



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Larissa Trotta Barroso de Oliveira

**Caracterização proteômica dos Produtos de Excreção-Secreção de *Trichuris muris* e sua interação *in vitro* com bactérias da microbiota**

Rio de Janeiro

2025

Larissa Trotta Barroso de Oliveira

**Caracterização proteômica dos Produtos de Excreção-Secreção de *Trichuris muris* e sua interação *in vitro* com bactérias da microbiota**

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: Eduardo José Lopes Torres

Coorientador: Ana Cláudia Paula Rosas Ignácio

Rio de Janeiro

2025

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O48 Oliveira, Larissa Trotta Barroso de.  
Caracterização proteômica dos Produtos de Excreção-Secreção de *Trichuris muris* e sua interação *in vitro* com bactérias da microbiota / Larissa Trotta Barroso de Oliveira – 2025.  
111 f.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia Paula Rosas Ignácio

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

1. Microbiota - Teses. 2. Tricuríase. 3. Trichuris. I. Torres, Eduardo José Lopes. II. Ignácio, Ana Cláudia Paula Rosas. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 595.132

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Larissa Trotta Barroso de Oliveira

**Caracterização proteômica dos Produtos de Excreção-Secreção de *Trichuris muris* e sua interação *in vitro* com bactérias da microbiota**

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: Eduardo José Lopes Torres

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Ana Claudia Paula Rosas Ignácio

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_.

Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia Amaral G. da Silva

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wendell Girard Dias

Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz

Rio de Janeiro

2025

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram ao longo dessa jornada. Àqueles que me ofereceram suporte emocional, que estiveram ao meu lado durante as crises de ansiedade e me deram forças para continuar. Aos que compartilharam comigo os momentos de alegria, trazendo risadas e sendo ouvintes atentos nos momentos de desabafo. Cada gesto, mais simples que fosse, foi essencial para que eu chegasse até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a toda minha família, por estarem sempre ao meu lado. Em especial à minha mãe, uma das minhas melhores amigas, que me conforta e apoia em todos os momentos, ao meu pai por providenciar o necessário ao meu estudo e me ensinar a ser batalhadora. À Luisa, por sempre tentar me animar e dar carinho, sendo a melhor irmã que eu poderia ter. Às minhas avós, Aida e Vilma, por serem exemplos de alegria e resiliência. A minha tia, Renata, por ser um grande exemplo, além de colega de profissão. Ao meu tio Jorge, por tirar tempo todos os dias para me acompanhar no caminho da faculdade. Aos meus demais tios e tias, que sempre estão do meu lado. Aos meus primos, por sempre me proporcionarem risadas. Além deles, um eterno agradecimento em memória dos meus avôs, Reinaldo e Lair. Espero que ambos estejam orgulhosos de mim.

Ao meu amor e companheiro de vida, Gabriel Bruck, por estar sempre ao meu lado, sendo nos momentos felizes ou de surto, dando amor, carinho e conforto, além de me fazer rir a todo momento.

As minhas amigas: Eduarda Carlos, Flávia Ferreira, Mariana Moreno, Mariana Nantua e Úrsula Alana por serem o maior presente que a UERJ poderia ter me proporcionado.

Ao meu orientador, Eduardo Torres, por toda a paciência, carinho e ensinamento desde que entrei no laboratório no início da minha graduação, sendo um grande exemplo de profissional, no qual me inspiro diariamente.

À Dayane Alvarinho, a primeira pessoa que me acolheu no laboratório, que desde o começo, me ensinou tudo com tanta paciência, e que nessa jornada, se tornou uma grande amiga.

Ao Jeferson Camargo, que me ensinou tudo o que sei sobre proteômica e sempre me ajudou, com a paciência e o bom humor mais generosos do mundo.

À Luiza Coelho, que me ajuda em tudo, sendo minha companheira da proteômica.

A todos do laboratório, por todos os conselhos, pela paciência e ajuda sempre que era necessário. Fico muito feliz de participar de um grupo tão incrível.

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

Sempre que vocês começarem a duvidar de si mesmas, sempre que sentirem medo, lembrem-se a coragem é a raiz da mudança, e somos quimicamente programados para mudar.

*Bonnie Garmus*

## RESUMO

OLIVEIRA, Larissa Trotta Barroso de. **Caracterização proteômica dos Produtos de Excreção-Secreção de *Trichuris muris* e sua interação *in vitro* com bactérias da microbiota**. 2025. 111 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A tricuriase é uma doença negligenciada que afeta cerca de 465 milhões de pessoas, causada pelo nematóide intestinal *Trichuris trichiura*. Esses helmintos produzem e liberam produtos de excreção e secreção (PES), que são ricos em microRNAs e proteínas com diversas funções, tais como a modular o sistema imuno do hospedeiro. Para conseguir se estabelecer no intestino grosso do hospedeiro, esses helmintos penetram na mucosa desse órgão, promovendo o rompimento epitelial e permitindo a translocação bacteriana. A interação parasito-microbiota-hospedeiro tem sido estudada pelo nosso grupo usando o modelo de infecção *T. muris* em camundongos. Neste trabalho nosso objetivo foi extrair PES de *T. muris* mantidos em camundongos suíços submetidos ou não a antibioticoterapia e verificar se esse tratamento altera a composição proteica dos PES. Além disso, analisar a atividade antimicrobiana desses PES e avaliar sua possível influência na interação entre bactérias e células intestinais T84 e Caco-2 *in vitro*. Para isso, camundongos foram infectados com *T. muris*, e foram tratados com antibióticos ou não (controles). Os parasitos recuperados foram mantidos em cultivo em meio RPMI à 37 °C/ CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, algumas dessas amostras foram analisadas pela espectrometria de massas, para caracterizar as proteínas presentes, posteriormente fizemos análises de quantificação, concentração, KEGG, ontologia genética (GO), presença de peptídeo sinal e rede. Em seguida, o PES foi analisado quanto a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano e a interação entre as bactérias *Escherichia coli* 042, *E. coli* DH5 $\alpha$  e *Salmonella* c20 e as células T84 e Caco-2. Após 6 horas, o material foi processado e analisado por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Em nossos resultados, observamos que houve diferença nas proteínas encontradas em cada grupo de camundongos tratados e não tratados. Sendo que a resposta do grupo tratado foi mais complexa que o não tratado, apresentando mais proteínas com diferentes funções. Algumas dessas proteínas encontradas em ambos os grupos possuem funções, como atividade antimicrobiana e imunomoduladora, de acordo com a literatura. Já no antibiograma, não houve a inibição do crescimento bacteriano pelo PES. E não identificamos padrões na quantidade de bactérias entre os grupos com e sem PES em nenhuma das monocamadas de células, porém observamos diferenças em seu comportamento, como mudança no poder agregativo e invasivo, principalmente em *E. coli* 042 e *E. coli* DH5 $\alpha$ , quando em contato com o PES. Concluímos que o tratamento impactou na composição dos PES, que é rico em proteínas com atividades biológicas conhecidas e que se diferencia de acordo com o ambiente, podendo também interagir com as bactérias que compõem a microbiota do hospedeiro.

Palavras-chave: tricuriase; produtos de excreção e secreção; microbiota

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Larissa Trotta Barroso de. **Proteomic characterization of *Trichuris muris* Excretory-Secretory Products and their *in vitro* interaction with microbiota bacteria.** 2025. 111 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Trichuriasis is a neglected disease that affects millions of people and is caused by the intestinal nematode *Trichuris trichiura*. These helminths produce excretory/secretory products (ESPs), which are rich in microRNAs and proteins with various functions, such as immunomodulation. To establish themselves in the host's large intestine, these helminths penetrate the organ wall, promoting epithelial disruption and allowing bacterial translocation. The parasite-microbiota-host interaction has been studied by our group using the *T. muris* infection model in mice. In this study, our objective was to extract ESPs from *T. muris* maintained in Swiss mice, either subjected or not to antibiotic therapy, and to verify whether this treatment alters the protein composition of the ESPs. Additionally, we aimed to analyze the antimicrobial activity of these ESPs and assess their potential influence on the interaction between bacteria and intestinal T84 and Caco-2 cells *in vitro*. First, mice were infected with *T. muris* and either treated with antibiotics or left untreated (controls). The recovered parasites were maintained in culture in RPMI medium at 37 °C/CO<sub>2</sub> for 24 hours. Subsequently, some of these samples were subjected to mass spectrometry to analyze the proteins, followed by data extraction and analyses of quantification, concentration, KEGG pathways, gene ontology (GO), signal peptide presence, and network analysis. The ESPs were then evaluated for their ability to inhibit bacterial growth and their interaction with *Escherichia coli* 042, *E. coli* DH5 $\alpha$ , and *Salmonella* c20 and the T84 and Caco-2 cells. After 6 hours, the material was processed and analyzed using light microscopy and scanning electron microscopy. In our results, we observed differences in the proteins found in each group of treated and untreated mice. The response in the treated group was more complex than in the untreated group, showing more proteins with more diverse functions. Some of the proteins found in both groups have various functions, such as antimicrobial and immunomodulatory activities, according to the literature. However, in the antibiogram, bacterial growth was not inhibited by the ESPs. We did not identify patterns in the bacterial quantity between groups with and without ESPs in any of the cell monolayers. However, we observed differences in bacterial behavior, such as changes in aggregation and invasive potential, particularly in *E. coli* 042 and *E. coli* DH5 $\alpha$  when in contact with ESPs. We concluded that ESPs are rich in proteins with known biological activities and that their composition varies depending on the environment, potentially interacting with bacteria that comprise the host's microbiota.

Keywords: trichuriasis; excretory-secretory products; microbiota

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fêmea e macho de <i>Trichuris</i> .....	17
Figura 2 – Ovo de <i>Trichuris</i> .....	18
Figura 3 – Mapa da distribuição mundial da incidência da tricuriase humana.....	20
Figura 4 – Mapa de distribuição da tricuriase no Brasil.....	21
Figura 5 – Ciclo biológico do <i>Trichuris muris</i> .....	24
Figura 6 – Resposta imune contra helmintos.....	29
Figura 7 – Esquema representando a atuação no <i>Trichuris muris</i> no intestino.....	31
Figura 8 – Esquema da banda bacilar de <i>Trichuris muris</i> .....	32
Figura 9 – Tabela com as proteínas encontradas em vesículas extracelulares.....	35
Figura 10 – Imagem de Microscopia de luz mostrando a monocamada de T84 com bactérias <i>E. coli</i> 042 contadas através do programa ImageJ.....	49
Figura 11 – Antibiogramas.....	73
Figura 12 – Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura – Antibiograma.....	74
Figura 13 – Microscopia de Luz - Células T84 - <i>E. coli</i> 042.....	76
Figura 14 – Microscopia de Luz - Células T84 - <i>E. coli</i> Dh5□.....	77
Figura 15 – Microscopia de Luz - Células T84 - <i>Salmonella c20</i> .....	78
Figura 16 – Microscopia de Luz - Células Caco-2 - <i>E. coli</i> 042.....	79
Figura 17 – Microscopia de Luz - Células Caco-2 - <i>E. coli</i> Dh5□.....	80
Figura 18 – Microscopia de Luz - Células Caco-2 - <i>Salmonella c20</i> .....	81
Figura 19 – Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura - Células T84.....	83
Figura 20 – Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura - Células T84.....	84
Figura 21 – Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura - Células Caco-2.....	85

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Diagrama de Venn mostrando as proteínas encontradas e cada grupo, incluindo produtos de excreção-secreção e somático .....	50
Gráfico 2 – Diagrama de Venn mostrando as proteínas encontradas nos grupos tratados (TD) e não tratados (NTD) de PES.....	52
Gráfico 3 – Heatmap mostrando a comparação de abundância experimental proteica entre os grupos tratados (TD) e não tratados (NTD).....	53
Gráfico 4 – Gráfico mostrando enriquecimento de vias metabólicas KEGG das proteínas identificadas no grupo não tratado (NTD) de PES.....	55
Gráfico 5 – Gráfico mostrando enriquecimento de vias metabólicas KEGG das proteínas identificadas no grupo tratado (TD) de PES.....	56
Gráfico 6 – Gráfico mostrando a ontologia genética das proteínas encontradas no grupo não tratado (NTD) de PES.....	57
Gráfico 7 – Gráfico mostrando a ontologia genética das proteínas encontradas no grupo tratado (TD) de PES.....	59
Gráfico 8 – Gráfico mostrando a presença de peptídeo sinal das proteínas encontradas nos grupos não tratado (NTD) e tratado (TD) de PES.....	61
Gráfico 9 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína no grupo PES NTD.....	62
Gráfico 10 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína no grupo PES TD.....	63
Gráfico 11 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína com clusters no grupo PES NTD.....	64
Gráfico 12 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína com clusters no grupo PES TD.....	66
Gráfico 13 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de importância delas no grupo PES NTD.....	67
Gráfico 14 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de importância delas no grupo PES TD.....	68
Gráfico 15 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de Betweenness no grupo PES NTD.....	69
Gráfico 16 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de Betweenness no grupo PES TD.....	70

Gráfico 17 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de Bottleneck no grupo PES NTD.....	71
Gráfico 18 – Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de Bottleneck no grupo PES TD.....	72

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
CDC	Centros de Controle e Preveno de Doenças
CEUA	Comitê de tica no Uso de Animais
CLSI	Comitê Nacional de Microbiologia Clínica
CO2	Dióxido de carbono
DMEM	Meio Modified Eagle Medium
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FABP	Fatty-acid-binding proteins
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FDR	False Discovery Rate
FISH	Hibridao in situ por Fluorescência
GO	Gene Ontology (Ontologia genética)
GRAM +	Grânulo positiva
GRAM -	Grânulo negativa
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Trifosfato de guanosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L1	Larva no estágio 1
L2	Larva no estágio 2
L3	Larva no estágio 3
L4	Larva no estágio 4
LB	Meio LB (Luria Bertani)
MDA	Programas de tratamento em massa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ML	Microscopia de Luz
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction
PES	Produto de Excreo e Secreo

PES NTD	Produto de Excreção e Secreção provenientes de <i>T.muris</i> de animais não tratados
PES TD	Produto de Excreção e Secreção provenientes de <i>T.muris</i> de animais tratados
TSA	Meio Agar Triptona de Soja
TFA	Trifluoroacetic acid
REVIGO	Reduce + Visualize Gene Ontology
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SCP	Sterol carrier protein
WAP	Whey acidic protein

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
μ	Micro
α	Alfa
n	Nano
m	Metro
g	Gramma
L	Litro
x G	Força G da centrifugação

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1 OBJETIVOS .....	38
1.1 Geral .....	38
1.2 Específicos .....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1 Embrionamento dos ovos e infecção experimental.....	40
2.2 Imunomodulação.....	40
2.3 Exame de fezes.....	41
2.4 Tratamento dos camundongos com antibiótico.....	41
2.5 Extração do Produto de Excreção e Secreção e preparação do material somático para análise proteômica.....	41
2.6 Preparo de amostras para a espectrometria de massas (MS/MS) .....	42
2.7 Análise <i>in silico</i> de dados de MS para identificação e quantificação relativa de proteínas.....	43
2.8 Caracterização das proteínas do produto de Excreção e Secreção (ES).....	45
2.9 Dosagem de proteínas do produto de excreção e secreção do <i>Trichuris muris</i> .....	46
2.10 Teste de sensibilidade bacteriana ao Produto ES (Antibiograma) .....	46
2.11 Co-cultivo células T-84 e bactérias em contato com produtos de ES.....	47
2.12 Processamento para Microscopia de Luz.....	48
2.13 Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	48
2.14 Contagem de bactérias.....	48
2.15 Análises estatísticas.....	49
3 RESULTADOS.....	50
3.1 Identificação de proteínas do produto de excreção e secreção de <i>Trichuris muris</i> .....	50
3.2 Antibiograma.....	73
3.3 Interação células, bactérias e produto de excreção e secreção.....	75
3.4 Análise por Microscopia de Luz.....	75
3.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura – células T84.....	82
3.6 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura – células Caco-2.....	84
4 DISCUSSÃO .....	86
CONCLUSÕES .....	100
REFERÊNCIAS .....	101

## INTRODUÇÃO

Os helmintos são organismos pluricelulares que podem desenvolver o parasitismo e se dividem em três filos, Platyhelminthes, Acanthocephala e Nematoda. Estes organismos formam um grupo não monofilético e caracterizam-se principalmente por suas características morfológicas distintas entre si, porém com algumas adaptações compartilhadas nos táxons que desenvolvem o parasitismo (Collins, 2017; Amin, 2013; Goldstein, 2001).

