados, nos permitiu identificar um espessamento significativo $P < 0,0001$ das três camadas: mucosa, submucosa e camada muscular nos animais infectados em relação aos controles. Não observamos diferença em relação a morfometria do intestino entre os animais controle e submetidos ou não ao tratamento (Figura 7).

Nos animais infectados foi identificado um infiltrado polimorfonuclear moderado, com poucos macrófagos na mucosa intestinal. Na submucosa houve intenso infiltrado polimorfonuclear e linfoplasmocitário. Na mucosa epitelial houve diferença significativa no espessamento entre os grupos infectados tratados com antimicrobiano e não tratados ($P=0,04$). Na camada muscular não observamos diferença entre os grupos infectados ($P=0,56$) submetidos ou não ao tratamento. O destaque da ação do antibiótico se deu na redução da espessura da submucosa dos animais infectados tratados. Foi possível observar uma redução significativa no espessamento da submucosa epitelial dos animais tratados, com uma redução do infiltrado inflamatório, nesta camada o que impactou significativamente na espessura da submucosa epitelial dos animais deste grupo em comparação com os animais infectados e não tratados ($P=0,04$) (figura 8). Também vale ressaltar que nos animais infectados e tratados não foi

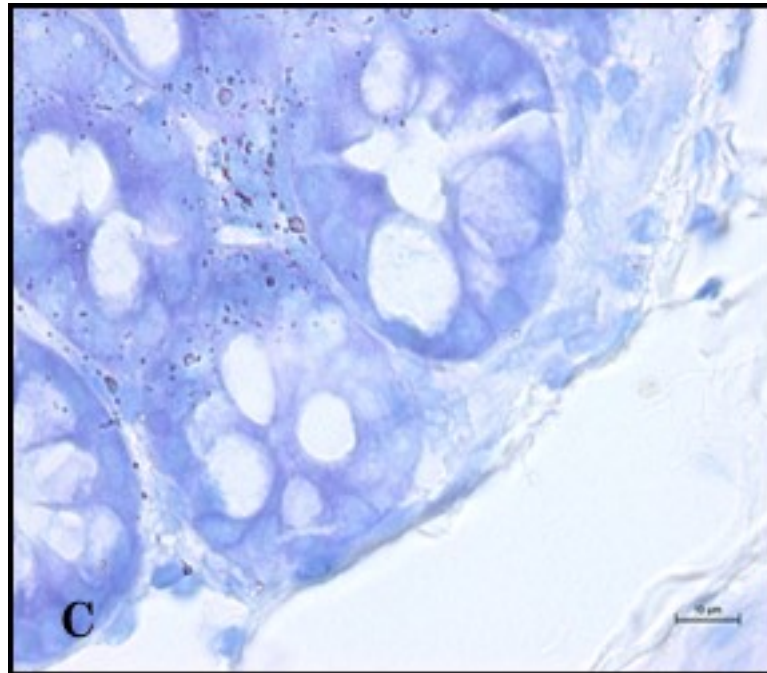
possível identificar a presença de bactérias invasoras na submucosa epitelial. Estes microrganismos (cocos/bastonetes) foram identificados apenas na submucosa dos animais infectados que não foram submetidos a antibioticoterapia (Figura 6).

Figura 6 - Cortes histológicos do ceco de camundongos controles e infectados por *T. muris*, corados por Giemsa observando a visão geral do tecido intestinal, mostrando bactérias invasoras nos animais que não foram submetidos ao tratamento.



Legenda: A e B- Corte histológico do ceco de camundongos infectados não tratados com antimicrobiano mostrando bactérias em destaque (—>).

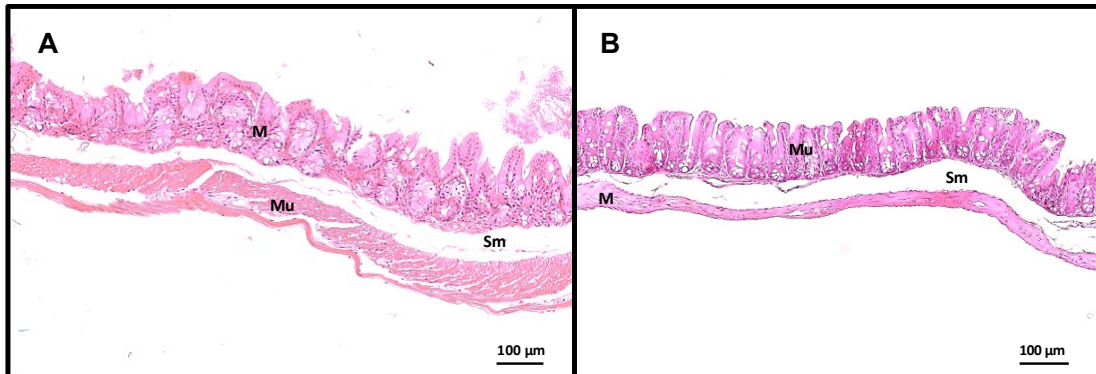
Fonte: A Autora, 2019



Legenda: C- Corte histológico do ceco de camundongos infectados tratados com antimicrobiano, não sendo observadas bactérias na submucosa do ceco.

Fonte: A Autora, 2019

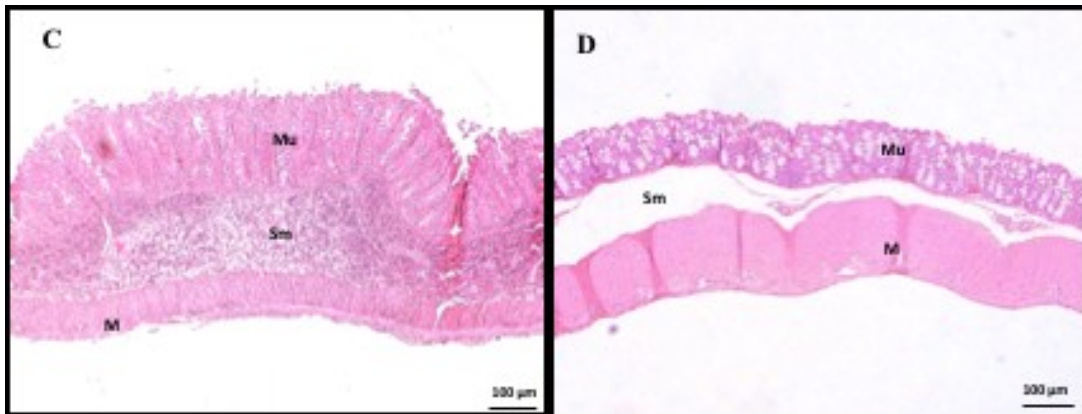
Figura 7- Ceco de animal controle não tratado comparado com o ceco de animal controle tratado com antimicrobiano.



Legenda: Corte histológico corado por HE do ceco de camundongos controle. (A) Animais não tratados com antimicrobiano. (B) animal tratado com antimicrobiano. MU- Mucosa; Sm - Submucosa; M - Camada Muscular

Fonte: A Autora, 2019

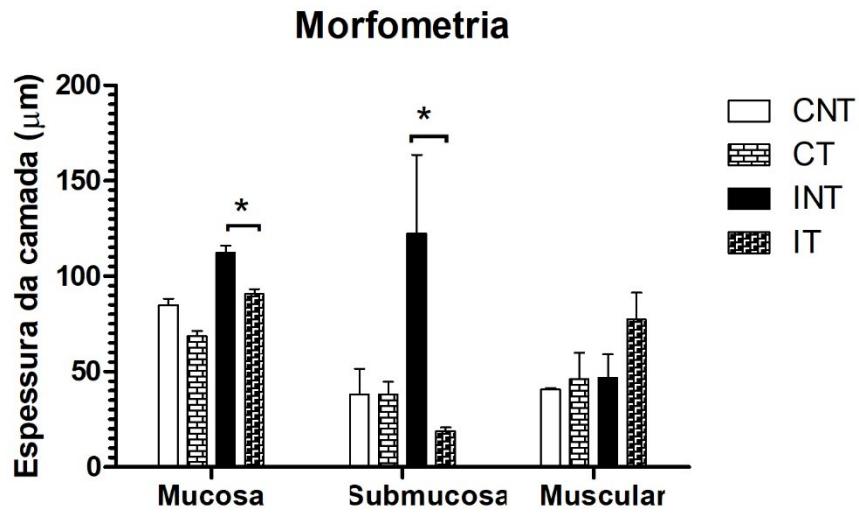
Figura 8- Ceco de animal infectado não tratado comparado com o ceco de animal infectado tratado com antimicrobiano.



Legenda: Corte histológico corado por HE do ceco de camundongo infectado. (A) Animal não tratado com antimicrobiano. (B) Animal tratado com antimicrobiano. Barra de escala: 100μm. MU- Mucosa; Sm - Submucosa; M - Camada Muscular.

Fonte: A Autora, 2019

Gráfico 2- Análise morfométrica das camadas do intestino grosso de animais controles e infectados por *T. muris*.

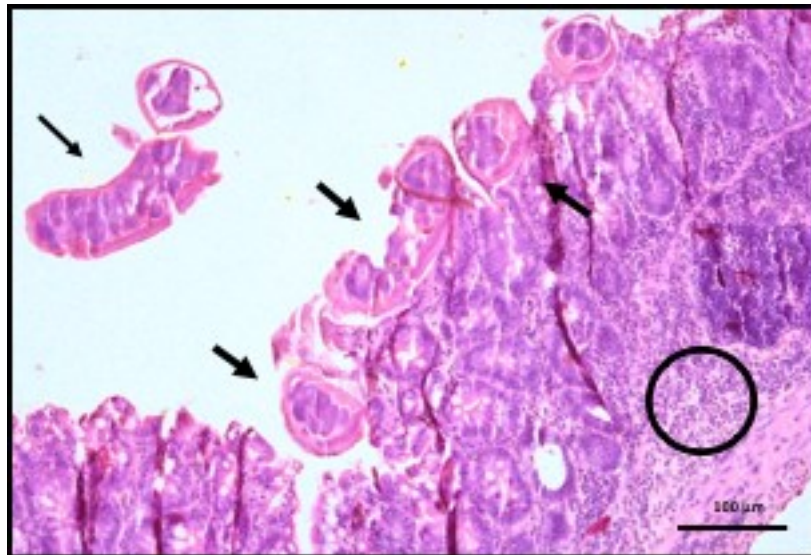


Legenda: CNT-Controlle não tratado. CT-Controlle tratado. INT-Infectado não tratado. IT-Infectado tratado.

*Houve diferença significativa ($p < 0,05$). Análise estatística pelo Teste Mann-Whitney.

Fonte: A Autora, 2019

Figura 9-Parasito inserido no tecido de um animal infectado não tratado



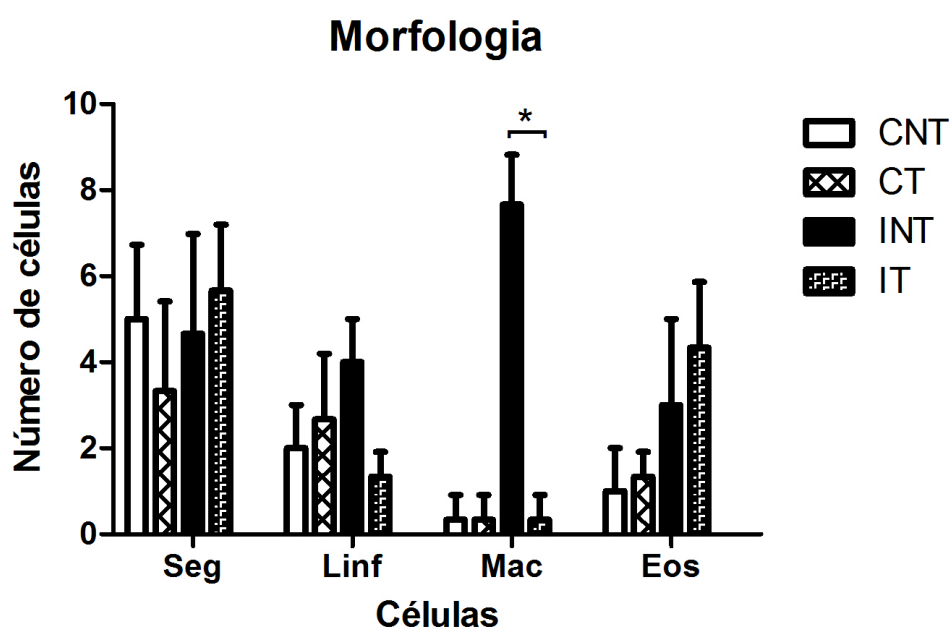
Legenda: Presença do parasito inserido no tecido (↑) e, em destaque no círculo, o infiltrado celular na mucosa intestinal de um animal infectado não tratado.

Fonte: A Autora, 2019

3.5- Morfologia da submucosa intestinal

Na análise morfológica da região da submucosa intestinal dos camundongos infectados foi possível observar que o aumento no espessamento, evidenciado na morfometria, se deu devido a um intenso infiltrado inflamatório em comparação com os grupos controles (eosinófilos; $P=0,0435$; neutrófilos; $P=0,0355$; linfócitos; $P=0,0445$) e com presença significativa de macrófagos ($P=0,0188$). Nos camundongos do grupo controle observamos poucos macrófagos, raros eosinófilos e raros linfócitos. Mesmo observando um aumento de eosinófilos no grupo infectado tratado em comparação com o não tratado, não houve diferença significativa quando comparamos ao tratamento antimicrobiano (eosinófilos; $P= 0,3739$; neutrófilos; $P=0,5263$; linfócitos; $P=0,9146$). Foi possível observar uma diferença significativa no número de macrófagos, onde foi observado um maior número dessas células no grupo infectado que não foi submetido ao tratamento ($P=0,0039$).