Os platelmintos de maneira geral são achatados dorsoventralmente e se dividem nas classes Turbellaria, Trematoda, Monogenea, Cestoda, Catenulida e Rhabditophora (Littlewood, 2008). Possuem simetria bilateral, com uma região anterior bem definida com elementos sensoriais e motores. A parede do corpo é recoberta por um tegumento, que ajuda na nutrição desses seres, pois não possuem sistema digestório completo, sendo seu intestino um saco simples no parênquima ou ramificado (Collins, 2017). Possuem um sistema nervoso simples, com regiões centrais e periféricas, na qual a periférica ajuda as células musculares, sensoriais e epiteliais e a central consiste em gânglios em volta do estatocisto, um órgão que ajuda no movimento e equilíbrio (Collins, 2017). A maioria dos platelmintos são monóicos, ou seja, possuem os órgãos feminino e masculino em um só indivíduo (conhecidos popularmente como hermafroditas); porém existem poucos que são dióicos (cada indivíduo tem somente um órgão reprodutor, feminino ou masculino) (Collins, 2017).

Os Acanthocephala, apresentam um corpo cilíndrico, também com simetria bilateral e se dividem em três ordens: Archiacanthocephala, Palaeacanthocephala e Eoacanthocephala (Amin, 2013). Também não possuem um sistema digestório completo, e apresentam na sua parte anterior estruturas para facilitar sua fixação, como ganchos. Geralmente são bem pequenos, variando de 1,5 mm até 25mm (Near *et al.*, 1998). Possuem sistema nervoso simples, que consiste em um gânglio central (funcionando como um cérebro) e possuem órgãos sensoriais, uma papila anterior e um par lateral na base da probóscida. São dióicos, tendo machos e fêmeas, onde os machos são menores que as fêmeas (Nicholas, 1973).

Os nematóides, se dividem nas classes Chromadorea e Enoplea (NCBI, 2024). Este filo se destaca por apresentar um corpo cilíndrico, simetria bilateral e o corpo coberto por uma matriz extracelular que reveste sua hipoderme e a camada muscular (Blaxter e Georgios, 2015). Possuem sistema digestório completo, e podem ou não apresentar adaptações parasitárias no aparelho bucal, como lábios fundidos, hipertrofiados, dentes cuticulares ou cápsulas bucais adaptadas que os ajudam na fixação no tecido de seus hospedeiros. Ao ingerir nutrientes pela

boca, direcionam este conteúdo para um esôfago muscular que apresenta glândulas, canalizando para o intestino, que é simples, tubular e percorre todo o corpo até a externalização pelo ânus ou cloaca. As espécies geralmente são dióicas, com dimorfismo sexual (Blouin *et al.*, 1999). Com um exoesqueleto resistente, os nematóides são caracterizados por realizarem mudas ao longo do seu desenvolvimento de vida, passando sempre por quatro mudas após a larva de primeiro estágio eclodir do ovo, até se tornar verme adulto.

### **Nematóides tricurídeos**

Os nematóides tricurídeos possuem um corpo bem característico, onde a parte anterior é mais afilada enquanto a parte posterior é mais robusta. Não apresentam lábios ou cavidades bucais desenvolvidas; e a maioria dos ovos apresentam plugues polares característicos. A hipoderme apresenta áreas especializadas, e algumas altamente organizadas e associadas à adaptação parasitária, como é o caso da banda bacilar, que está presente nos nematóides tricurídeos (Tilney *et al.*, 2005). A banda bacilar é formada por esticócitos, inflações cuticulares e glândulas bacilares, que desempenham funções secretórias e de absorção, localizando-se na região anterior do helminto (Lopes-Torres *et al.*, 2020).

Nematóides do gênero *Trichuris*, são altamente especializados à vida parasitária, considerados pequenos em sua dimensão corporal, possuindo em torno de 5 cm de comprimento e com a espessura variando de 50 µm na extremidade posterior a aproximadamente 400 µm na região anterior. Na região anterior, que é mais delgada e afilada, encontram-se as estruturas da banda bacilar que fica inserida na mucosa intestinal do hospedeiro mamífero durante o parasitismo. Na região posterior, que é mais robusta, concentram-se os principais órgãos do parasito, formando este conjunto uma morfologia corporal peculiar em formato de “chicote”, que nomeia o grupo em inglês como “whipworms”. O esôfago, que é bem alongado, apresenta grandes células que o envolvem, chamadas de esticócitos (também presentes na banda bacilar) As fêmeas são um pouco maiores que os machos que, por sua vez, apresentam na extremidade posterior um espículo coberto por uma bainha espicular e um espiralamento ventral, como podemos ver na figura 1 (Hurst e Else 2013).

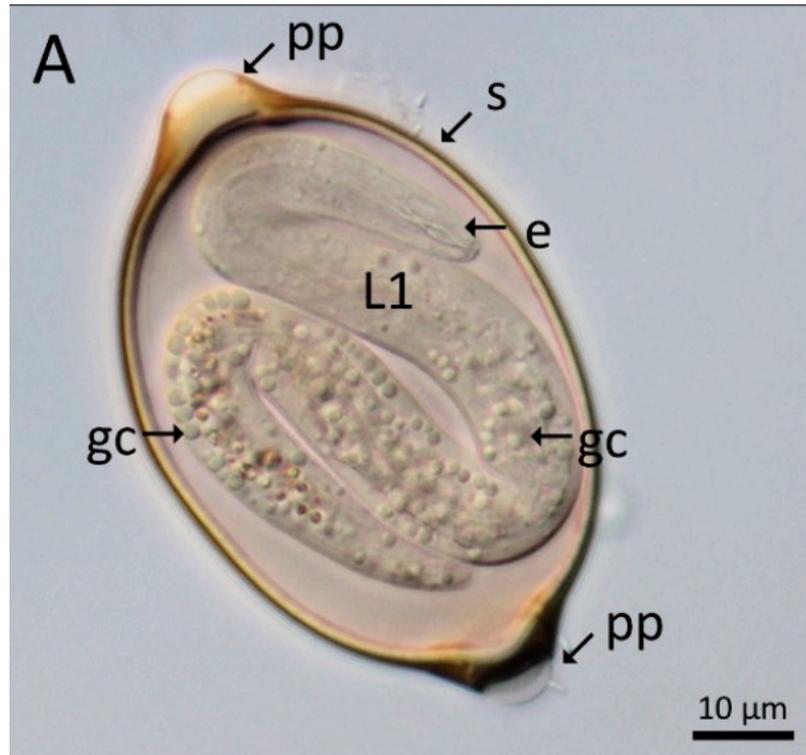
Figura 1 - Fêmea e macho de *Trichuris* spp.



Legenda: Espécimes de parasitos do gênero *Trichuris*. A esquerda a fêmea, e a direita o macho. (Imagem: Centers for Disease Control and Prevention - CDC).

Os ovos deste parasito são bem característicos, tendo um formato oval, dois plugues polares nas extremidades, por onde as larvas eclodem. Estes possuem uma casca bem desenvolvida, possuindo uma camada vitelínica, uma camada de quitina e uma lipídica, todas elas revestindo a matriz extraembrionária, como vemos na figura 2. Eles podem medir de 60 a 70 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de comprimento e 37 a 40 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de largura, sendo só visíveis no microscópio (Inatomi, 1960). Os ovos podem ser considerados uma forma de resistência, que vão ajudar na dispersão do parasito e também na sobrevivência a temperaturas, umidade, agressões mecânicas, microrganismos (como bactérias e fungos), além de proteger da acidez estomacal e enzimas digestivas quando os hospedeiros os ingerirem (Lýsek *et al.*, 1985).

Figura 2 - Ovo de *Trichuris muris*



Legenda: Ovo de *Trichuris muris* embrionado. (s): casca do ovo. (pp) plugues polares. (L1) Larva no estágio L1. (e) esôfago da larva. (gc) células germinativas. - (Dias *et al.*, 2022).

### **Tricuríase: uma doença negligenciada**

Com base nos dados da Organização Mundial da Saúde, estimou-se que aproximadamente 1,62 bilhão de pessoas (WHO, 2024) precisaram de intervenções para patógenos que causam doenças classificadas como tropicais negligenciadas, como por exemplo ascaridíase, tricuriase, ancilostomíase, estrogiloidíase, esquistossomose, escabiose, leishmaniose, doença de Chagas e oncocercose (Specht e Keiser, 2023).

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo muito diverso que podem ser causadas por vários tipos de patógenos (vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos). Em destaque para as helmintíases, estas estão associadas a importantes fatores sociais, econômicos e de infraestrutura de saúde (WHO, 2024). São parasitoses mais relacionados a ambientes com problemas de infraestrutura, baixo índice de desenvolvimento humano (IDH) e foram das principais agendas globais de saúde (WHO, 2024). É estimado que populações que vivem em

situações de extrema pobreza estejam infectadas por um ou mais agentes dessas patologias, no qual corresponderia a aproximadamente 10% da população mundial (Specht e Keiser, 2023).

Destacam-se as parasitoses intestinais, evidenciando a relevância de programas nacionais e internacionais que promovam condições de proteção e recuperação da saúde das populações mais vulneráveis. Esses esforços incluem a identificação de áreas endêmicas e o fortalecimento da vigilância epidemiológica, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida das comunidades afetadas. Neste cenário, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu estratégias para que essas doenças sejam erradicadas até o ano 2030. Diante destes desafios, destacamos seis dos 17 ODS estabelecidos na Conferência das Nações Unidas sobre desenvolvimento sustentável no Rio de Janeiro em 2012: 1 - Saúde de Qualidade (ODS 3); 2 - Educação de Qualidade (ODS 4); 3 - Água Potável e Saneamento (ODS 6); 4 - Fome Zero e Agricultura Sustentável (ODS 2); 5 e 6 - Vida na Água e Vida Terrestre (ODS 14 e 15). Diante disso, torna-se estratégico acelerar ações programáticas contra essas doenças, incluindo medidas para reduzir prevalência, morbidade e mortalidade, diante de um cenário de Saúde Única ou Uma só Saúde (WHO, 2024).

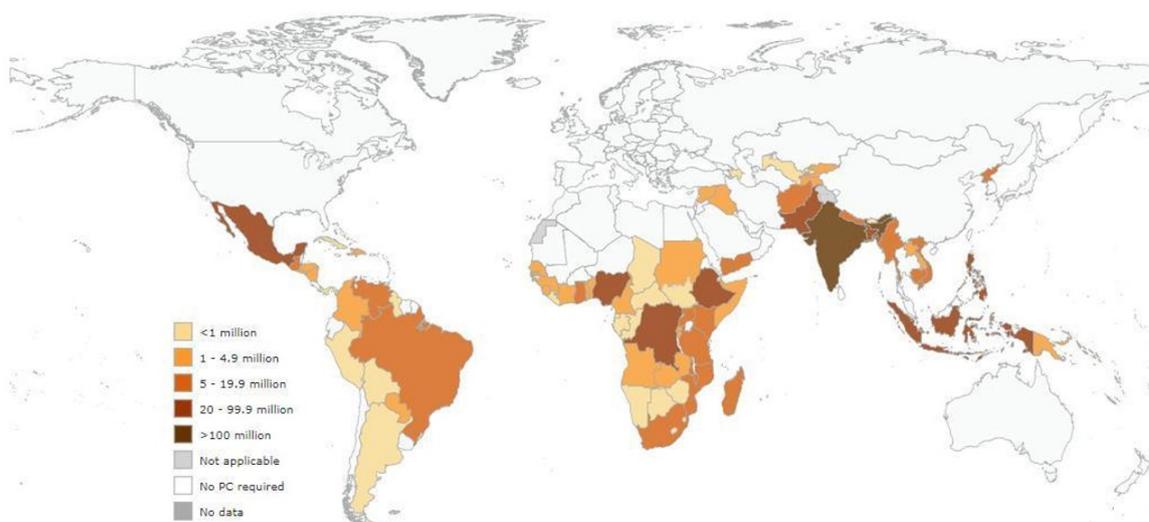
Os geo-helmitos possuem como estratégia de desenvolvimento biológico a necessidade de parte de seu ciclo estar associado ao solo, diante disso, os meios de contaminação de solo por dejetos humanos passam a ser o principal problema da manutenção das formas infectantes no ambiente. Existem duas estratégias de infecção: a forma passiva que envolve o processo fecal-oral e a transmissão ativa, onde a larva penetra pela pele nua, quando em contato direto com este solo contaminado. Os exemplos de geo-helmitos são: *Ascaris lumbricoides*, ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*), *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis*.

A parasitose mais conhecida dentre estas é a ascaridíase, causada pelo *A. lumbricoides*, conhecido popularmente como lombriga. É estimado que mais de 800 milhões de indivíduos estejam infectados com este parasito (Wang, 2020; Jourdan, 2018). Os ancilostomídeos também são geo-helmitos de alto impacto, sendo os mais comuns *A. duodenale*, na Europa e Ásia, e *N. americanus* nas Américas. Estes parasitos infectam mais de 472 milhões de indivíduos (Jourdan *et al.*, 2018). Sua forma de infecção geralmente é ativa, com a larva filarióide penetrando a pele do indivíduo, porém o *A. duodenale* pode também infectar também por via oral, causando a síndrome de Wakana (Jourdan *et al.*, 2018). Outra importante parasitose é a estrogiloidíase, causada pelo *Strongyloides stercoralis*, podendo infectar mais de 100 milhões de indivíduos em todo o mundo (Jourdan *et al.*, 2018). A infecção destes se estabelece pela penetração das larvas filarióides na pele

A tricuriase humana é causada pelo geo-helminto *Trichuris trichiura*, mas existem diversas outras espécies com importância silvestre e veterinária. É uma das geo-helmintíases mais prevalentes no mundo, infectando mais de 477 milhões de pessoas (Jourdan *et al.*, 2018). Essa parasitose é mais comum em áreas de clima mais quente, atingindo principalmente populações moradoras de áreas com problemas de infraestrutura básica de saneamento, impactando, principalmente, populações de países tropicais (Else *et al.*, 2020). Diante disso, impacta com mais intensidade países do continente africano, no Sul da Ásia e da América Latina, como o Brasil, demonstrado na figura 3 (Ahmadi Jouybari *et al.*, 2016; Behniafar *et al.*, 2024).

A tricuriase, como toda geo-helmintíase, tem relação com características específicas da carência de infraestrutura em saneamento básico, atreladas principalmente à ausência de tratamento de esgoto, coleta de lixo, resultando na contaminação do solo com fezes humanas. O desenvolvimento da larva de primeiro estágio ocorre ainda dentro do ovo após ser eliminado pelas fezes e em contato com o solo. A transmissão ao humano ocorre de forma passiva, via ingestão destes ovos larvados. Os mais afetados por essa parasitose são crianças em idade escolar, por estarem em uma fase com menos noções de higiene básica, além de estarem mais expostas à contínua contaminação com solo, alimento e, potencialmente fontes de água não tratada adequadamente (Else *et al.*, 2020).

Figura 3 - Mapa da distribuição mundial da incidência da tricuriase humana



Legenda: Mapa da distribuição mundial da incidência da tricuriase humana. Segundo a legenda, áreas destacadas em amarelo (mais claro), representam uma menor incidência e as áreas em marrom (mais escuras) maior incidência (WHO, 2020).

No Brasil, a tricuriase também está altamente disseminada e, no último levantamento epidemiológico (Katz, 2018), observa-se que apresenta distribuição nacional, porém, com áreas mais impactadas, por conta das características mencionadas anteriormente, em relação à ausência de infraestrutura básica de saneamento, em associação com problemas educacionais. Diante disso, municípios das regiões Norte e Nordeste apresentam maior pressão de infecção por contaminação ambiental e alta prevalência, dando destaque aos estados do Amazonas, Pará, Sergipe e Alagoas - figura 4 (Katz, 2018).

Figura 4 - Mapa de distribuição da tricuriase no Brasil

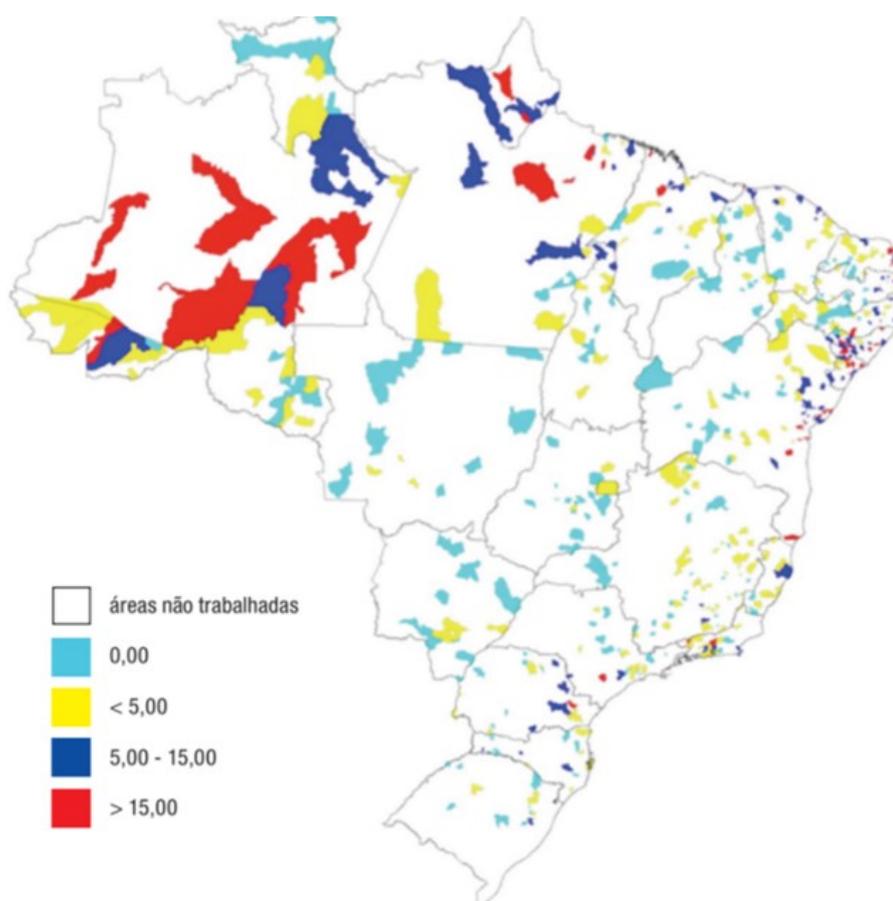


Figura 5. Distribuição da tricuriase segundo o INPEG 2010/2015

Legenda: Mapa de distribuição da tricuriase no Brasil, que mostra as áreas onde mais ocorrem a doença, sendo a região Norte onde se tem a maior incidência representado em vermelho (Katz, 2018).

Atualmente, o tratamento da tricuriase humana é feito com uso do albendazol e mebendazol, seguindo um protocolo estabelecido para esta e outras geo-helminthíases. Existem também protocolos de tratamento em massa no Brasil, em crianças com idade escolar (5 a 14 anos) quando o percentual de positividade nos levantamentos epidemiológicos feitos por

exames de fezes é maior que 20% (Ministério da Saúde, 2012; Specht e Keiser, 2023). Diversos autores têm debatido sobre o tratamento em massa, destacando que essas são medidas de baixa ou nenhuma eficiência. Alguns pontos são destacados, como: a baixa eficácia desses fármacos contra o *Trichuris*, altas taxas de reinfecção após o tratamento, desenvolvimento de resistência, (Hayon *et al.*, 2021), destacando a tricuriase, que vem apresentando resistência, em modelos animais, aos tratamentos adotados convencionalmente (Ahmadi Jouybari *et al.*, 2016; Moser *et al.*, 2017; Barda, 2022). O uso dos medicamentos nestes modelos de tratamento em massa, mencionado muitas vezes erroneamente como quimioterapia preventiva, pode ter contribuído na crescente resistência desses helmintos aos fármacos mais amplamente usados, fazendo uma pressão seletiva nesses parasitos (Else *et al.*, 2020).

Estudos mostram que com o uso de fármacos comumente indicados (albendazol ou mebendazol), as taxas de cura dos pacientes são baixas (Ahmadi Jouybari *et al.*, 2016; Moser *et al.*, 2017). Algumas outras formas de tratamento vêm aparecendo, como por exemplo a combinação do uso de albendazol com a ivermectina, mostrando melhores porcentagem de eficácia (Barda, 2022). Associa-se este fato ao comportamento biológico do parasito, que o distingue dos demais nematóides intestinais. Nematóides do gênero *Trichuris* inserem a região anterior na mucosa intestinal do intestino grosso, o que pode dificultar a ação dos fármacos que apresentam baixa absorção intestinal e alta concentração na luz do órgão. Associado a este fato, a possível atividade de detoxificação dos fármacos pela banda bacilar (Hansen *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2016), também pode explicar de forma geral esta crescente resistência à estes fármacos.

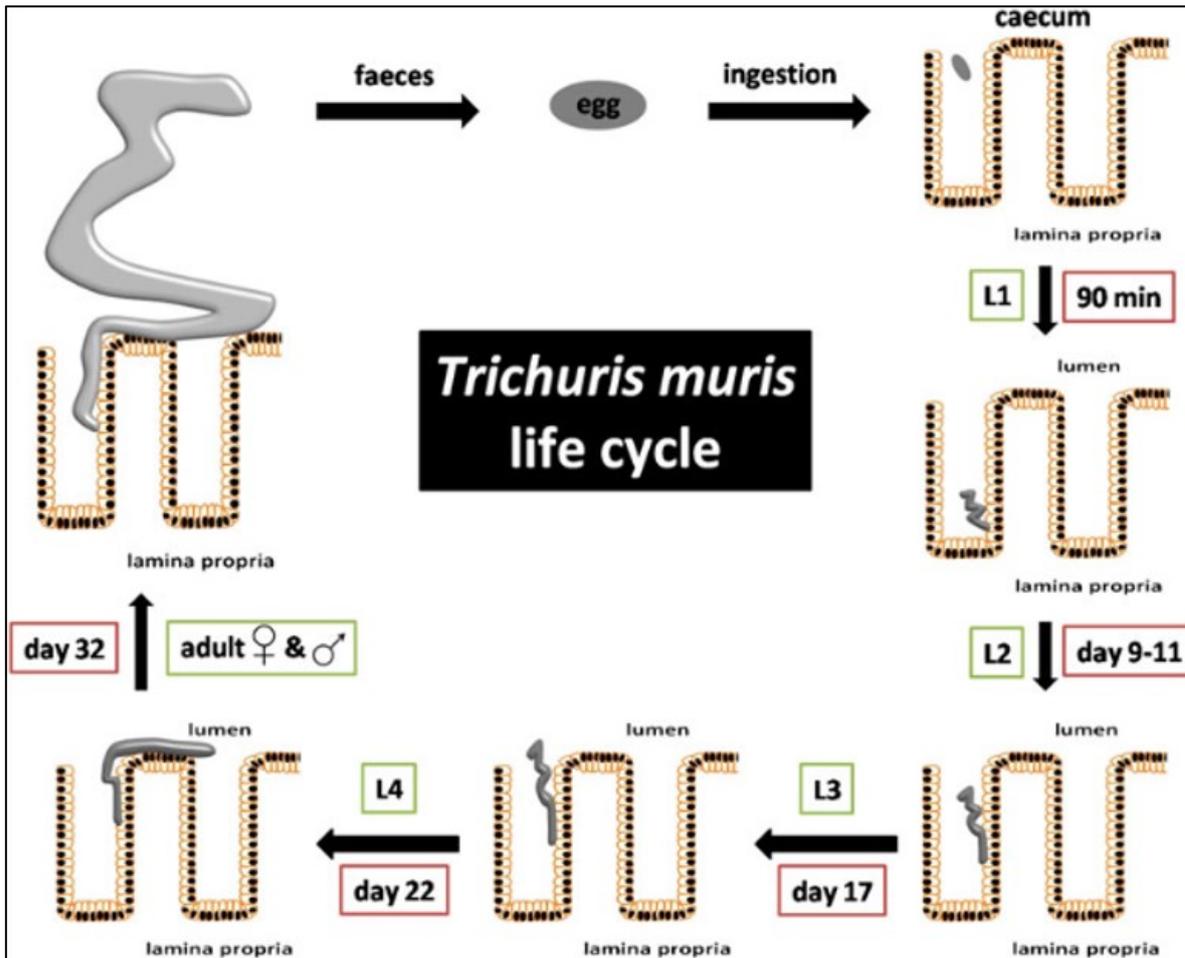
Como mencionado anteriormente, a espécie que é parasito de humanos é a *T. trichiura*, entretanto existem relatos consistentes da presença deste parasito em primatas não humanos. A espécie *Chlorocebus sabaeus*, primata de origem do continente africano (encontrado em outros continentes) é conhecida como macaco-verde (Chapman *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2018; Gallagher *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2021). Em trabalho publicado em 2018, os autores identificaram a presença de vermes adultos de *Trichuris trichiura* (dentre outros parasitos) nestes primatas, na qual foi confirmada por caracterização molecular (Cruz *et al.*, 2021; Gallagher *et al.*, 2019). Este é um tópico de atenção especial já que, todo panorama epidemiológico pode ser alterado com a confirmação de que a tricuriase humana, também pode ser uma zoonose, nos países onde a sua prevalência é alta. Esses primatas podem estar atuando como um reservatório natural do *T. trichiura*, ampliando a contaminação ambiental e dificultando seu combate e controle.

## **Ciclo biológico do *Trichuris muris* e sua relação com a microbiota do hospedeiro**

Em relação ao ciclo de vida, após serem ingeridos, os ovos embrionados do *Trichuris muris* passam pelo estômago, são sensibilizados pela acidez estomacal, atingem o intestino delgado, sofrem um processo de interação com a microbiota intestinal, que fragiliza os plugues e viabiliza a eclosão da larva L1, esse contato dos ovos com as bactérias da microbiota hospedeira se mostra essencial para que o ciclo do parasito continue (Hayes *et al.*, 2010). Em experimentos com camundongos *germ free* foi mostrado que não há o estabelecimento da infecção (Hayes *et al.*, 2010). Trabalhos mostram que grupos bacterianos específicos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dentre outras espécies, interagem com as regiões dos plugues dos ovos do parasito, para facilitar a degradação destes e viabilizar a eclosão das larvas (Robertson *et al.*, 2023).

Já no íleo, as larvas eclodem dos ovos, após sensibilização, por volta de 90 minutos (Klementowicz *et al.*, 2012) após a ingestão. Em seguida, as larvas L1 penetram na mucosa do intestino grosso (Duque-Correa *et al.*, 2022). Esta penetração ocorre pelas criptas de Lieberkuhn, se estabelecendo no cólon ou no ceco. Inserida no tecido as larvas crescem, realizando a primeira muda para L2, (9-11 dias), em seguida L3 (17 dias) e L4 com 22 dias após a ingestão do ovo. Depois de 32 dias, em média, elas fazem a última muda para a forma adulta, finalizando a formação da banda bacilar, e iniciando o processo de produção liberação dos produtos de excreção e secreção (ES). Ficam com a região anterior (banda bacilar) fixada na mucosa do intestino, enquanto sua parte posterior fica na luz intestinal, podendo assim começar o processo de reprodução após o amadurecimento dos órgãos genitais (Klementowicz *et al.*, 2012). Tendo a cópula, a fêmea começa a produção de ovos, e estes serão eliminados ainda não embrionados nas fezes, recomeçando o ciclo de vida do parasito, como podemos ver na figura 5.

Figura 5 - Ciclo biológico do *Trichuris muris*



Legenda: Ciclo de vida do *Trichuris muris* (Klementowicz *et al.*, 2012).

Na maioria dos casos, a infecção por esses helmintos é assintomática, porém quando há manifestações, os principais sintomas são: náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais. A tricuriase também está relacionada com a doença inflamatória intestinal, ligada com diarreia crônica, má nutrição, podendo resultar em anemia, restrição no crescimento físico e cognitivo em crianças (Ministério da Saúde, 2012). Em casos mais graves, a infecção pode causar a síndrome de disenteria por *Trichuris* (*Trichuris dysentery syndrome - TDS*), levando a má nutrição, diarreia com sangue e prolapso retal (Hayon *et al.*, 2021). Muitos desses sintomas são causados devido às lesões teciduais que o parasito promove ao penetrar e se movimentar na mucosa intestinal.

Esse processo de ancoramento e deslocamento do parasito adulto vai gerar um intenso infiltrado inflamatório, inchaço das camadas teciduais do intestino grosso, contribuindo para

estes sintomas. Além disso, ao penetrar na mucosa, o nematoide vai formando túneis sinciciais epiteliais (Tilney *et al.*, 2005; Lopes-Torres *et al.*, 2013 e outros). Essas lesões no epitélio em associação com a movimentação do parasito nestes túneis, servem de porta de entrada para bactérias presentes na microbiota intestinal do hospedeiro, ou seja, as bactérias presentes na luz intestinal penetram em camadas mais profundas do intestino através das rupturas causadas pelo parasito na mucosa. Este processo de translocação bacteriana foi inicialmente descrito em fase crônica da infecção experimental em murinos (Schachter *et al.*, 2020), com a identificação de bactérias invadindo a submucosa intestinal. Além disso, a presença destes nematoides no intestino de mamíferos promove alteração da microbiota intestinal, causando disbiose (Holm *et al.*, 2015; Schachter *et al.*, 2020).

### **Composição da microbiota intestinal do hospedeiro e alterações promovidas pela infecção por helmintos**

A microbiota é de grande importância para o metabolismo do hospedeiro, formada por um conjunto de bactérias, vírus, archaea e organismos eucariotos, que vivem de forma harmônica e simbiótica no organismo (Adak e Mojibur, 2018). As bactérias presentes no intestino são bastante diversificadas, provenientes de um processo longo de seleção pelo metabolismo do hospedeiro e coevolução. Fatores como crescimento bacteriano, nutrientes disponíveis no meio ambiente, vão influenciar e selecionar a composição da microbiota (Backhed *et al.*, 2005).

A microbiota do sistema digestório tem várias funções para o hospedeiro, como de proteção e atividades metabólicas (digestão, absorção, etc.). A diversidade da microbiota é importante para que todas essas funções possam ser cumpridas e assim manter a homeostase do organismo. Alguns filos bacterianos se destacam na microbiota intestinal, como Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia e Cyanobacteria, sendo que Bacteroidetes e Firmicutes são os mais abundantes, podendo chegar até 90% da população geral (Adak e Mojibur 2018). Além da classificação taxonômica, há a classificação em diferentes enterotipos: Bacteroides (enterotipo 1 - Atividades sacarolíticas e proteolíticas), Prevotella (enterotipo 2 - Degradação de glicoproteínas de mucina) e Ruminococcus (enterotipo 3 - Atividades de degradação de mucina e transporte de açúcares através da membrana); porém essa divisão ainda é muito discutida, onde outros grupos são propostos devido a grande variação dos indivíduos (Arumugam *et al.*, 2011; Adak e Mojibur 2018).

Ao longo do trato digestório, há pequenas diferenças em cada região, sendo que a diversidade e abundância vai crescendo ao que se aproxima dos intestinos (Anwar, 2021). No estômago são encontradas bactérias como *Lactobacillus*, *Neisseria* e *Helicobacter pylori*; e algumas bactérias provenientes da boca também, como *Clostridium*, *Veinonella* e *Lactobacillus* (Adak e Mojibur, 2018). Já no intestino delgado, nas regiões do duodeno e jejuno se encontram: *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Actinobacteria* e *Enterococci*. No íleo, última região do intestino delgado se encontra: *Enterococci*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Corynebacterium* (Adak e Mojibur, 2018).

No intestino grosso, órgão com a maior diversidade bacteriana do trato gastrointestinal, os principais gêneros encontrados são *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, dentre outros; podendo ser encontradas também algumas espécies patogênicas, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* (Adak e Mojibur, 2018). Algumas dessas bactérias possuem importantes funções, como por exemplo as *Bacteroides*, que estão associadas a metabolismo de polissacarídeos complexos, proteínas e lipídeos (Zafar e Saier, 2021); *Lactobacillus*, que ajudam a formar uma barreira intestinal e proteção (Tannock *et al.*, 2005).

Por conta das especificidades destes microrganismos com seu hospedeiro e adaptação ao tecido, metabolitos, dentre outros fatores; a composição da microbiota pode sofrer alterações de acordo com a sua localização em um mesmo indivíduo, idade, sexo, condição de saúde, estilo de vida, dentre outros fatores. A dieta do indivíduo também vai influenciar fortemente na composição da sua microbiota, sendo sensíveis a quantidade e componentes desses alimentos (Zmora *et al.*, 2019). A dieta rica em carboidratos complexos vai resultar em aumento de *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, dentre outros; e vai diminuir bactérias como *Eubacterium*. Já a ingestão de oligossacarídeos também pode promover o aumento de *Bifidobacteria*, porém irá promover a diminuição de *Bacteroides* (Bibbo *et al.*, 2016). Outro exemplo de como a dieta modula a composição da microbiota é a ingestão elevada de ácidos graxos. Por exemplo, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados pode reduzir a quantidade de *Lactobacillus* na microbiota, o que interfere na capacidade dessas bactérias de aderirem à mucosa intestinal. Esse efeito pode comprometer a integridade da barreira intestinal e, conseqüentemente, a proteção do intestino. O consumo de ácidos graxos monoinsaturados promove diminuição de *Bifidobacteria* e aumento de *Bacteroides* (Bibbo *et al.*, 2016). Um fator interessante é a diversidade na composição da microbiota de acordo com onde o indivíduo vive, já que cada região vai ter costumes alimentícios diferentes (Bibbo *et al.*, 2016).