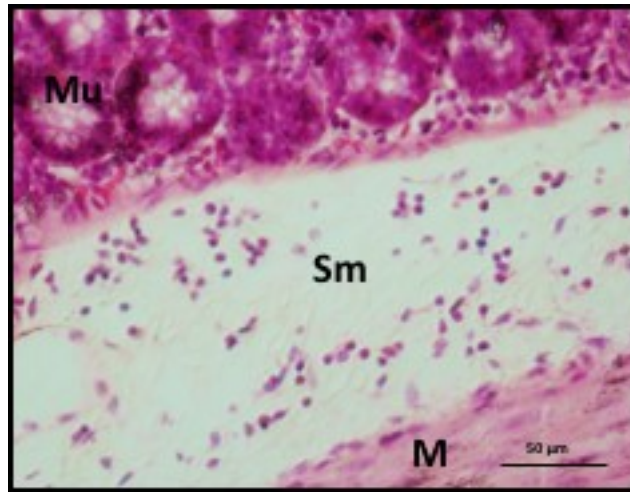
Gráfico 3- Análise morfológica da submucosa do intestino grosso de animais controles e infectados por *T. muris*.



Legenda: CNT-Controle não tratado. CT-Controle tratado. INT-Infected não tratado. IT-Infected tratado. Seg-Neutrófilo segmentado. Linf-Linfócito. Mac-Macrófagos. Eos-Eosinófilo. *($p < 0,05$). Análise estatística pelo Teste Mann-Whitney.

Fonte: A Autora, 2019

Figura 10- Presença de infiltrado inflamatório na submucosa do ceco de um animal infectado que não foi submetido ao tratamento com antimicrobiano.



Legenda: Infiltrado inflamatório da submucosa do ceco de um animal infectado apresentando eosinófilos. MU- Mucosa; SU - Submucosa; M - Camada Muscular.

Fonte: A Autora, 2019

3.6-Coprocultura

A coprocultura foi realizada para verificar se a presença do nematoide associado a antibioticoterapia influenciaria na composição da microbiota bacteriana intestinal dos animais. O resultado da coprocultura nos forneceu o isolamento de colônias de anaeróbios totais: *Escherichia coli* e *Enterococcus spp* nos grupos controles e dos animais que não foram submetidos à antibioticoterapia. No entanto, nos animais que foram submetidos à antibioticoterapia tanto no grupo controle quando infectado não apresentaram crescimento microbiano na coprocultura.

Tabela 4- Identificação microbiana das fezes dos camundongos através da técnica do MALDI-TOF.

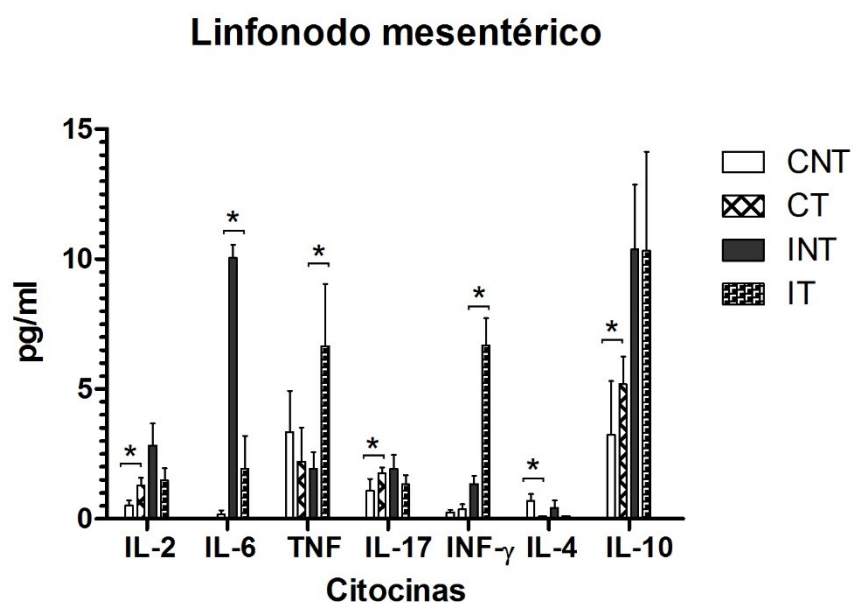
Microorganismo	CNT	CT	Score	INT	IT	Score
<i>Escherichia coli</i>	X	-	2.316	X	-	2.386
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	X	-	2.468
<i>Enterococcus gallinarum</i>	-	-	-	X	-	2.038

Nível de espécie (score ≥ 2) e nível de gênero (score $\geq 1,7$). X=presente.
 Fonte: A Autora, 2019

3.7-Dosagem de citocinas

As citocinas pró-inflamatórias (Th-1) - IL-2, IL-6, TNF, IL-17, IFN- γ e anti-inflamatórias (Th2) - (IL-4, IL-10) foram dosadas nos linfonodos mesentéricos recuperados dos animais dos diferentes grupos. Nossos resultados estão expressados no gráfico 4.

Gráfico 4- Dosagem de citocinas do linfonodo mesentérico



Legenda: Gráfico demonstrando as dosagens de IL-2, IL-6, TNF, IL-17, IFN- γ , IL-4 e IL-10 em linfonodo mesentérico de camundongos. CNT – Controle não tratado; CT – Controle tratado; INT – Infectado não tratado; IT – Infectado tratado. * ($p < 0,05$). Análise estatística pelo Teste Mann-Whitney. Fonte: A Autora, 2019

Analisando primeiramente as citocinas pró-inflamatórias, observamos que a dosagem de IL-2 no linfonodo mesentérico apresentou diferença significativa comparando os dois grupos controles ($p=0,03$), onde o grupo submetido ao tratamento apresentou as dosagens mais elevadas do que o grupo que não foi submetido ao tratamento. Nos grupos de animais infectados, mesmo sendo observado um leve aumento na dosagem dessa citocina no linfonodo dos animais infectados não tratados, não houve diferença significativa quando comparados com os infectados tratados ($p=0,54$).

Na dosagem de IL-6, não foi possível observar diferença na dosagem dessa citocina nos linfonodos dos grupos controles (Linfonodo $p=0,41$), enquanto a dosagem de IL-6 nos grupos infectados apresentou uma diferença muito significativa (Linfonodo $p<0,001$), onde os animais infectados não tratados com antimicrobianos apresentaram valores aumentados.

As dosagens de TNF no linfonodo mesentérico dos animais pertencentes aos grupos controles não apresentaram diferença significativa ($p=0,3$), porém, quando esta citocina foi dosada no linfonodo dos animais infectados, foi observada uma diferença significativa ($p=0,04$) entre os grupos. Os animais que foram submetidos ao tratamento apresentaram níveis de TNF mais elevados.

Em relação a dosagem de IL-17 no linfonodo mesentérico, a dosagem dos grupos controles apresentaram diferença significativa ($p=0,03$), onde os animais submetidos ao tratamento com antimicrobiano apresentaram elevação nos valores das dosagens, enquanto nos grupos infectados não houve diferença da dosagem desse material ($p=0,54$).