A presença de helmintos também será um fator que influencia na composição da microbiota, isso acontece devido a diversos fatores, como por exemplo os antígenos intrínsecos do corpo destes parasitos, bem como seus metabólitos e, com destaque em seus produtos de ES liberados no hospedeiro que possuem diversas proteínas com diferentes ações descritas, dentre elas atividade antimicrobiana (Abner *et al.*, 2001; Ashour e Othman 2020; Midha *et al.*, 2018; Beyhan e Yildiz 2023). Além disso, os parasitos e a microbiota podem competir pelos mesmos nutrientes, além dos hábitos do hospedeiro também interferirem nessa relação (Ashour e Othman, 2020). Existem vários estudos correlacionando infecções parasitárias e a microbiota; um exemplo seria a infecção por *Ascaris* spp. que pode causar aumento em *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e diminuição na *Rhodococcus* (Beyhan e Yildiz 2023).

Na presença de espécies do gênero *Trichuris*, alguns autores mostraram que existe um impacto na microbiota, alterando a sua composição ao comparar com hospedeiros de mesma idade e comportamento quando não infectados. Holm *et al.*, 2015, estudando modelo de camundongos C57BL/6 machos infectados por uma baixa dose parasitária de 20 ovos de *T. muris*, observou a mudança na composição da microbiota desses animais, e antes dos experimentos começarem, os camundongos foram separados para que sua microbiota não sofresse alterações e impactassem os resultados. Para análise dessas mudanças, foram utilizados fezes e fragmentos dos cecos desses animais, e as bactérias foram identificadas por sequenciamento genético por 16S rRNA. Foi observado que os animais infectados tiveram aumento de bactérias do gênero *Bifidobacterium* no dia 13º de infecção. Os filos Firmicutes, Proteobacteria e Lactobacillaceae aumentaram, enquanto houve diminuição de Bacteroidetes, no período entre o 27º e 35º dias de infecção, sendo as bactérias Lactobacillaceae foi que teve a maior presença dentre as amostras. Alguns outros grupos também sofreram alterações, como na diminuição dos representantes dos gêneros *Allobaculum*, *Barnesiella* e *Parasutterella* diminuíram, e o aumento de espécies dos gêneros *Alistipes* e *Odoribacter*. Todos esses dados mostram que a tricuriase experimental causa um desbalanço na microbiota do hospedeiro murino, diminuindo a diversidade e aumentando a abundância de determinados grupos (Holm *et al.*, 2015).

### ***Trichuris muris* como modelo experimental**

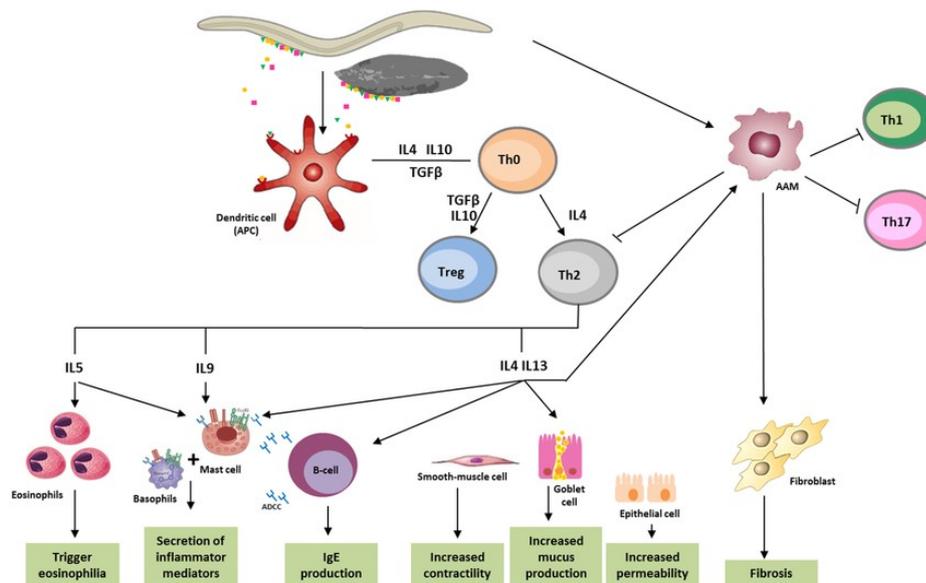
Atualmente existem cerca de 80 espécies de *Trichuris* reportadas (Mair *et al.*, 2021), sendo além do *T. trichiura* (descrito por Owen, 1835) em humanos, outras espécies apresentam importância, como o *Trichuris vulpis* em canídeos, *Trichuris serrata* em felinos, *Trichuris ovis* parasito de ovinos e o *Trichuris suis*, com crescentes registros de impactos na produção em escala industrial de suínos (Cutillas *et al.*, 2009; Traversa, 2011; Ketzis *et al.*, 2015).

A espécie mais usada como modelo experimental é o *T. muris*, encontrado naturalmente parasitando o intestino de camundongos (*Mus musculus*) (Forman, 2021). Esse modelo tem sido usado para entender melhor o papel deste parasito, sua interação com o hospedeiro mamífero, destacando os importantes avanços em relação aos aspectos da resposta imune que promovem resistência ou susceptibilidade à infecção (Klementowicz *et al.*, 2012). Trabalhos do nosso grupo mostraram que a infecção pelo *T. muris* promove translocação bacteriana e alteração da microbiota intestinal de camundongos (Schachter *et al.*, 2020). Estudos com este modelo de infecção experimental mostram que a susceptibilidade ou resistência da infecção dependem do background genético dos hospedeiros, tendo um importante papel dos macrófagos na identificação do patógeno intestinal e direcionamento para um perfil de resposta imune majoritariamente Th1 ou Th2 (Else e Grencis, 1992).

Os modelos mais resistentes à infecção por helmintos apresentam uma resposta imune do tipo Th2, característica desse tipo de infecção. Nesse cenário, os linfócitos Th2 produzem um perfil de citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13, que promovem diversas respostas imunes: produção de anticorpos, como IgE; diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (M2); mobilização de eosinófilos; e aumento da peristalse intestinal. Essas ações contribuem para a destruição de larvas e helmintos adultos, além de promoverem a reparação de lesões teciduais. Esse perfil de resposta adaptativa aumenta a chance de expulsão do parasito, especialmente nos primeiros dias em casos de reinfecção, após a ingestão de ovos.

Por outro lado, os hospedeiros mais suscetíveis apresentam uma resposta imune predominantemente do tipo Th1, mais inflamatória. Nesse perfil, os linfócitos Th1 produzem citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-2, que direcionam uma resposta imune celular, ativando células TCD8<sup>+</sup> e macrófagos classicamente ativados (M1). Essa resposta, voltada principalmente para o controle de parasitos intracelulares, favorece o desenvolvimento do helminto no intestino, permitindo que ele se estabeleça nos tecidos e progrida para a fase crônica da infecção (Yousefi *et al.*, 2021).

Figura 6 - Resposta imune contra helmintos



Legenda: Esquema ilustrando a resposta imune contra helmintos. A infecção por helmintos leva principalmente a uma resposta do tipo Th2. Antígenos do parasito são reconhecidos por células dendríticas, que atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs) para células. A liberação de citocinas como IL-5, que desencadeia a maior produção de eosinófilos e IL-4, IL-9, IL-13, além de IgE, que ajuda a ativar basófilos e mastócitos, provocando a secreção de mediadores inflamatórios. IL-4 e IL-13 ajudam na motilidade das células musculares lisas, estimulam a permeabilidade intestinal e elevam a secreção de muco pelas células caliciformes

Fonte: Adaptado de Montaner *et al.*, 2014.

Outro fator que pode influenciar na expulsão do parasito é o sexo do hospedeiro, trabalhos mostraram que hormônios sexuais podem afetar na resposta imune do hospedeiro, influenciando a expulsão do helminto, apresentando maior resistência em hospedeiros do sexo feminino (Bancroft *et al.*, 2000). A dose de ovos usada na infecção também pode afetar nesse quadro, sendo que em hospedeiros de susceptibilidade variável, a baixa dose de infecção desencadeia uma resposta do tipo Th1, resultando no estabelecimento da fase crônica da infecção. No caso da infecção em dose alta de ovos, esta vai desencadear uma resposta do tipo Th2, gerando resistência com a consequente expulsão do parasito (Yousefi *et al.*, 2021).

Além disso, existem alguns mecanismos relacionados à fisiologia de mucosa que ajudam na expulsão deste nematoide. Um deles é o *turnover* celular ou renovação de células epiteliais que vai dificultar o *Trichuris* a permanecer fixado na parede do intestino. Algumas citocinas como IL-4, IL-9 e IL-13 também estão relacionadas com o processo de expulsão do helminto, sendo a IL-9 responsável pela contração muscular, que auxilia nesse quadro (Bancroft *et al.*, 2004). Ainda neste parâmetro de imunologia da mucosa, a produção de mucinas,

principalmente, Muc5ac, formam uma barreira que dificulta a permanência do parasito no tecido (Hasnain *et al.*, 2011).

### Produtos de Excreção-Secreção (PES)

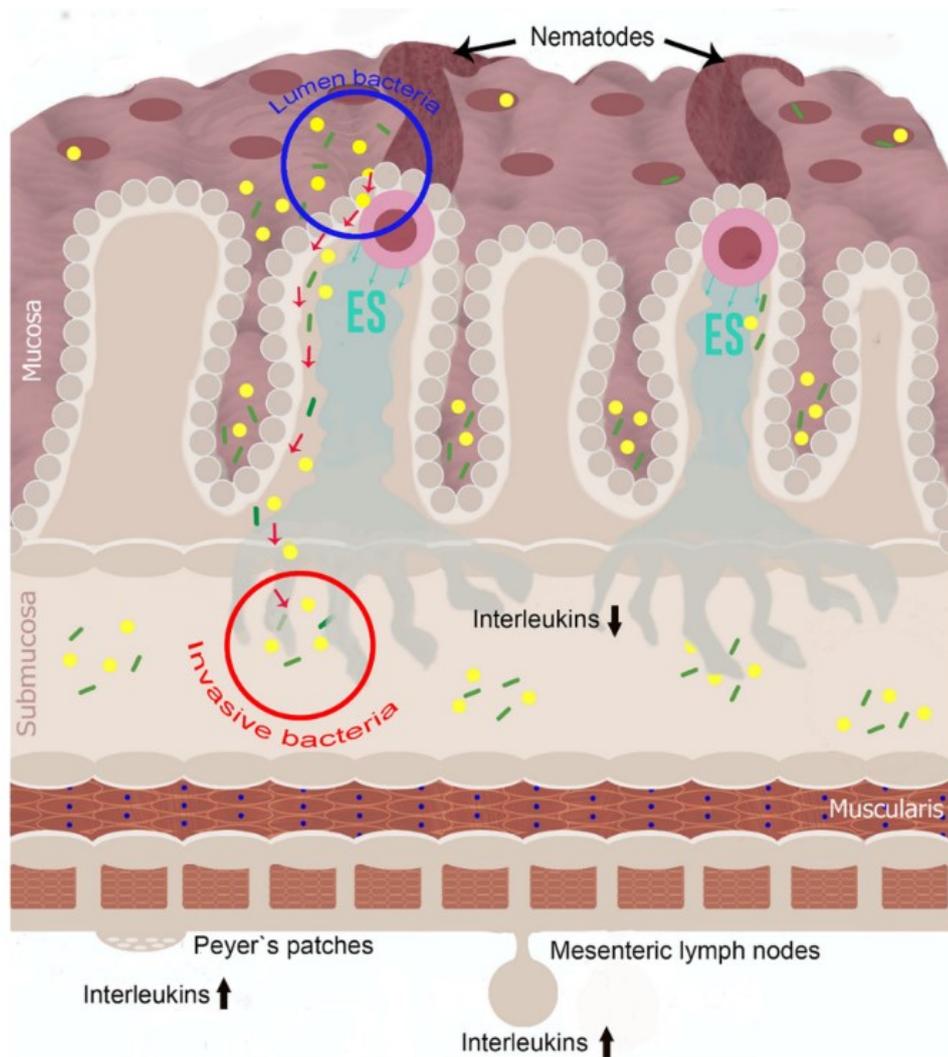
No processo de interação parasito-hospedeiro, a atividade dos produtos de excreção-secreção (PES) liberados pelos helmintos durante a infecção, sempre foram alvos de estudos, principalmente com o foco em atividades imunomoduladoras. Estes produtos são ricos em proteínas e microRNAs, no qual muitas proteínas possuem funções associadas ao equilíbrio parasitário, auxiliando no estabelecimento e manutenção do parasitismo. Estudos relacionados aos PES incluem análises em nematóides, trematódeos e cestódeos. O potencial modulador destes produtos no sistema imune do hospedeiro permite que estes helmintos, mesmo com uma grande biomassa e alta antigenicidade, permaneçam em seus sítios parasitários no corpo de seus hospedeiros, muitas vezes causando lesões teciduais importantes (Harnett, 2014).

Os PES, além de promoverem imunomodulação, também são de extrema importância para outras funções vitais para os helmintos em diferentes fases do seu ciclo de vida. Um exemplo referente aos helmintos dos gêneros *Ascaris*, *Taenia* e *Ancylostoma* e *Necator*, é que ao longo do seu ciclo, os produtos de ES apresentam um arranjo de proteínas, lipídeos, carboidratos e outros metabólitos que vão auxiliar no processo de penetração e migração, sobrevivência do parasito no ambiente externo, nutrição e reprodução (Abuzeid *et al.*, 2020; Arora *et al.*, 2023; Castañeda *et al.*, 2024).

Como destacado anteriormente nematóides do gênero *Trichuris*, também se destacam por terem seus produtos de ES como alvo de estudo para ampliar a compreensão da relação parasito-hospedeiro. Diante disso, na mesma linha que os demais helmintos, a função mais conhecida e discutida também é a associada à imunomodulação de seus hospedeiros. Este processo é extremamente importante para que o parasito consiga se estabelecer no tecido intestinal do mamífero, principalmente nos primeiros dias de infecção, ainda em fase aguda, e depois para manter-se inserido na mucosa, já em fase crônica com a cópula dos adultos e a eliminação de ovos nas fezes (Harnett, 2014). Outras proteínas também já foram descritas com funções específicas associadas a este processo de adaptação parasitária, como por exemplo as serina proteases que estão associadas à degradação de mucinas do intestino (Hasnain *et al.*, 2012), a SCP domain-containing protein que tem sua ação ligada à penetração nas camadas do

intestino (Morante *et al.*, 2017), dentre outras. Outro ponto que vai influenciar no quadro da doença é que os PES, não só auxiliam no estabelecimento desses nematóides no intestino do hospedeiro, como também podem ajudar na translocação bacteriana, já que a resposta imune modulada, pode facilitar o processo de saída do lúmen, invasão e colonização do parênquima tecidual das camadas mais profundas do intestino, como a mucosa e submucosa epitelial (Schachter *et al.*, 2020). Na figura 7, podemos ver um esquema onde mostra esses parasitos fixados na parede intestinal liberando os PES, a imunomodulação e a translocação bacteriana.

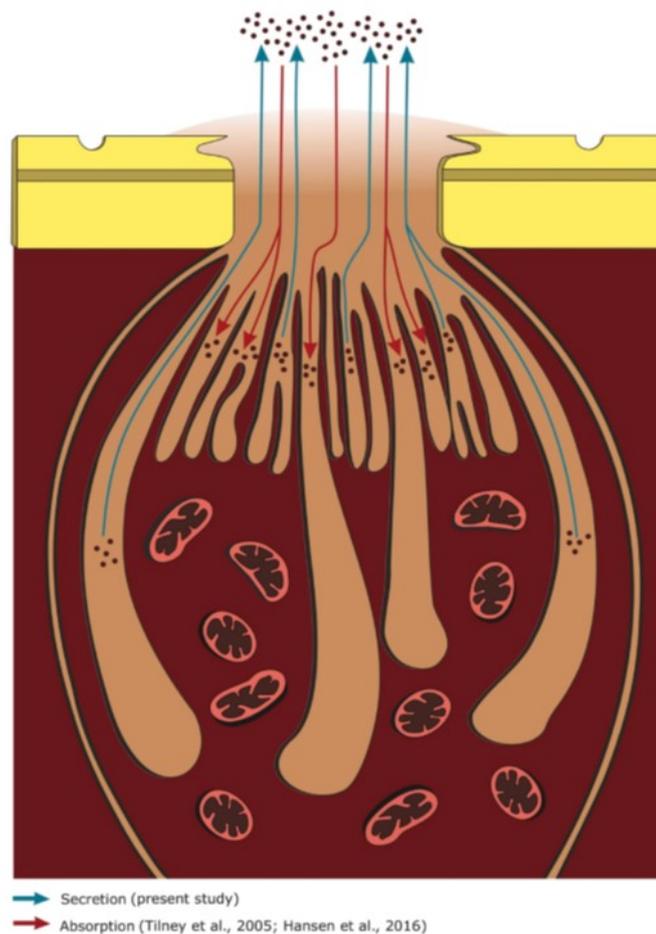
Figura 7 - Esquema representando a atuação no *Trichuris muris* no intestino



Legenda: Esquema representa um corte transversal do tecido intestinal. O lúmen se encontra na parte superior da figura, onde estão as bactérias da microbiota, representadas em verde e amarelo, e nematóides do gênero *Trichuris*, indicados pelas setas. Os nematóides se encontram ancorados na mucosa intestinal. Estes irão produzir o PES, representado em azul, e assim vai fazer a imunomodulação do hospedeiro. Podemos observar também a translocação bacteriana acontecendo, onde estas migram para dentro do tecido, invadindo outras camadas, como a submucosa intestinal, indicado pelas setas e círculos vermelhos (adaptado de Schachter *et al.*, 2020).

Alguns estudos apontam que os produtos de ES do *Trichuris* podem estar mais diretamente associados à região da banda bacilar desses helmintos. A banda bacilar é composta por aproximadamente 50 mil glândulas bacilares que se concentram exatamente na região anterior do nematoide que fica inserida na mucosa epitelial, em contato direto com as células do tecido hospedeiro. Estas estruturas começam a ser formadas no estágio L2, porém só está completamente formada nos vermes adultos, apresentando as glândulas bacilares, inflações cuticulares e esticócitos (Wright, 1975). Os esticócitos são células associadas ao armazenamento e controle da liberação de proteínas pelas glândulas bacilares (Lillywhite, *et al.*, 1995). Além da secreção de produtos de excreção e secreção (Lopes-Torres *et al.*, 2020), as glândulas bacilares estão associadas à absorção de nutrientes (Zd'árská e Nebesárová, 2000), adesão (Zaman, 1984), movimento do parasito (Wright, 1975), dentre outras; onde está esquematizado na figura 8.

Figura 8 - Esquema representativo da banda bacilar de *Trichuris muris*



Legenda: Esquema do funcionamento da banda bacilar do *Trichuris muris*, mostrando os processos de secreção (setas em azul) e absorção (setas em vermelho).

Fonte: Adaptado de Lopes-Torres *et al.*, 2020

Os principais mecanismos de imunomodulação dos PES envolvem a modulação da expressão de receptores de reconhecimento de padrões moleculares, como por exemplo: TLRs (reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e danos celulares) CLRAs (reconhecem padrões relacionados a fungos), NLRs (reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e danos celulares no citoplasma), dentre outros; nas células do sistema imune, que são de extrema importância para o reconhecimento de antígenos, ou dos PES que podem agir como homólogos de citocinas, ou seja, mimetizam essas moléculas, atrapalhando no processo imunológico contra esses patógenos. Esses produtos também desempenham um papel na regulação e polarização das células imunes, contribuindo para o mascaramento da resposta inflamatória por meio da ação de citocinas da via anti-inflamatória, como IL-10, IL-35 e TGF- $\beta$  (Darlan *et al.*, 2021).

Alguns autores fizeram a descrição dos PES de *T. muris* e *T. trichiura*, e notaram que o peso molecular das proteínas pode variar de 43 à 110 kDa (Jenkins e Wakelin, 1977; Else e Wakelin, 1989; Lillywhite *et al.*, 1995). Nesses PES há diversas proteases, como cisteína proteases, que ajudam nos processos de nutrição e invasão (Caffrey *et al.*, 2018), serina proteases (Hasnain *et al.*, 2012), que ajudam na degradação de mucinas, importante para o processo de estabelecimento no intestino (Hasnain *et al.*, 2011), serpinas ou proteases inibidoras de serinas (Molehin *et al.*, 2012), dentre outras proteases. Possuem também diversas proteínas Heat Shock, que são moléculas cujo papel principal é facilitar o dobramento de proteínas sendo um meio de lidar com fatores de estresse; porém alguns estudos já mostram que as Heat Shock também podem atuar como imunomoduladoras (Zininga *et al.*, 2018). Diversos domínios de proteínas são encontrados em diferentes espécies de helmintos, além de *Trichuris*, exemplos são: domínio WAP, conhecidas por suas propriedades antibacterianas (Amparyup *et al.*, 2008) e potencial para desenvolvimento de vacinas para helmintos (Wainwright e Shears, 2022), e domínio SCP, desempenham papéis em processos de imunomodulação e penetração tecidual (Morante *et al.*, 2017).

A proteômica é uma área da biologia que estuda o proteoma, ou seja, o conjunto de proteínas expressas por células, tecidos ou organismos (Emidio *et al.*, 2015). Para esses estudos são usadas diversas ferramentas de bioinformática para análise do conjunto de proteínas.

O KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) é um banco de dados e um recurso de bioinformática que foi desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa de Bioinformática de Kyoto. Este banco de dados é amplamente utilizado para a análise funcional e interpretação de dados genômicos e de proteômica, reunindo informações sobre genes, proteínas, vias metabólicas e redes moleculares (Leroux *et al.*, 2018; Cui, *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021;

Zakeri *et al.*, 2021). O banco de dados permite a visualização e integração das vias bioquímicas e de sinalização, facilitando a compreensão das interações moleculares e dos processos biológicos em diferentes organismos. Com base neste banco de dados os autores Leroux *et al.*, (2018), Wangchurk *et al.*, (2019) e Wang *et al.*, (2021), descreveram, em helmintos, funções como: Glicólise/gliconeogênese, Vias do metabolismo do amido e da sacarose, vias do metabolismo do carbono, metabolismo do piruvato, metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos e metabolismo energético, dentre outros.

Outra ferramenta de bioinformática conhecida é a base de dados STRING. É uma plataforma onde podemos sinalizar as proteínas encontradas em nossos estudos para que possamos entender como se dá a interação proteína-proteína, formando gráficos de rede complexos que vão expor visualmente essas interações (Szklarczyk *et al.*, 2020). Essa ferramenta pode ter várias aplicações. Em 2021, Wang *et al.* analisaram diferentes isolados de larvas musculares de *Trichinella pseudospiralis* provenientes de diversos países (Rússia, Estados Unidos e Austrália). Utilizando redes proteicas, eles mapearam as proteínas identificadas em cada isolado, facilitando a visualização e comparação das diferenças específicas entre eles. Também em 2021, Cui *et al.* aplicaram essa abordagem em experimentos envolvendo *Taenia solium*. O estudo focou na análise proteômica dos cistos de *T. solium* do parasito, com o objetivo de aprofundar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da cisticercose.

Alguns outros fatores são utilizados para analisar essas redes de interação de proteínas. O Betweenness, é uma análise que vai medir o número total de caminhos não redundantes que passam por um nó, neste caso, por uma proteína. Ele avalia o quão importante é a proteína para o fluxo de informações na rede, podendo atuar como intermediária de interações entre outras proteínas (Yu *et al.*, 2007). A análise de gargalos ou bottlenecks na proteômica está relacionada à abundância de proteínas obtidas por meio de análise com espectrometria de massas (Yu *et al.*, 2007). Os gargalos em redes de proteínas representam pontos críticos (pontos centrais ou essenciais) de interação que podem impactar nas vias associadas, limitando ou regulando a atividade de outras proteínas. Em 2023, Sadjjadi *et al.* realizaram um estudo com *Echinococcus granulosus* focado na análise proteômica dos cistos desse parasito. O objetivo era identificar biomarcadores relevantes da equinococose cística. Para isso, utilizaram métricas de rede, como bottleneck e betweenness, para avaliar as proteínas mais importantes, destacando aquelas com maior potencial para serem usadas como biomarcadores

O peptídeo sinal é um termo genérico para sequências que determinam a via de secreção e o local alvo onde as proteínas irão interagir e exercer sua função (Hajar Owji *et al.*, 2018).

São curtas sequências de peptídeos que ficam na região N-terminal das proteínas (Ono *et al.*, 2021). Identificar essas proteínas é importante para entender como elas foram direcionadas para seus locais de ação, se por uma via convencional ou por mecanismos não convencionais. Os peptídeos de sinal podem estar associados a vesículas extracelulares, uma vez que proteínas com esses peptídeos têm a capacidade de ser secretadas por essa via (Ono *et al.*, 2021). Assim, a identificação de proteínas contendo peptídeos de sinal pode indicar a presença de vesículas extracelulares nos produtos de excreção e secreção. Em 2017, Tritten *et al.*, fez um estudo que investigava o conteúdo proteômico das vesículas de *T. muris*, onde encontraram algumas proteínas mais expressas, representadas na figura 9.

Figura 9 - Tabela com as proteínas encontradas em vesículas extracelulares

	Protein name	UniProt accession	Blast2GO description	Unique to this study
1	Poly-cysteine and histidine tailed protein isoform 2	<i>T. trichiura</i> , A0A077Z5Q5	Poly-cysteine and histidine tailed protein isoform 2	yes
2	Actin	<i>T. trichiura</i> , A0A077ZE37	Actin-5c	no
3	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	<i>T. trichiura</i> , A0A077ZHV3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	no
4	Dynein light chain	<i>T. trichiura</i> , A0A077ZJN3	Dynein light chain	no
5	Histone domain containing protein	<i>T. trichiura</i> , A0A077ZJV9	Histone-like	no
6	Uncharacterized protein	<i>T. suis</i> , A0A085MFD5	Phosphoglycerate kinase	no
7	Uncharacterized protein	<i>T. suis</i> , A0A085MAM6	Galactoside-binding lectin	no
8	Intermediate filament protein (ifa)	<i>T. trichiura</i> , A0A077Z6U0	Intermediate filament protein ifa-1	no
9	Uncharacterized protein	<i>T. suis</i> , A0A085MIT4	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	no
10	14-3-3 protein	<i>T. trichiura</i> , A0A077YXJ9	14-3-3 zeta	no
11	ATP synthase subunit beta	<i>T. trichiura</i> , A0A077Z3I0	ATP synthase beta subunit	no
12	Ubiquitin associated and SH3	<i>T. trichiura</i> , A0A077ZFQ2	Ubiquitin associated and sh3 domain-containing protein b	no
13	Triosephosphate isomerase	<i>T. trichiura</i> , A0A077ZC84	Triosephosphate isomerase	no
14	Uncharacterized protein	<i>T. trichiura</i> , A0A077ZFC1	Hypothetical protein TTRE_0000739101	yes
15	Fructose bisphosphate aldolase class I	<i>T. trichiura</i> , A0A077Z6Y9	Fructose-bisphosphate aldolase class-I	no

**Table 2. Fifteen most abundant *T. muris* proteins found in isolated vesicles/particles.** Proteins were mapped to *Trichuridae*; the UniProt accession number and the closest

Legenda: Tabela mostrando as 15 proteínas mais encontradas em vesículas extracelulares  
Fonte: Adaptado de Tritten *et al.*, 2017.

Com a crescente resistência do *Trichuris* aos fármacos comumente usados, torna-se estratégico a busca de novas formas de tratar e evitar a infecção por essa parasitose negligenciada que afeta milhões de pessoas. Estudos mostram a possibilidade do desenvolvimento de vacinas contra alguns parasitos. O desenvolvimento de vacinas contra esses patógenos ainda é difícil e lento. Isso ocorre devido à escassez de recursos financeiros e, principalmente, à falta de interesse econômico no desenvolvimento dessas vacinas. Entretanto, apesar de escassas, algumas vacinas contra doenças causadas por parasitos estão sendo

desenvolvidas e outras já existem, como a vacina para malária, que já está sendo usada, e esquistossomose, que está em fase mais avançadas (Moorthy *et al.*, 2004; Zalava e Fidel, 2022) e para leishmaniose e doença de Chagas na qual ainda estão em fases iniciais (Luna, 2020).

Ainda não existe uma vacina para a tricuriase, mas alguns estudos estão ocorrendo para desenvolvimento desta (Wainwright e Shears 2022). Porém, estão em estágios muito iniciais, já que muitos empecilhos, como a falta de antígenos efetivos e a ausência de um modelo animal para *T. trichiura*. Existem diferentes estudos com diferentes fatores do parasito como extratos do parasito, microvesículas, proteínas encontradas no produto de excreção e secreção do helminto, dentre outros (Hayon *et al.*, 2021).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo caracterizamos o processo de translocação bacteriana (Schachter *et al.*, 2020). Diante disso, realizamos o controle de microbiota intestinal com o tratamento de animais infectados em fase crônica com antibióticos. Observamos que os camundongos infectados com o *T. muris* e tratados com o antibiótico piperacilina sódica + tazobactam sódico tiveram uma importante redução do infiltrado inflamatório (Silva, 2019). Estes dados sugerem que as bactérias possuem um papel importante no impacto inflamatório da infecção. Neste estudo, também foram analisados os parasitos para verificar se o antibiótico impactou sua morfologia. No entanto, não foram observadas alterações na estrutura desses helmintos nem na oviposição das fêmeas (Silva, 2019).

## **Justificativa**

Diante da intensa relação dos nematoides tricuriídeos com o tecido hospedeiro e a microbiota, destaca-se a importância de investigar a influência dos produtos de excreção e secreção (PES) na interação entre enterobactérias e células intestinais. Esses produtos desempenham um papel essencial na sobrevivência do parasito, na regulação da resposta imune do hospedeiro e na modulação do ambiente intestinal, incluindo a composição e função da microbiota. Esses produtos desempenham um papel fundamental na sobrevivência do nematoide e na regulação da resposta do hospedeiro, podendo influenciar na composição e função da microbiota, além de afetar a integridade do tecido.

Estudos que usam PES em tratamentos de doenças autoimunes são chamados de helmintoterapia. Há estudos nesta linha com o uso dessas substâncias como alternativa no tratamento de doenças inflamatórias tais como a doença de Crohn (Reddy e Fried, 2007) e

alergias (Ebner *et al.*, 2014). Os PES modulam a resposta imune do paciente para uma direção anti-inflamatória, fazendo com que os sintomas dessas doenças fiquem mais amenos, mostrando ser um importante potencial terapêutico de moléculas que estão presentes nestes produtos.

A caracterização proteômica desses produtos na tricuriase experimental, especialmente diante do uso de antibióticos para controlar a diversidade bacteriana da microbiota intestinal, torna-se estratégica para ampliar a compreensão dos mecanismos de modulação imunológica e adaptação do parasito ao ambiente intestinal. bem como servem de base para a elaboração de métodos inovadores de diagnóstico, tratamentos e até o desenvolvimento de alvos para vacinas.

Compreender como a alteração da microbiota influencia o perfil proteico dos PES pode revelar novas estratégias terapêuticas e fornecer *insights* valiosos sobre a fisiopatologia das parasitoses intestinais. Esse conhecimento é estratégico para o desenvolvimento de abordagens antiparasitárias inovadoras e para o avanço das práticas de saúde pública, contribuindo para a melhoria do controle dessas doenças negligenciadas que ainda afetam milhões de pessoas em todo o mundo.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Geral

Caracterizar a composição proteica dos produtos de excreção e secreção (PES) de nematóides *Trichuris muris* recuperados de infecção experimental em camundongos suíços submetidos ou não ao tratamento com antibióticos, avaliando se a alteração da microbiota intestinal influencia na composição proteica destes PES e na interação com enterobactérias em co-cultivo com células intestinais.

### 1.2 Específicos

- a) Caracterizar por proteômica os PES liberados *in vitro* de *T. muris* isolados de camundongos Swiss Webster submetidos ou não ao tratamento com piperacilina sódica + tazobactam;
- b) Avaliar as predições de vias de secreção, se as proteínas presentes nos PES de *T. muris* possuem peptídeos sinal e se já foram descritas em vesículas extracelulares;
- c) Analisar as funções das proteínas encontradas no produto de excreção e secreção do *T. muris*, principalmente imunomoduladora, antimicrobiana e proteolítica;
- d) Analisar a influência dos PES sobre o crescimento, dispersão e formação de colônias *in vitro* de *Escherichia coli* 042, *E. coli* DH5 $\alpha$  e *Salmonella* c20;
- e) Analisar a influência dos PES na interação das bactérias *Escherichia coli* 042, *E. coli* DH5 $\alpha$  e *Salmonella* c20 em contato com a monocamada de células T84 e Caco-2;
- f) Verificar se os produtos de excreção e secreção de *T. muris* interferem na formação de biofilme nas espécies *Escherichia coli* 042 (controle positivo para formação) e *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (controle negativo para formação).
- g) Analisar a sensibilidade do crescimento bacteriano das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (gram +) e de *Escherichia coli* AB1157 (gram -) em interação com os produtos de ES de *T. muris*

- h) Avaliar o comportamento das bactérias *S. aureus* ATCC25923 (gram +) e de *E. coli* AB1157 (gram -) por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

## 2 METODOLOGIA

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ), sob o protocolo de número CEUA 020/2018.