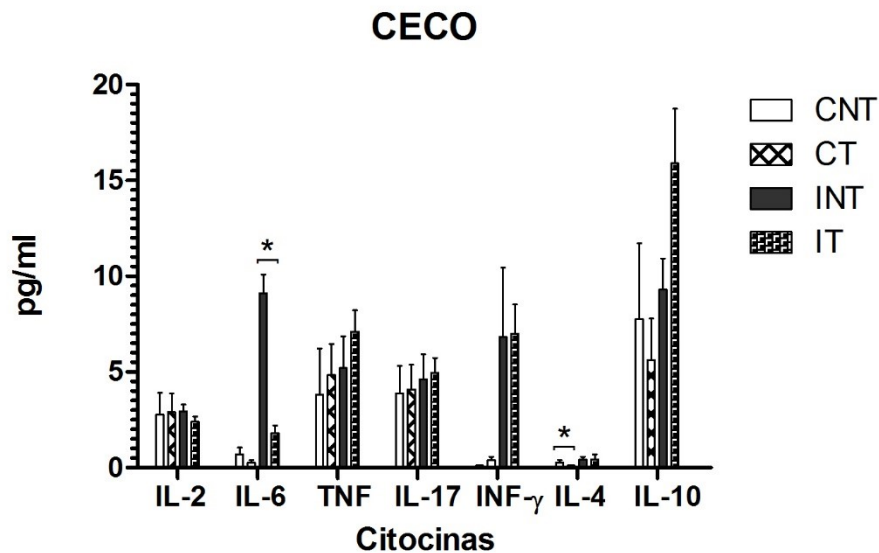
Analisando as dosagens de IFN- γ no linfonodo foi possível verificar que não houve diferença entre as dosagens dos animais dos grupos controles ($p=0,7$), porém esses valores apresentaram diferença muito significativa quando comparados os grupos infectados ($p=0,001$), onde os animais que foram submetidos ao tratamento antimicrobiano apresentaram valores elevados.

Partindo para a análise das citocinas anti-inflamatórias, observamos que a dosagem de IL-4 no linfonodo mesentérico dos grupos controles apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$), onde os animais que não foram submetidos ao tratamento antimicrobiano apresentaram valores elevados. A dosagem dessa citocina no linfonodo dos grupos infectados não apresentou diferença significativa ($p=0,1$).

Os resultados da dosagem de IL-10 no linfonodo dos grupos controles apresentaram diferença significativa ($p=0,04$) onde os animais que foram submetidos ao tratamento antimicrobiano apresentaram taxas mais elevadas dessa citocina. Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos infectados ($p=0,1$).

As citocinas pró-inflamatórias (Th-1) - IL-2, IL-6, TNF, IL-17, IFN- γ e anti-inflamatórias (Th2) - (IL-4, IL-10) de linfócitos foram dosadas no ceco e os resultados estão expressados no gráfico 5.

Gráfico 5- Dosagem de citocinas do ceco



Legenda: Gráfico demonstrando as dosagens de IL-2, IL-6, TNF, IL-17, IFN- γ , IL-4 e IL-10 no ceco de camundongos. CNT – Controle não tratado; CT – Controle tratado; INT – Infectado não tratado; IT – Infectado tratado. *Houve diferença significativa ($p < 0,05$). Análise estatística pelo Teste T.

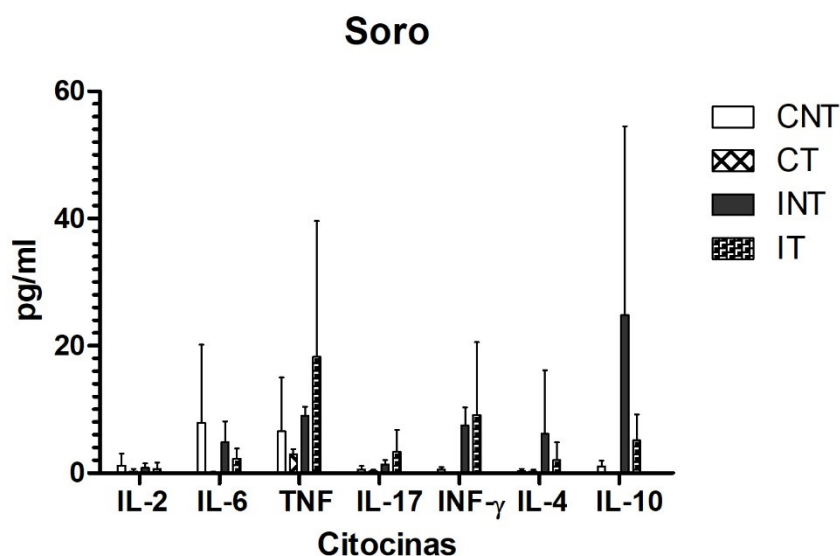
Fonte: A Autora, 2019

Analisando primeiramente as citocinas pró-inflamatórias, observamos que a dosagem de IL-2 no ceco não apresentou diferença significativa comparando os dois grupos controles ($p=0,72$) e nem comparando os dois grupos infectados ($p=0,46$). Na dosagem de IL-6, não foi possível observar diferença na dosagem dessa citocina no ceco dos grupos controles ($p=0,21$), enquanto a dosagem de IL-6 no ceco dos grupos infectados apresentou uma diferença muito significativa ($p=0,004$), onde os animais infectados não tratados com antimicrobianos apresentaram valores aumentados. As dosagens de TNF no ceco dos animais pertencentes aos grupos controles não apresentaram diferença significativa ($p=0,44$) e os grupos infectados também não apresentaram diferença considerada estatisticamente significativa ($p=0,42$). As dosagens de IL-17 no ceco dos grupos controles não apresentaram diferença significativa ($p=0,39$) e nem nos animais infectados ($p=0,44$). Os valores da dosagem de IFN- γ no ceco dos grupos controles não apresentaram diferença significativa ($p=0,43$), assim como nos grupos infectados ($p=0,84$).

Partindo para a análise das citocinas anti-inflamatórias, observamos que a dosagem de IL-4 no ceco dos grupos controles apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$), onde os animais que não foram submetidos ao tratamento antimicrobiano apresentaram valores elevados, porém, a dosagem dessa citocina no ceco dos grupos infectados não apresentou diferença significativa ($p=0,67$). Os resultados da dosagem de IL-10 no ceco dos grupos controles não apresentaram diferença significativa ($p=0,56$), assim como nos grupos infectados ($p=0,54$).

As citocinas pró-inflamatórias (Th1) - IL-2, IL-6, TNF, IL-17, IFN- γ e anti-inflamatórias (Th2) - (IL-4, IL-10) de linfócitos foram dosadas no soro os resultados estão expressados no gráfico 6.