### 2.1 Embrionamento dos ovos e infecção experimental

As fêmeas adultas de *Trichuris muris* foram recuperadas de intestino de camundongos previamente infectados (35 dias após infecção), logo após foram incubadas em estufa em meio de cultura RPMI por 24 horas, para que elas fizessem a postura dos ovos. Para realizar o processo de embrionamento, os ovos recuperados foram incubados em estufa a 28°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em água estéril, por 30 dias. Após esse período, a confirmação do embrionamento foi feita por microscopia de luz. Quarenta camundongos *Swiss* machos, com 4-6 semanas, foram infectados com 150 ovos embrionados *T. muris* em 100µL de água estéril por gavagem. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água estéril.

### 2.2 Imunomodulação dos animais

Como os camundongos *Swiss* não eram isogênicos (*outbreed*), após sete, nove e onze dias de infecção, os animais foram submetidos ao processo de imunomodulação com corticosteróides, para que a infecção conseguisse se estabelecer. (Hurst e Else, 2013) Utilizamos 50µl de dipropionato de betametasona (5 mg/mL) e fosfato dissódico de betametasona (2 mg/mL) - Dispropan por via intramuscular.

### 2.3 Exame parasitológico de fezes

Depois de 35 dias, a infecção já se encontra em fase crônica, e nessa fase foi realizado o exame parasitológico de fezes para confirmar o estabelecimento da infecção. Amostras de fezes frescas dos camundongos foram colhidas e analisadas pela técnica adaptada de Hoffman Pons e Janer ou Lutz. Os *pellets* de fezes frescas (em média 3 *pellets*) foram homogeneizados no fundo de um tubo com água destilada, em seguida deixados em repouso para sedimentação dos ovos do parasito; com ajuda de uma pipeta Pasteur, gotas do sedimento foram colhidas, e colocadas em lâminas, coberta por lamínulas, e por fim, os ovos foram observados em microscópio de luz usando objetiva de 10X e 40X.

### 2.4 Tratamento dos camundongos com antibiótico

Após a confirmação da infecção, parte dos animais (16 camundongos) foi submetida a tratamento com o antimicrobiano piperacilina sódica + tazobactam sódico na concentração de 8 mg/ml (Eurofarma). Foram divididos em dois grupos, não tratado com o antibiótico (NTD), e tratado com o antibiótico (TD). O tratamento com o antibiótico era realizado por via subcutânea, e nos não tratados, injetado apenas cloreto de sódio 0,9% estéril (14 camundongos), uma vez ao dia por oito dias. Depois desse período, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, o ceco foi extraído, e com ajuda de pincéis, os parasitos foram recuperados. Em seguida os vermes foram lavados em PBS estéril, separados e colocados em meio de cultura RPMI com antifúngico (100 µg/ml estreptomicina) e antibiótico (100 U/ml de penicilina) por 2 horas à 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>, para eliminar microrganismos contaminantes.

### 2.5 Extração do Produto de Excreção e Secreção (PES) e preparação do material somático para análise proteômica

Em seguida, os parasitos adultos recuperados do intestino dos animais foram lavados em PBS estéril novamente e colocados em meio de cultura RPMI (sem antibiótico e

antifúngico) e incubados por 24 horas à 37°C/5% CO<sub>2</sub>, para que os parasitos pudessem produzir o PES e as fêmeas fizessem a postura dos ovos. Após esse período, os nematóides foram retirados, colocados em tubos cônicos de centrifugação do tipo eppendorf e congelados à -80 °C para posteriormente serem utilizados para análise. Quanto ao material somático (amostra de todo o parasito) que foi congelado em nitrogênio líquido em seguida, macerado. O meio em que os helmintos se encontravam foram recuperados com ajuda de pipetas e colocados em tubos de 1,5ml e centrifugados por 5 minutos à 2500 rpm. Após esse processo, sobrenadante contendo o PES foi recolhido, acondicionados em tubos e congelados à -80 °C para as próximas análises

## 2.6 Preparo de amostras para a espectrometria de massas (MS/MS)

As amostras de PES (provenientes de um “pool” de parasitos) e conteúdo somático foram lavadas com tampão Tris-HCl (pH 8.5) para remoção de resíduos do meio de cultura. Posteriormente, foi realizada a suspensão desse conteúdo no reagente RapiGest SF Surfactant (Waters) 0,1% para desnaturação das proteínas. Na etapa posterior, as amostras foram sonicadas para a lise celular (realizada em banhos de gelo), em que foram realizados 5 pulsos de amplitude de 30%, com 30 segundos cada pulso, tendo um intervalo de 2 minutos entre cada. Depois desse processo, as amostras foram centrifugadas (15.000 x g por 30 min, a 4°C), para separar as partes solúveis e insolúveis. A concentração total de proteínas nas amostras foi determinada utilizando o kit micro BCA seguindo as instruções do fabricante. Depois foi analisado o perfil eletroforético, por eletroforese, com gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS (SDS-PAGE). A digestão proteolítica das amostras foi realizada em solução de acordo com o protocolo do RapiGest SF Surfactant com as seguintes adaptações: foi utilizada a enzima tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) em uma razão de 1 µg da enzima para cada 100 µg de proteína. Depois de um primeiro período de digestão proteolítica de 4 h a 37 °C, uma nova alíquota de tripsina (1 µg da enzima para cada 100 µg de proteína na amostra) foi adicionada e as amostras foram então incubadas por 16-20 h a 37 °C. Por fim, o RapiGest SF Surfactant foi removido com 0,5% de ácido trifluoroacético (TFA).

Para o próximo passo, foi feita a dessalinização das amostras. Os peptídeos gerados nas etapas anteriores, foram dessalinizadas colunas de OASIS HLB Cartridge (Waters). As colunas condicionadas com 2 mL de acetonitrila (ACN) 100% e equilibradas com 2 mL de TFA 0,1%. Após estas serem condicionadas e equilibradas, as amostras foram carregadas e uma alíquota

adicional de 2 mL de TFA 0,1% foi adicionada para remoção dos sais das amostras. Depois, esses peptídeos foram eluídos da coluna em 300  $\mu$ L de uma solução de 50% ACN e 0,1% TFA.

Após a dessalinização, os peptídeos foram liofilizados a vácuo e reconstituídos em fosfato monopotássico 5 mM (pH 3.0)/ 25% ACN (tampão de equilíbrio) para que pudesse ser realizada a próxima etapa.

As amostras foram levadas ao CDC (Centros de Controle e Prevenção de Doenças) para serem analisadas pelo espectrômetro de massas, em colaboração com o professor Henrique Bunselmeyer do laboratório CBiot - Centro de Biotecnologia da UFRGS. As proteínas foram identificadas por espectrometria de massas em tandem (MS/MS). A análise por espectrometria de massas foi feita em frações das colunas de SCX que foram reconstituídas em ácido fórmico (AF) 0,1% (Thermo Scientific, Rockford, IL) em água ultrapura. Depois disso, foram carregadas o sistema NanoLC PROXEON EASY-nLC II (Thermo Scientific), que fica acoplado no espectrofotômetro de massas LTQ Orbitrap Velos ETD (Thermo Scientific). Foram usados dois solventes, o primeiro sendo o ácido fórmico 0,1% em água ultrapura, e o segundo o ácido fórmico 0,1% em acetonitrila. O gradiente de 5% do segundo solvente por 25 minutos, que depois foi aumentado para 35% por 25 minutos, depois para 95% por 5 minutos, para depois retornar a 5% e serem reequilibrados por mais 20 minutos.

Os peptídeos então foram analisados pelo espectrômetro de massas a uma voltagem de 2.0 kV na coluna nano-LC, onde cada amostra foi analisada quatro vezes. O aparelho foi programado para aquisição dependente de dados por escaneamento da faixa de massas de relação massa/carga ( $m/z$ ) de 400 a 1.600 em uma resolução nominal configurada de 60.000 para aquisição do íon parental no Orbitrap. Para a análise de MS/MS, os 15 íons mais intensos com duas ou mais cargas foram isolados e fragmentados em uma segunda rodada de espectrometria de massas.

## **2.7 Análise *in silico* de dados de MS para identificação e quantificação relativa de proteínas**

Os dados brutos foram processados no software MSConvert para gerar os arquivos  $mgf$ 's que são necessários para a análise seguinte no Mascot Server onde foi feita a interpretação dos dados gerados por MS/MS.

A análise foi realizada contra o banco de dados local contendo as sequências de aminoácidos deduzidas para o genoma de *T. muris* (versão WS271) que nos permitiu identificar o repertório de proteínas detectadas em cada amostra. Os seguintes parâmetros foram utilizados para a identificação das proteínas: foi aceita 1 perda de clivagem pela tripsina; carbamidometilação da cisteína foi selecionada como modificação fixa e como modificação variável foi selecionada a oxidação da metionina; tolerância de 10 ppm para o íon precursor e 1 Da para os fragmentos de íons. A validação e quantificação das proteínas identificadas no Mascot Server, bem como o cálculo do fator normalizado de abundância de espectros (NSAF) foram realizados no software Scaffold (Proteome Software Inc., version 5). A identificação de um peptídeo e a identificação de uma proteína foi aceita se tivessem 95% ou 99% de probabilidade, respectivamente, conforme estabelecido pelos algoritmos Peptide Prophet e Protein Prophet e conter pelo menos 2 peptídeos detectados. As diferenças quantitativas entre as diferentes amostras foram analisadas por meio de um teste de análise de variância (ANOVA) com o método de Benjamini & Hochberg para correção dos falsos positivos (FDR).  $P < 0.05$ ,  $FDR < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos, esta análise foi executada no software Perseus (MaxQuant, version 1.6.15.0). A representação gráfica das proteínas diferencialmente detectadas foi feita através de um *heat map* também executado no programa R, a distribuição das proteínas foi feita por meio de um volcano plot que foi feito no software Scaffold (Proteome Software Inc., version 5).

A análise de enriquecimento funcional foi realizada na ferramenta também disponível no software Scaffold (Proteome Software Inc., version 5). Os arquivos relacionados aos dados de anotação dos produtos preditos no genoma de *T. muris* foram cedidos por WormBase ParaSite, enquanto os arquivos referentes a dados de ontologia foram recuperados do WormBase ParaSite também. O enriquecimento funcional foi realizado por um teste de distribuição hipergeométrica com o teste de Benjamini & Hochberg para correção dos falsos positivos (FDR).  $P < 0.05$ ,  $FDR < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os termos GO's enriquecidos foram sumarizados com a plataforma REVIGO por intermédio da similaridade semântica calculada através do SimRel (similaridade = 0.7), os resultados foram graficamente representados utilizando o ambiente R.

A predição *in silico* de secreção/excreção depende de peptídeo sinal para as proteínas detectadas foi realizada com as ferramentas SignalP 4.1 e Phobius. A predição para secreção/excreção independente de peptídeo sinal foi realizada na ferramenta SecretomeP 2.0. Por último, as proteínas para as quais não foram possíveis prever a forma de secreção/excreção

foram analisadas com a ferramenta WoLF PSORT, em busca de possíveis sinais de localização subcelular.

A análise de KEGG foi feita para analisar as principais vias metabólicas presentes em cada um dos grupos de PES (NTD e TD). A ontologia genética foi feita com informações derivadas da plataforma WormBase, para realizar a anotação funcional das proteínas presentes nos grupos PES NTD e PES TD.

As redes de interação proteína-proteína foram construídas com auxílio do programa StringDB, na qual fizemos *upload* das proteínas encontradas nos grupos NTD e PES TD no formato FASTA. A clusterização foi feita na nesta plataforma, por meio do cálculo de *k-means*. Em seguida, os dados que este banco de dados forneceu, levamos para o aplicativo Cytohubba, dentro da plataforma Cytoscape, na qual analisamos as redes com grau de importância, betweenness (indica proteínas que agem como intermediárias com outras) e bottleneck (indica pontos críticos na rede).

## 2.8 Caracterização das proteínas do PES

Após caracterização das proteínas dos PES isolados do *Trichuris muris*, usamos o banco de dados da plataforma Worm Base. A identificação e quantificação das proteínas encontradas no PES foi realizada e em seguida foi feita a anotação funcional para cada uma delas, na qual atribuímos e relacionamos a uma função, com a ajuda do BIOMART, também da plataforma Worm Base.

Para o estudo das proteínas identificadas entre os grupos tratado (TD) e não tratado (NTD) com a antibioticoterapia, elas foram organizadas em planilhas do Excel com as informações obtidas no BIOMART. As proteínas exclusivas de cada grupo foram separadas, em tabelas, e as em comum, foram colocadas em outra planilha. E em seguida, pesquisas sobre cada proteína exclusiva de cada grupo foram feitas, analisando artigos onde elas eram citadas, para entender a função de cada uma delas, além do uso da plataforma UniProt para entender melhor essas proteínas, onde colocamos os códigos de cada uma para obter esses dados.

## 2.9\_Dosagem de proteínas do produto de excreção e secreção do *Trichuris muris*

Uma alíquota do PES foi colocada em um eppendorf de 500 $\mu$ L para a dosagem de proteínas. Primeiramente foi preparado uma solução contendo 1,2 mL de tartarato de Na e K, 1,2 mL de sulfato de cobre e 21,6 mL de solução alcalina (20g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 100 mL NaOH). Posteriormente, 1 mL foi colocada em tubos de vidro e foram adicionadas diferentes quantidades de albumina para criar a curva padrão tendo tubo branco padrão (sendo o controle), e diferentes concentrações de proteína. Depois foi preparado o reagente de Folin (responsável por reagir com o sulfato de cobre e as proteínas presentes para formar um composto estável e com coloração), onde foi diluído 3x em água deionizada. Em seguida, foi feita a adição desta substância nos tubos de vidro, e deixamos 30 minutos reagindo. Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 300 $\mu$ L/poço de cada amostra em duplicatas. E por fim, a leitura foi realizada no espectrofotômetro de placa a 660nm.

## 2.10 Teste de sensibilidade bacteriana ao PES (Antibiograma)

Primeiramente, as bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram recuperadas do congelamento, e colocadas para crescer no meio LB por 24h à 37° C. Depois de crescerem, foi passado 1 ml do meio LB com as bactérias para um tubo (eppendorf) de 1,5 mL, em seguida centrifugado por 3 minutos a 14000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, deixando um *pellet* com as bactérias. O sedimento foi ressuspensionado em 1ml de PBS neste mesmo tubo.

Em outros três tubos de ensaio de vidro com 3ml de PBS cada, adicionamos, 50 $\mu$ l da suspensão das bactérias, sendo um para *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (gram +) e de *Escherichia coli* AB1157 (gram -). No terceiro tubo, mantivemos apenas PBS para usarmos como controle/branco. Estes três tubos foram usados no espectrofotômetro para que pudessemos medir a concentração de bactérias por absorvância (0,14 e 0,15 nm em um filtro de 680nm). À medida que a leitura era realizada, a concentração foi ajustada adicionando mais conteúdo das bactérias ou do PBS até chegar na concentração indicada pelo CLSI e EUCAST.

Depois, coletamos 100 $\mu$ l de cada tubo, semeamos por todo o meio Muller-Hinton em duas placas de Petri com ajuda de swabs, uma para *S. aureus* e a outra para *E. coli*. Adicionamos os discos de papel filtro onde adicionamos, em duplicata, 40 $\mu$ l de PBS (controle negativo),

antibiótico Gentamicina 10mg/ml (controle positivo) e do PES (concentração por volta de 1µg/µL). As placas de Petri foram mantidas em estufa à 37° C e analisadas após 24h. Depois disso, os tamanhos dos halos presentes foram medidos.

### 2.11\_Co-cultivo células T-84 e bactérias em contato com PES

O PES foi adicionado em diferentes concentrações (5, 10, 50 µg/ml) em meio DMEM contendo o soro fetal bovino à 2% e manose 1 %. Para efetuar o enriquecimento das bactérias (*Escherichia coli* das cepas 042 e DH5α, e *Salmonella c20*), foram cultivadas em meio líquido LB, depois de recuperar do congelamento, por 24 horas em estufa 37°C. Para cada espécie de bactéria, 1mL de meio LB foi transferido para um microtubo, centrifugado por 5 minutos à 2500 rpm. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento contendo as bactérias foi resuspendido em 100µL de PBS estéril e transferidos para dois tubos de vidro (15 mL), adicionando 3 ml de PBS em cada.

O equivalente a 50µl da suspensão de bactérias (um tubo por bactéria) foi usado para aferir a concentração. No tubo com PBS usamos como controle/branco. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro (WPA colourwave CO7500 colorimeter) para medir as concentrações (0,14 a 0,15 nm) usando filtro de 680nm. Ao chegar na concentração indicada para experimento.

As células T84 (proveniente de carcinoma de cólon humano) e Caco-2 (provenientes de adenocarcinoma humano), mantidas em cultura foram lavadas duas lavagens com PBS estéril, e e foram adicionadas a meio DMEM contendo PES em diferentes concentrações em duplicata (em placas de 24 poços contendo 1ml em cada. As culturas foram mantidas por 3 horas na temperatura de 37°C. Depois o meio foi removido com ajuda da pipeta e as amostras foram submetidas ao processamento para, as metodologias para as microscopias de luz e eletrônica de varredura.

## 2.12 Processamento para Microscopia de Luz

Foi retirado o meio em que as células T84 e Caco-2 se encontravam, fizemos a lavagem com PBS estéril duas vezes e depois, cuidadosamente, retiramos as lamínulas da placa de 24 poços, e fizemos o processamento e coramos com o panótipo, e deixamos para secar em temperatura ambiente. No dia seguinte, fizemos a selagem das lâminas e por fim analisamos no microscópio.

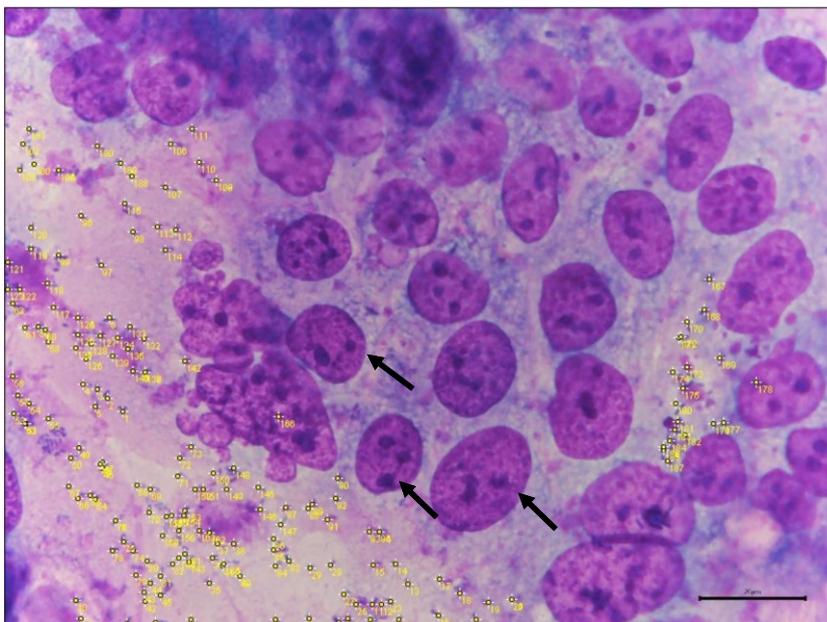
## 2.13 Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura

Para o processamento de MEV, as lamínulas, contendo a monocamada de células, foram recuperadas das placas de 24 poços e foram fixadas em Karnovsky (1 x 10 mL de Glutaraldeído 50%/ 2 x 10 mL de Formaldeído 16%/ 1 x 50 mL de Tampão Fosfato 0,2M) por um período mínimo de 24 horas. Após fixadas, as lamínulas passaram pela pós-fixação com tetróxido de ósmio por 40 minutos, lavadas três vezes com água destilada e em seguida foram desidratadas em uma série de etanóis (15 minutos cada), terminando no etanol absoluto. Em seguida passaram pelo ponto crítico, foram montadas em suportes metálicos e por fim, metalizadas em ouro, e assim analisamos no Microscópio Eletrônico de Varredura, Thermo Fisher Quattro S.

## 2.14 Contagem de bactérias

Imagens capturadas com o sistema digital Olympus SC100, acoplado ao microscópio Olympus BX-53 foram analisadas em 5 áreas totais aleatórias de 2 lâminas de cada grupo, as imagens foram padronizadas usando a objetiva de 100x e escala de 20 $\mu$ m. Para a contagem de bactérias utilizamos o programa ImageJ, onde fizemos o upload de cada imagem e utilizamos o contador do programa; onde se encontravam bactérias, marcações e a contagens foram feitas manualmente. Depois, colocamos todos esses dados em planilhas no Excel para o cálculo das médias. Abaixo, na figura 10, se encontra um exemplo de como foi feita a contagem.

Figura 10 - Imagem de Microscopia de luz mostrando a monocamada de T84 com bactérias *E. coli* 042 contadas através do programa ImageJ



Legenda: Imagem demonstrativa da contagem de bactérias (amarelo) no co-cultivo e as setas pretas indicam algumas células T84 – aumento de 100x.

### 2.15 Análises estatísticas

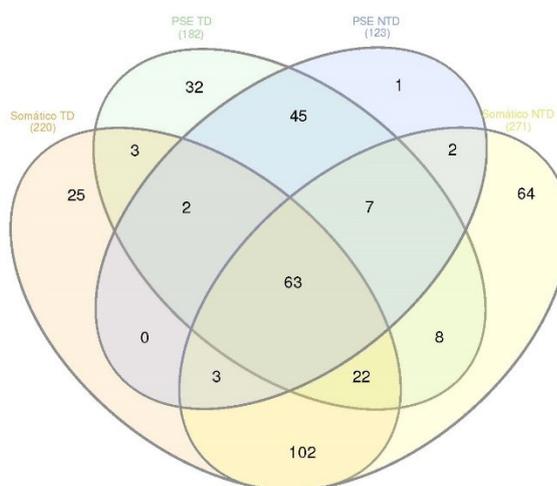
Foram utilizados o teste de U (Mann Whitney) para comparar os grupos PES NTD e PES TD de modo geral para a proteômica. E o teste T para comparar cada proteína encontrada em ambos os grupos (PES NTD e PES TD) quando o teste de normalidade deu positivo, e quando negativo fizemos o teste Wilcoxon. Para a contagem de bactérias fizemos o teste ANOVA para analisar se existia diferença entre as condições (controle, PES 05, 10 e 50  $\mu\text{g/ml}$ ), e depois o pos-hoc/teste de Tukey para comparar os grupos em pares.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Identificação, quantificação relativa e análise de proteínas do produto de excreção e secreção de *Trichuris muris*

Para explorar os dados da análise proteômica em nossos resultados estes foram organizados em quatro grupos distintos de acordo com a origem da amostra, sendo de produtos de excreção-secreção (PES) e material somático (SOM), provenientes de animais tratados com antibióticos (TD) ou não (NTD). Estes grupos foram identificados da seguinte forma: (i) Produto de ES proveniente de animais não tratados (PES NTD), (ii) produto de ES provenientes de animais tratados (PES TD), (iii) conteúdo somático de nematoides não tratado (SOM NTD) e (iv) conteúdo somático de nematoides tratados (SOM TD). As proteínas identificadas nos grupos de conteúdo somático foram utilizadas como controle para comparação das proteínas descritas no produto de ES. No total, foram identificadas 371 proteínas entre todos os grupos analisados, sendo que 188 dessas proteínas estavam presentes no produto de ES (PES) e 301 proteínas encontradas no grupo do conteúdo somático (SOM) (Gráfico 1). Esses dados fornecem uma base robusta para a análise comparativa das proteínas secretadas em resposta aos tratamentos.

Gráfico 1 - Diagrama de Venn mostrando as proteínas encontradas em cada grupo, incluindo produtos de excreção-secreção e somático



Legenda: Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas nos grupos dos produtos de excreção e secreção (PES) e conteúdo somático (SOM) de *Trichuris muris* isolados de camundongos tratados ou não com antibióticos. O grupo PES de camundongos tratados (PES TD) está em verde, o grupo PES de

camundongos não tratados (PES NTD) em azul, o conteúdo somático dos grupos tratados (SOM TD) em laranja, e o conteúdo somático dos camundongos não tratados (SOM NTD) em amarelo.

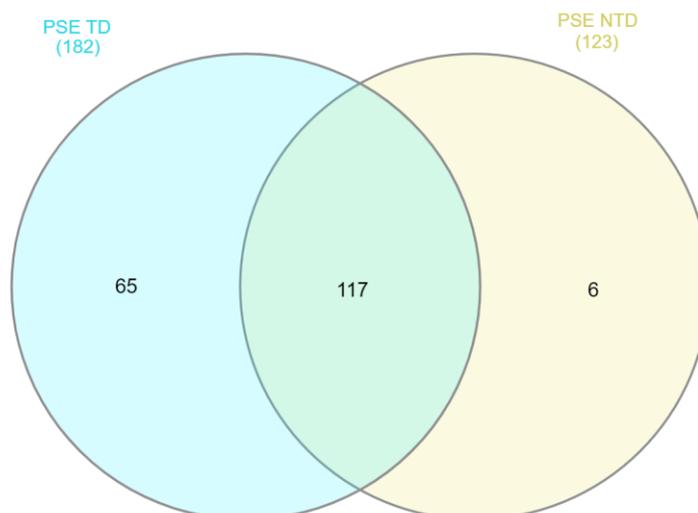
Com base no diagrama de Venn (Gráfico 1), podemos destacar a distribuição das proteínas presentes nos PES e no SOM dos parasitos recuperados de camundongos tratados e não tratados com antibiótico. Ao comparar os grupos tratados e não tratados, observa-se uma variação no quantitativo de proteínas exclusivas e compartilhadas, evidenciando as diferenças na expressão proteica em resposta ao tratamento. Nos PES, foram 32 proteínas com maior abundância experimental nos parasitos dos camundongos tratados (PES TD) e apenas 1 proteína com maior abundância experimental nos parasitos não tratados (PES NTD). Já no conteúdo somático, no grupo tratado SOM TD foram identificadas 25 proteínas com maior abundância, enquanto no SOM NTD foram identificadas 64 proteínas.

Entre os grupos PES TD e PES NTD, foram encontradas 45 proteínas em comum, enquanto entre SOM TD e SOM NTD são compartilhadas 102 proteínas. Em comparações cruzadas, 3 proteínas foram comuns entre PES TD e SOM TD, e apenas 2 proteínas foram comuns entre PES NTD e SOM NTD. Além disso, entre PES TD e SOM NTD foram encontradas 8 proteínas em comum, enquanto não houve proteínas compartilhadas entre PES NTD e SOM NTD.

Nas intersecções múltiplas, 2 proteínas foram comuns entre PES TD, PES NTD e SOM TD, enquanto 7 proteínas foram compartilhadas entre PES TD, PES NTD e SOM NTD. Entre os grupos PES NTD, SOM TD e SOM NTD foram encontradas 3 proteínas, enquanto 22 proteínas foram compartilhadas entre PES TD, SOM TD e SOM NTD. Por fim, 63 proteínas foram encontradas integrando todos os quatro grupos analisados. Esses resultados indicam que o tratamento com antibiótico influenciou na abundância experimental proteica dos parasitos, promovendo alterações nas proteínas exclusivas e compartilhadas entre os grupos.

Na distribuição das proteínas identificadas nos PES dos parasitos provenientes de camundongos tratados com antibiótico (PES TD) e não tratados (PES NTD), podemos destacar a identificação de 65 proteínas com abundância experimental do grupo tratado, enquanto no PES NTD, foram identificadas apenas 6 proteínas com abundância, indicando uma alteração fisiológica do tratamento nos nematoides. Por fim, foram identificadas 117 proteínas com abundância comum entre os grupos, o que pode indicar proteínas essenciais ou estruturais que são conservadas independentemente do tratamento (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Diagrama de Venn mostrando as proteínas encontradas nos grupos tratados (TD) e não tratados (NTD) de PES

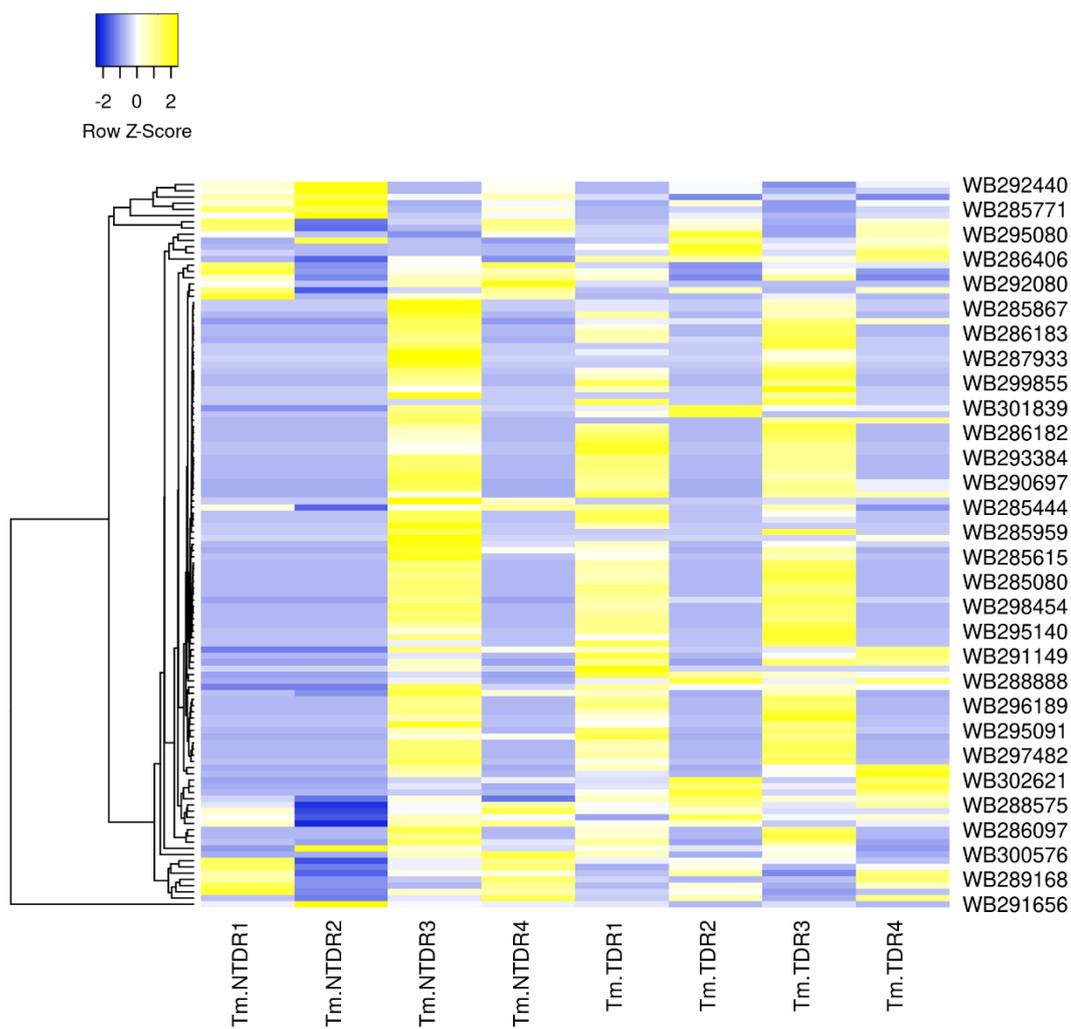


Legenda: Diagrama de Venn mostrando a distribuição de proteínas identificadas nos produtos de excreção e secreção (PES) de parasitos dos camundongos tratados (PES TD) à esquerda, em azul e não tratados com antibiótico (PES NTD) à direita, em amarelo. No centro as proteínas compartilhadas são representadas pela intersecção em verde.

As proteínas exclusivas do grupo PES NTD incluem Galectina, Fibrinogen C-terminal domain-containing protein, Phospholipase A (2), Glucose-6-phosphate isomerase, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase e Gamma-cystathionase. Por sua vez, no grupo PES TD, algumas das proteínas específicas incluem FAD\_binding\_2 domain-containing protein, FABP domain-containing protein e Elongation factor 1-alpha, reforçando as diferenças entre os grupos tratados e não tratados.