Gráfico 6- Dosagem de citocinas do soro



Legenda: Gráfico demonstrando as dosagens de IL-2, IL-6, TNF, IL-17, IFN- γ , IL-4 e IL-10 no soro de camundongos. CNT – Controle não tratado; CT – Controle tratado; INT – Infectado não tratado; IT – Infectado tratado. Fonte: A Autora, 2019

Analisando primeiramente as citocinas pró-inflamatórias, observamos que a dosagem de IL-2 no soro dos grupos controles não apresentaram diferença significativa ($p=0,80$) e nem nos grupos infectados ($p=0,80$). Na dosagem de IL-6, não foi possível observar diferença na dosagem dessa citocina no soro dos grupos controles ($p=0,12$), assim como nos grupos infectados ($p=0,13$). As dosagens de TNF no soro dos animais pertencentes aos grupos controles não apresentaram diferença significativa ($p=0,57$). Os valores da dosagem de TNF no soro dos animais infectados tratados com antimicrobianos apresentaram-se aumentados quando comparados com os animais infectados não tratados, porém essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa (Soro $p=0,39$). Em relação a dosagem de IL-17, não foi possível observar diferença na dosagem dessa citocina no soro dos grupos controles ($p=0,39$), assim como nos grupos infectados ($p=0,13$). Analisando as dosagens de IFN- γ no soro, não se observou diferença significativa nos grupos controles ($p=0,12$) e nem nos grupos infectados ($p=0,39$).

Partindo para a análise das citocinas anti-inflamatórias, observamos que a dosagem de IL-4 no soro dos grupos controles não apresentou diferença (Soro $p=0,80$) e nem nos grupos

tratados (Soro $p=0,93$). Os resultados da dosagem de IL-10 no soro dos grupos controles não apresentaram diferença significativa ($p=0,1$) Apesar de terem sido observados valores aumentados de IL-10 no soro dos animais infectados que não foram submetidos ao tratamento quando comparados aos infectados tratados, não houve diferença significativa entre os grupos (Soro $p= 0,13$).

3.8-Contagem de Macrófagos peritoneais

Após a lavagem peritoneal, foi feita a contagem das células recuperadas. Nos animais controles que foram submetidos ao tratamento com antimicrobiano foram recuperados uma média de $4,48 \times 10^6$ macrófagos e dos animais controles que não foram submetidos ao tratamento uma média de $3,49 \times 10^6$ macrófagos, não havendo diferença significativa entre esses grupos ($p=0,34$). Nos animais infectados que não foram submetidos ao tratamento foram recuperados uma média de $1,26 \times 10^7$ macrófagos e nos infectados submetidos ao tratamento recuperamos $1,70 \times 10^7$ macrófagos, não havendo também, diferença estatisticamente significativa entre os grupos infectados ($p=0,17$). No entanto, quando se compara os grupos controles (tratados e não tratados) e os grupos infectados (tratados e não tratados) é possível observar diferença significativa entre os grupos ($p=0,006$), onde os animais infectados apresentaram mais macrófagos no peritônio. Estes dados mostram que a infecção recruta macrófagos para o peritônio, mas que o tratamento não influenciou nesta migração das células fagocíticas.

4-DISCUSSÃO

A infecção estabelecida pelos nematoides *Trichuris* spp. promove lesões no epitélio intestinal desencadeando efeitos graves para o hospedeiro, como: rupturas na mucosa epitelial, hipertrofia das três camadas intestinais e invasão de bactérias na mucosa e submucosa intestinal (LOPES-TORRES et al., 2013; OLIVEIRA, 2017). Efeitos mecânicos agressivos também podem ser observados na infecção desenvolvida pelos Ancilostomídeos, estes nematoides inserem seus dentes cuticulares no epitélio intestinal, ancorando-se desta forma no tecido, enquanto os tricurídeos implantam sua região anterior por debaixo do epitélio e, ao se deslocarem, promovem rupturas na superfície da mucosa do intestino grosso (HALL et al., 2008;).

Animais infectados com *T. muris* apresentaram uma queda significativa no número de hemácias e no hematócrito. (OLIVEIRA, 2017), porém em nossos resultados não identificamos alterações no número de hemácias e hematócrito dos grupos analisados. Também não observamos perda de peso significativa nos animais infectados em comparação com o grupo controle, dado diferente do encontrado por Oliveira (2017), onde foi identificada uma perda de peso significativa nos animais infectados quando comparados com o grupo controle. Vale ressaltar que em nosso trabalho os animais foram infectados com 150 ovos, e no trabalho de Oliveira (2017) a infecção foi realizada com 300 ovos, mostrando que a carga parasitária impacta de forma significativa nestes parâmetros indicados acima.

Relatos de casos clínicos destacam infiltrações eosinofílicas localizadas na mucosa intestinal, porém sem eosinofilia nos parâmetros sanguíneos (KYUNG-SUN et al., 2009). Em infecção experimental com *T. muris* em camundongos isso também foi mostrado (OLIVEIRA, 2017) e estes dados corroboram com o que encontramos nos animais infectados, porém somente no grupo não tratado. Na análise das distensões sanguíneas e ao caracterizar o infiltrado celular na submucosa do ceco, observamos eosinofilia nos animais infectados e tratados em relação ao grupo controle e aos infectados e não tratados. Ressaltamos que uma das características sanguíneas nas infecções provocadas por helmintos, incluindo nematoides intestinais, é o aumento de eosinófilos no sangue (HUANG et al 2016), porém, como destacado acima isso não ocorre na tricuriase. Como a antibioticoterapia controlou a colonização bacteriana intestinal e eliminou as bactérias invasivas, o sistema imune pode ter direcionado a sua resposta mais

especificamente ao nematoide, recrutando as células que tem um papel importante na resposta imune contra helmintos.

Infecção intestinal causada por bactérias em crianças com idades entre 1 e 5 anos pode causar distensão abdominal, vômitos e diarreia contendo pus (SINGH et al. 1995). O fato de termos encontrado fezes purulentas e/ou aquosas em alguns animais infectados por *T. muris*, pode estar relacionado a uma resposta imune resultante da invasão de bactérias no tecido intestinal, porém não observamos diferença na consistência das fezes dos animais infectados e não tratados em comparação com os tratados com antibiótico.

Em nossos resultados de histopatologia mostramos que a infecção desencadeia um aumento no número e no volume das células caliciformes (hiperplasia e hipertrofia) ao comparar com os grupos controles. De acordo com o estudo realizado por Wang et al 2016, receptores Nod intracelular teriam um papel fundamental na hiperplasia das células caliciformes intestinais e que esse mecanismo é induzido pelos nematoides *T. muris*. Em nossos resultados foi possível observar uma maior quantidade de células caliciformes nos grupos infectados que foram submetidos ao tratamento com o antibiótico ao comparar com os animais infectados e não tratados, dados esses que corroboram com os de Schopf e colaboradores 2002, que também observaram uma maior quantidade de células caliciformes na mucosa intestinal de camundongos infectados com *T. muris*, deficientes de IL-10 e tratados com doxicilina. Também foi possível observar uma diminuição considerada significativa do número de monócitos e linfócitos na submucosa dos animais infectados que não foram submetidos ao tratamento quando comparados com os animais infectados tratados.

Em nossos resultados mostramos um infiltrado polimorfonuclear na submucosa intestinal (eosinófilos e neutrófilos) esse infiltrado já foi demonstrado anteriormente também em infecção experimental (OLIVEIRA, 2017) e descrito em pacientes com tricuriase na Coreia (KYUNG-SUN et al. 2009). Chung e colaboradores (2016) em um estudo onde camundongos infectados com *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (*S. Tm*) foram submetidos a um tratamento diário com ciprofloxacina, iniciado 1 dia após a infecção, observaram a redução da carga de *S. Tm* no ceco para níveis quase indetectáveis em poucas horas, mas a patologia da mucosa resolveu-se com uma cinética mais lenta, onde a ausência da inflamação da mucosa foi observada somente após 9 dias de tratamento com antibiótico. Esse infiltrado inflamatório no tecido apresentou células com um perfil pró-inflamatório, com acúmulo de neutrófilos,

monócitos que expressam citocinas IL-1 e TNF. Conforme a redução da inflamação, foi observada uma remodelação desse perfil, com a redução na abundância de neutrófilos e a diferenciação de monócitos pró-inflamatórios em macrófagos expressando IL-10. Estes resultados sugerem que a produção de IFN- γ durante a infecção aguda por *S. Tm* promove um ambiente inflamatório da mucosa e restringe a mudança para a homeostase do tecido intestinal. Nossos resultados mostram um aumento da produção de IL-10 no ceco dos animais infectados que foram submetidos ao tratamento com antimicrobiano, sugerindo assim, que o aumento na secreção dessa citocina pode estar relacionada com uma resposta benéfica para o restabelecimento da homeostase do tecido. *As lesões teciduais promovidas pelo verme podem estar liberando para o meio extracelular alarminas que estão influenciando o linfonodo a responder de forma pró-inflamatória, com o aumento da secreção de TNF e IFN- γ . A diferença entre essas citocinas sob influência do tratamento pode estar associada a uma dedicação maior dessas células ao sítio da infecção.* Dolowschiak e colaboradores 2016 também sugerem que IFN- γ tem um papel de retardar a resolução da inflamação intestinal.

Schopf e colaboradores (2002) ao analisar o ceco de camundongos infectados por *T. muris* deficientes em IL-10, observou que a submucosa continha um intenso infiltrado inflamatório com os eosinófilos formando grande parte dessas células. Os autores também observaram uma extrema redução na produção de muco nas células epiteliais da mucosa. Após essas avaliações sugeriram que a morte dos camundongos, no dia 25 após a infecção, poderia estar associada ao crescimento de bactérias oportunistas desencadeado pelo dano intestinal induzido pelas larvas de *T. muris* ao tentarem estabelecer a infecção. Klementowicz e colaboradores 2012 ao mapear o ciclo de *T. muris*, constataram que no dia 25 as larvas já seriam L4, ainda em desenvolvimento para a fase adulta que só ocorre a partir do dia 32. Para controlar o crescimento bacteriano decidiram tratar um grupo com sulfato de neomicina e após o tratamento foi possível observar que os camundongos foram protegidos pela ação do antibiótico. A maioria dos animais sobreviveu, houve uma diminuição na ulceração da mucosa, com redução significativa do edema da submucosa e um aumento na produção de muco. Estes dados coincidem com o que observamos em nosso trabalho, onde o tratamento com Pipracilina + Tazobactan dos animais em fase crônica da infecção tiveram uma redução significativa do infiltrado inflamatório da submucosa, com ausência de infiltrado inflamatório e não identificamos a presença de bactérias invadindo os tecidos da mucosa e submucosa.

O infiltrado inflamatório presente nos animais que não foram submetidos ao tratamento apresentou uma grande quantidade de eosinófilos e também foi possível observar que nos animais submetidos ao tratamento, houve uma maior hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes, em comparação com os infectados não tratados. Estes dados sugerem que nesses animais também pode ter havido maior produção de muco em decorrência da antibioticoterapia. Essas informações evidenciam que as bactérias oportunistas que invadem a submucosa estão relacionadas diretamente ao aumento da patogenicidade desta infecção parasitária. O infiltrado inflamatório, decorrente da invasão de bactérias, presente na submucosa intestinal foi responsável pelo aumento da espessura dessa camada. Quando o estímulo desse infiltrado, no caso as bactérias, foram controladas, ele diminuiu consideravelmente. Observamos uma diferença em relação a redução da espessura destas camadas, destacamos que na mucosa epitelial há um processo de hiperplasia, que é o aumento do número de células associado a hipertrofia das células caliciformes. Na camada muscular o processo que ocorre é de hipertrofia, que é o aumento do tamanho das fibras musculares, características de um quadro inflamatório, subentende-se então, que esse processo de espessamento acontece ao longo dos 30 ou 35 dias de infecção, conseqüentemente, a redução não ocorre de forma imediata, destacando que os animais foram eutanasiados logo após oito dias de tratamento. Já essa redução foi destacada e observada na submucosa, onde o controle do infiltrado inflamatório impactou rapidamente na redução da espessura.

O trabalho de Perez e colaboradores 2011, que foi utilizado como referência para padronização do antibiótico, dose, via de administração e tempo de tratamento utilizado em nosso estudo, examina o efeito do tratamento com antibióticos no estabelecimento e eliminação da colonização intestinal com *Klebsiella pneumoniae* (KPC-Kp). Quando comparados os animais que não foram submetidos à algum tipo de tratamento com antimicrobiano, observou-se que o grupo de animais que foram submetidos ao uso de piperacilina+tazobactam tiveram reduções significativas nas concentrações de anaeróbios totais e *Bacteroides* spp., a piperacilina-tazobactam também reduziu significativamente as concentrações de enterococos nas fezes.

Com relação a microbiota intestinal, identificamos a presença de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. nos animais controles (CNT) e infectados (INT) que não foram submetidos ao tratamento antimicrobiano, microrganismos estes que são comumente encontrados em material fecal. Em infecções humanas com *T. trichiura* já foi descrito que o parasito pode ou

não ter efeito sobre a microbiota fecal (Lee et al 2014; Cooper et al 2013), diferente da infecção por *A. lumbricoides*, que os trabalhos sugerem alteração da microbiota (PAEREWIJK et al, 2015). Os resultados de Cooper e colaboradores 2013 divergem dos nossos, pois foi possível observar uma diversidade maior de microrganismos nos animais infectados não tratados do que no controle não tratado, ressaltando que tanto nos controles quanto nos infectados tratados as bactérias foram eliminadas pelo tratamento. Oliveira 2017 também observou uma diversidade maior de microrganismos nos animais infectados por *T. muris* quando comparados com os controles.

A resistência a muitos nematoides intestinais depende de um perfil de resposta inflamatória orquestrada pela produção de citocinas do tipo 2, enquanto uma resposta do tipo 1 pode não evitar a infecção, permitindo a evolução para uma fase crônica. A resposta Th2 é caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e subsequente ativação de IgG1, mastocitose, eosinofilia e IgE (KLEMENTOWICZ et al., 2012)

Um estudo realizado por Else e colaboradores (1994), mostra que camundongos que foram inoculados com um anticorpo monoclonal contra o receptor de IL-4 tornaram-se incapazes de expulsar o parasito *T. muris*, em associação a isso, também foi observado que esses camundongos apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ e baixos níveis de citocinas Th2, concluindo-se que o bloqueio da IL-4 *in vivo* permite o desenvolvimento de uma resposta Th1 não protetora. As contribuições de IL-4 e IL-13 para o desenvolvimento de resistência foram bem descritas para uma variedade de parasitos intestinais; no entanto, o papel da IL-10 não foi investigado em estudos anteriores. A IL-10 tem um importante papel na regulação imunitária na infecção com *T. muris*, *camundongos deficientes de IL-10 e IL-4 foram infectados e pôde ser observado que a deficiência dessa citocina levou a uma considerável perda de peso e sucessivamente à morte dos camundongos, sugerindo que a deficiência na produção destas citocinas do tipo 2 podem estar ligadas à superprodução de IL-12, TNF- α e IFN- γ , ligadas a uma resposta do tipo 1 (SCHOPF et al, 2002), que desencadeia uma piora no quadro da infecção. Neste estudo também foi demonstrado que camundongos deficientes em IL-10, IL-4 ou IL-10/IL-4 não conseguem eliminar larvas de *T. muris* nos primeiros dias da infecção. Em nossos resultados observamos que os animais infectados (grupos tratados e não tratados) aumentam a produção de IL-10 no soro em comparação com o grupo controle e que o tratamento proporcionou uma redução significativa desta citocina no soro dos animais*

infectados, sugerindo que a produção sistêmica desta citocina pode ter uma relação com o sinergismo nematoide-bactéria na fase crônica da infecção.

*O TNF desempenha um papel importante na expulsão de *T. muris*, camundongos deficientes tanto do receptor p55 quanto do p75 do TNF são altamente suscetíveis à infecção e desenvolvem uma resposta Th1 (ARTIS et al., 1999) que é pouco eficiente na resistência a esta infecção. Observamos que o tratamento com antibiótico reduziu a produção de IL-6 no linfonodo mesentérico, enquanto a produção de TNF e IFN- γ aumentou. Também foi observada uma maior concentração de IL-10 no ceco dos infectados independente de tratamento, porém essa citocina se mostra aumentada quando comparamos com os grupos controles, destacando essa citocina como um mecanismo chave em resposta ao nematoide. Destaca-se que o ceco é o sítio parasitário do nematoide e nesta região está inserida a banda bacilar, que em outros trabalhos sugere que está associada ao processo de excreção-secreção de substâncias imunomoduladoras (ZAPH et al 2014).*

Ao analisar as citocinas do linfonodo mesentérico, foi possível observar que há uma menor concentração de IL-6 nos animais submetidos ao tratamento, esta glândula está associada ao intestino (tecido parasitado) e esta redução sugere um reflexo na diminuição do infiltrado inflamatório observado no ceco. Foi possível observar um aumento de IL-6 no ceco dos animais infectados não submetidos ao tratamento, baseado nisso sugerimos que as células dos animais infectados estão liberando IL-6, destacando um perfil inflamatório, quando comparadas com os controles e isso deve estar associado a resposta à invasão tecidual bacteriana. O tratamento diminuiu o infiltrado inflamatório, podendo ter ocasionado a redução da secreção de IL-6, passando a ser majoritária a secreção de IL-10 nos animais que foram submetidos ao tratamento. Estamos propondo que na medida que as bactérias foram sendo eliminadas, o sistema imune do hospedeiro passa a responder de uma forma mais objetiva aos estímulos antigênicos mais específicos ao nematoide.

No ceco, a concentração de IL-6 apresentou-se aumentada nos animais infectados que não foram submetidos ao tratamento enquanto TNF apresentou-se aumentada nos animais infectados tratados. Em relação as citocinas Th2, no soro, mesmo que sem diferença estatisticamente significativa, há uma indicação de que ocorre a redução da concentração de IL-4 e IL-10 nos animais infectados e submetidos ao tratamento

Após a penetração da larva e durante o seu desenvolvimento na mucosa intestinal as rupturas na superfície da mucosa epitelial favorecem a invasão de bactérias presentes da própria microbiota intestinal do hospedeiro (OLIVEIRA, 2017). Klementowicz et. al (2012), relataram o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2 associada à expulsão rápida do parasita, e uma resposta Th1 vinculada ao estabelecimento de infecção crônica e ao aumento da imunopatologia. HAYES et al., 2010 explicaram que a presença de bactérias comensais induz uma resposta imune do tipo Th1 e Th17 no intestino e essa resposta está associada ao subconjunto de células T reguladoras, onde essa associação teve ter efeito no estabelecimento da infecção crônica, na ausência de patologia evidente.

Neste trabalho foi possível identificar estruturas bacterianas na mucosa e submucosa do ceco, fato este que já havia sido demonstrado por Oliveira, 2017. Além deste fato foi possível constatar que com a realização de tratamento antimicrobiano essas estruturas bacterianas são eliminadas da submucosa intestinal, tanto dos animais controles quanto infectados, reduzindo significativamente o infiltrado inflamatório dos animais infectados. Klementowicz e colaboradores (2012) destacam detalhes do ciclo onde após a eclosão, a larva L1 penetra na mucosa pelas criptas de Lieberkühn e se instala debaixo da superfície tecidual. Durante seu desenvolvimento, o parasito cresce, promove lesões, rompe a superfície da mucosa, e se move formando “túneis sinciciais” perfurando o tecido lateralmente.

Essas lesões no epitélio intestinal podem servir como porta de entrada para bactérias presentes na própria microbiota ou até mesmo de grupos bacterianos que podem estar sendo ingeridos pelo hospedeiro, evidenciando a estreita relação *Trichuris*-bactéria. A evolução do sistema imunológico de mamíferos tem uma íntima associação com o estabelecimento do parasitismo de helmintos em metazoários (JACKSON et al., 2009). Este complexo mecanismo se torna ainda mais interessante quando vinculamos a resposta imune, o parasitismo e a associação destes dois fatores com a atividade bacteriana, principalmente no parasitismo intestinal, local com grande riqueza microbiológica (MAZMANIAN et al., 2005).

CONCLUSÕES

- A antibioticoterapia não impactou na biologia do parasito no período crônico da infecção, porém reduziu de forma significativa a diversidade bacteriana intestinal;

- A redução do infiltrado inflamatório e consequente redução da morfométrica da submucosa intestinal está associada a eliminação das bactérias invasoras pelo tratamento antimicrobiano, e isso destaca a importância da ação destes microrganismos no processo inflamatório observado nesta parasitose;

- A não influência da antibioticoterapia na redução das células peritoneais, sugere que esse recrutamento pode ser uma resposta sistêmica a presença do nematoide no tecido intestinal;

-O aumento de IL-6, uma resposta perfil Th1, no ceco dos animais infectados não submetidos ao tratamento destaca um perfil inflamatório, e isso deve estar associado a resposta à invasão tecidual bacteriana;

-Animais infectados de todos os grupos aumentam a produção de IL-10 sistêmica em comparação com o grupo controle, onde o tratamento proporcionou uma redução significativa desta citocina no soro dos animais infectados, sugerindo que a produção sistêmica desta citocina pode ter uma relação com o sinergismo nematoide-bactéria na fase crônica da infecção.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K., MURPHY, K.M. and SHER, A. Functional diversity of helper T-lymphocytes. *Nature*. v. 383, n. 6603, p. 787, 1996
- ARTIS, Da et al. Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *The Journal of Experimental Medicine*. v. 190, n. 7, p. 953-962, 1999.
- AZIRA, N. M. S.; ZEEHAIDA, M. Severe chronic iron deficiency anaemia secondary to *Trichuris dysentery syndrome*. **Tropical Biomedicine**, v. 29, n. 4, p. 626–631, 2012.
- BAIN, B J. **Células sanguíneas: um guia prático**. Artmed Editora, 2009.
- CHAVES, A. et al. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust modificado. **Revista de Saúde Pública**, v. 13, p. 348-352, 1979.
- CHUNG, Lawton K.; BLISKA, James B. Gut Check: IFN γ Delays Mucosal Recovery during Antibiotic Therapy. *Cell host & microbe*. v. 20, n. 2, p. 128-129, 2016.
- COOPER, P. J. et al. Whipworm genome and dual-species transcriptome analyses provide molecular insights into an intimate host-parasite interaction. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p. 693–700, 2013.
- DOLOWSCHIAK, Tamas, et al. IFN- γ hinders recovery from mucosal inflammation during antibiotic therapy for *Salmonella* gut infection." *Cell host & microbe*. v. 20, n. 2, p. 238-249, 2016.
- ELSE, K. J. et al. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *The Journal of Experimental Medicine*. v. 179, n. 1, p. 347-351, 1994.
- Ettinger, S.; Feldman, E. (2004). *Textbook of veterinary internal medicine*. Volume 2. 6th ed. Saunders Elsevier, pp. 1118-1144
- HAYES, K. S. et al. Exploitation of the intestinal microflora by the parasitic nematode *Trichuris muris*. **Science**, v. 328, n. 5984, p. 1391-1394, 2010.
- HOERAUF, Achim et al. Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis—depletion of *Wolbachia* endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production. **Medical microbiology and immunology**, v. 192, n. 4, p. 211-216, 2003.
- HUANG, Lu; APPLETON, Judith A. Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 10, p. 798-807, 2016.
- HURST, Rebecca JM; ELSE, Kathryn J. *Trichuris muris* research revisited: a journey through time. **Parasitology**, v. 140, n. 11, p. 1325-1339, 2013.

JACKSON, J. A. et al. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: Coevolutionary legacies *Immunology*, v. 126, n. 1, p. 18–27, 2009.

JOURDAN, Peter Mark et al. Soil-transmitted helminth infections. *The lancet*, v. 391, n. 10117, p. 252-265, 2018.

KATO, K. & MIURA, M. Comparative examinations. *Jap. J. Parasit.*, 3:35, 1954.

KATZ, N. "Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses." (2018).

KLEMENTOWICZ E., J.; TRAVIS A., M.; GRENCIS K., R. *Trichuris muris*: A model of gastrointestinal parasite infection. *Seminars in Immunopathology*, v. 34, n. 6, p. 815–828, 2012.

KYUNG-SUN OK, YOU-SUN KIM, CORRESPONDING AUTHOR1 JUNG-HOON SONG,1 JIN-HO LEE,1 SOO-HYUNG RYU, JUNG-HWAN LEE, JEONG- LANDMANN, F. et al. Anti-filarial activity of antibiotic therapy is due to extensive apoptosis after Wolbachia depletion from filarial nematodes. *PLoS Pathogens*, 2011.

LEE, SOO CHING et al. Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 8, n. 5, p. e2880, 2014.

MAZMANIAN, S. K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, v. 122, n. 1, p. 107–118, 2005.

MONTEIRO, K. J. L. et al. Focal persistence of soil-transmitted helminthiasis in impoverished areas in the State of Piauí, Northeastern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 60, 2018.

MOSER, et al 2017. Efficacy of recommended drugs against soil transmitted helminths: systematic review and network meta-analysis. *Bmj*, v. 358, p. 4307.

MOSMANN, T. R., SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

OLIVEIRA, D.A. Alterações no tecido intestinal e o envolvimento de bactérias na fase crônica da infecção de *Trichuris muris* em camundongos. 2017. 49 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017

OMS | La Organización Mundial de la Salud y un conjunto de colaboradores dan a conocer un nuevo plan coordinado para tratar a millones de personas que sufren enfermedades tropicales desatendidas. WHO, 2013.

PEREZ, F. et al. Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 55, n. 6, p. 2585-2589, 2011.

RAPIN, A., HARRIS, N. L. Helminth–Bacterial interactions: cause and consequence. **Trends in Immunology**, 2018.

SINGH, T. et al. Predictive utility of clinical and stool parameters in bacterial diarrhoea in children. *Indian journal of medical sciences*, v. 49, n. 12, p. 285–90, dez. 1995.

Piperacilina sódica + Tazobactam sódico. São Paulo: Eurofarma, 2013. Bula de remédio.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

SMITS, H. L. Prospects for the control of neglected tropical diseases by mass drug administration. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 1, p. 37-56, 2009.

TILNEY, L. G. et al. Adaptation of a nematode parasite to living within the mammalian epithelium. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, v. 303, n. 11, p. 927–945, 2005.

TORRES, E. J. L. et al. A new species of *Trichuris* from *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) in Brazil: Morphological and histological studies. *Veterinary Parasitology*, 2013.

VEJZAGIĆ, N. et al. Bacteria-induced egg hatching differs for *Trichuris muris* and *Trichuris suis*. *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, p. 371, 2015.

WHO. Preventive chemotherapy in human helminthiasis Preventive chemotherapy in human helminthiasis. 2016.

WHO, W. H. O. proportion of children (1-14 years of age) in the country requiring preventive chemotherapy (pc) for soil-transmitted helminthiases worldwide, 2015. Disponível em <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/STH_2014.png>. Acesso em: 25 mar. 2019.

YIMAM, Y.; DEGAREGE, A.; ERKO, B. Effect of anthelmintic treatment on helminth infection and related anaemia among school-age children in northwestern Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, p. 613, 2016.

ZAPH, C.; COOPER, P. J.; HARRIS, N. L. Mucosal immune responses following intestinal nematode infection. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 9, p. 439-452, 2014.