Para melhor análise das proteínas comuns entre os grupos PES NTD e PES TD, fizemos um *heatmap* para auxiliar na visualização das proteínas presentes em cada grupo que possuem maior ou menor expressão em cada condição experimental do tratamento com o antibiótico

Gráfico 3 - Heatmap mostrando a comparação de abundância experimental proteica entre os grupos tratados (TD) e não tratados (NTD)



Legenda: Trecho do Heatmap (mapa de calor) das proteínas compartilhadas entre os grupos PES NTD e PES TD. Cada coluna representa uma das diferentes réplicas biológicas dos diferentes grupos, onde Tm.NTDR1-4 são do PES NTD e Tm.TDR1-4 são do grupo PES TD. Cada linha representa uma proteína diferente entre as amostras, com os seus diferentes níveis de abundância experimental, onde o amarelo representa as proteínas com maior nível de abundância e as em azul com menor nível de abundância.

Após análise detalhada do *heatmap* (gráfico 3), observamos que algumas proteínas se destacam nos grupos dos produtos de excreção e/ou secreção dos parasitos recuperados de camundongos tratados (PES TD) e não tratados (PES NTD). As proteínas com o domínio WAP foram identificadas em ambos os grupos. No entanto, essas proteínas estão em maior concentração no grupo PES TD. Esse padrão sugere que o tratamento com antibiótico no

hospedeiro pode induzir uma resposta adaptativa nos parasitos, resultando em maior abundância experimental dessas proteínas.

Além das proteínas com domínio WAP, proteínas com domínio SCP também foram encontradas em ambos os grupos, com maior concentração no PES TD. Das 117 proteínas comuns entre PES TD e PES NTD, a maioria (79 proteínas) está mais abundante no grupo PES TD, enquanto 38 proteínas apresentam maior abundância no PES NTD.

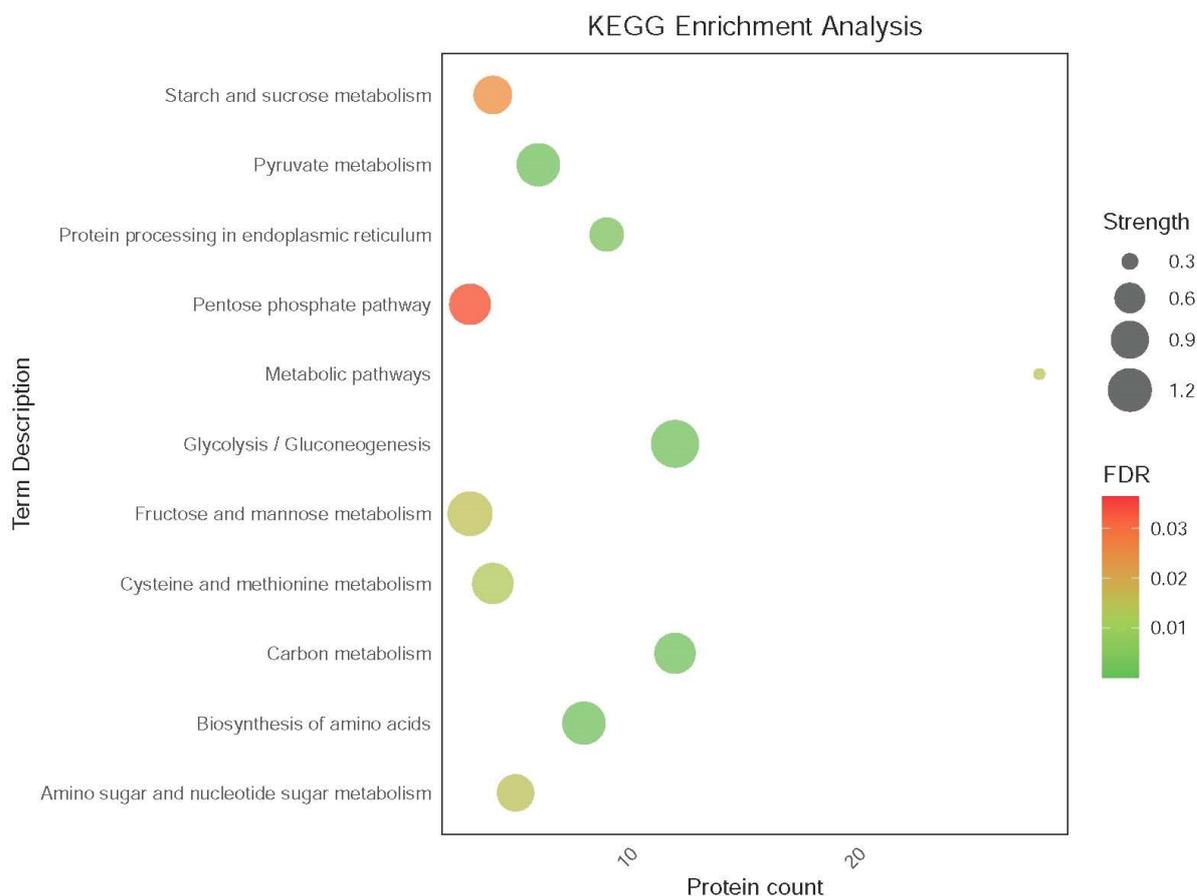
Comparando as abundâncias das proteínas comuns nos dois grupos, os resultados indicam que o tratamento com antibiótico interfere significativamente na abundância relativa proteica dos parasitos ( $p < 0,001$ ). Esse efeito é ainda mais evidente ao observarmos a distribuição geral das abundâncias: no grupo PES TD, uma proporção maior das proteínas comuns apresenta abundâncias elevadas, o que sugere uma possível resposta adaptativa para enfrentar as condições impostas pelo tratamento no hospedeiro.

Em análises estatísticas mais detalhadas de cada proteína individualmente nos grupos PES, apenas uma proteína (Peptidase S1 domain-containing protein) apresentou diferença significativa entre os grupos. No entanto, em testes de comprovação, essa significância não foi mantida, indicando que, embora a tendência geral seja de maior abundância no grupo tratado, não houve diferença estatística ao avaliar proteínas específicas individualmente.

Para aprofundar a compreensão das funções biológicas e vias de sinalização associadas a essas proteínas, utilizamos a análise de enriquecimento de vias metabólicas do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Os resultados mostraram que, no grupo PES NTD, as principais vias e funções expressas incluem o metabolismo de amido e sacarose, metabolismo do piruvato, processamento de proteínas no retículo endoplasmático, via da pentose fosfato, glicólise/gliconeogênese, metabolismo da manose e frutose, metabolismo de metionina e cisteína, metabolismo do carbono, biossíntese de aminoácidos e metabolismo de açúcares de amino e nucleotídeos (Gráfico 4).

Com o uso da análise de enriquecimento das vias KEGG, focamos na identificação e mapeamento das funções biológicas das proteínas, tomando como base associações com vias de sinalização e processos metabólicos. Avaliamos como o tratamento do hospedeiro com antibióticos pode ter influenciado nas respostas moleculares e de vias bioquímicas do *T. muris*. Avaliamos a expressão de proteínas com processos metabólicos específicos, como o metabolismo de carboidratos, síntese de aminoácidos e outras funções celulares essenciais, com o objetivo de verificar possíveis interferências de mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento do parasitismo.

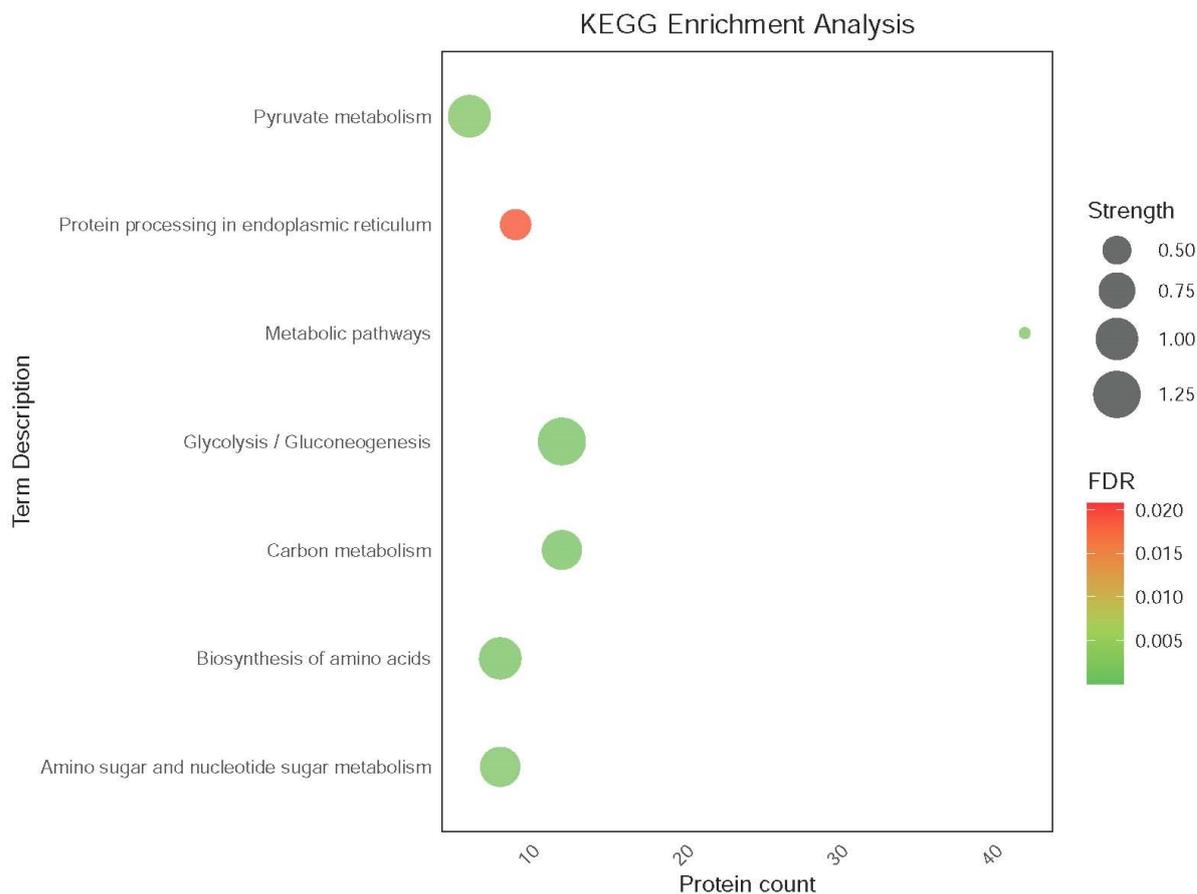
Gráfico 4 - Gráfico mostrando enriquecimento de vias metabólicas KEGG das proteínas identificadas no grupo não tratado (NTD) de PES



Legenda: As proteínas identificadas no grupo controle foram mapeadas para as vias metabólicas do KEGG. O tamanho dos pontos representa a "força" de associação para cada via enriquecida, enquanto a cor indica o valor de FDR (False Discovery Rate). Vias com  $FDR < 0,05$  foram consideradas significativamente enriquecidas.

No grupo PES TD, destacamos proteínas associados ao metabolismo do piruvato, processamento de proteínas no retículo endoplasmático, glicólise/gliconeogênese, metabolismo do carbono, biossíntese de aminoácidos e metabolismo de açúcares de amino e nucleotídeos (Gráfico 5). Essas vias indicam uma adaptação específica dos parasitos ao ambiente alterado pela ausência da microbiota induzida pelo tratamento com antibiótico. Essas diferenças indicam que o tratamento antibiótico no hospedeiro impacta as funções metabólicas e as respostas adaptativas dos parasitos, demonstrando uma modulação na abundância experimental proteica relacionada ao ambiente microbiano e à resposta do parasito.

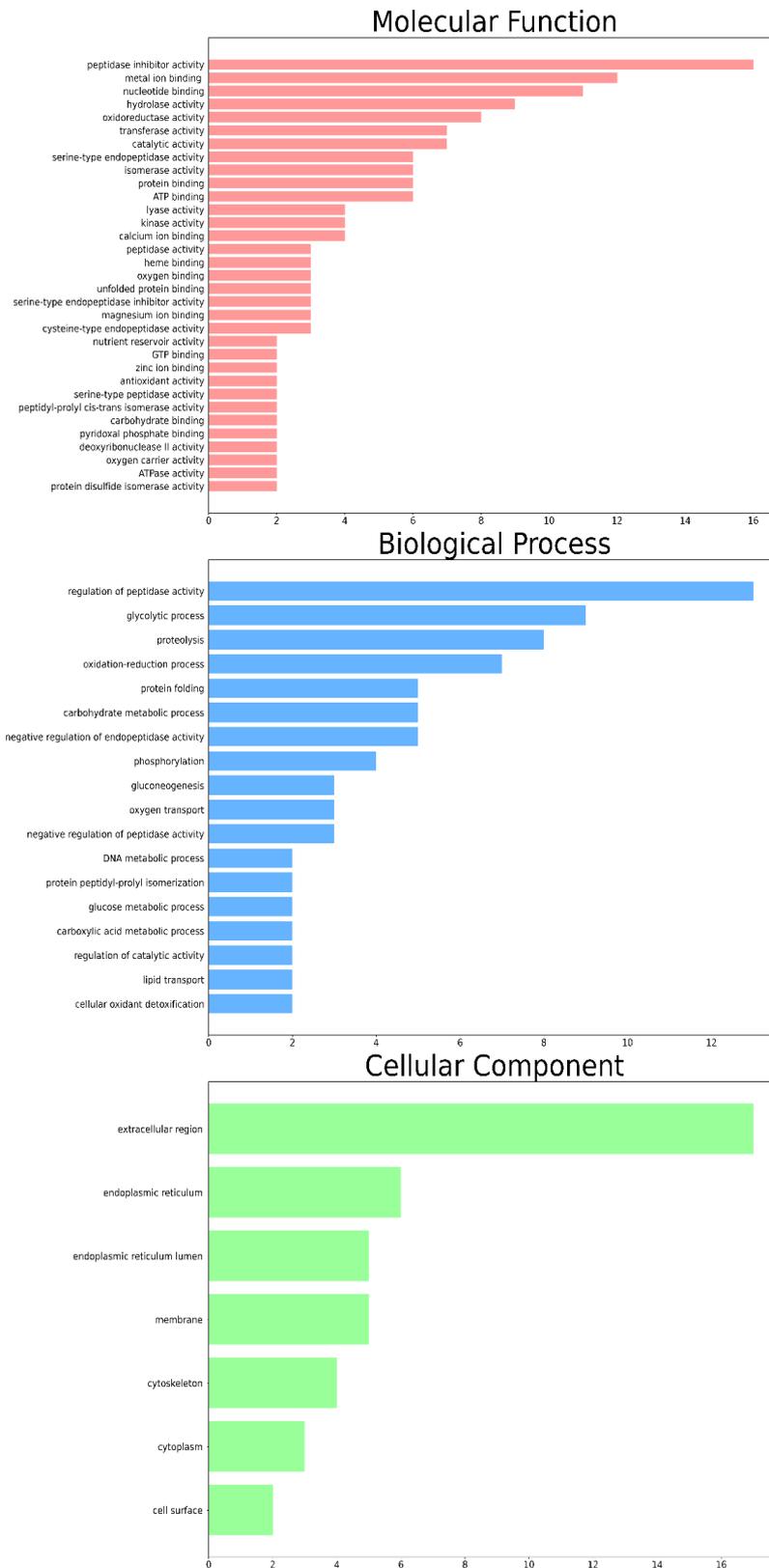
Gráfico 5 - Gráfico mostrando a análise de KEGG das proteínas encontradas no grupo tratado (TD) de PES



Legenda: Gráfico mostrando a análise de enriquecimento KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) das proteínas do grupo PSE TD. Sendo as cores mais perto do vermelho, as que têm uma concentração de proteínas mais alta, e as próximas do verde mais baixas.

Para aprofundar a compreensão das funções das proteínas em cada grupo, realizamos uma análise de ontologia genética (Gene Ontology, GO) com foco nos três domínios principais: função molecular, processo biológico e componentes celulares. Utilizando a plataforma WormBase Parasite Biomart (<https://parasite.wormbase.org/index.html>), carregamos as sequências FASTA de cada proteína para obter dados específicos de GO para cada grupo experimental. A visualização em gráficos mostrou as categorias representadas em cada domínio, excluindo aquelas que apareceram apenas uma vez para facilitar a interpretação visual. Essas diferenças entre os grupos, evidenciadas tanto pela análise KEGG quanto pela GO, sugerem que o tratamento do hospedeiro com antibióticos induz alterações substanciais na abundância experimental proteica e nas respostas biológicas dos helmintos, modulando processos críticos de sobrevivência e adaptação em um ambiente alterado.

Gráfico 6 - Gráfico mostrando a ontologia genética das proteínas encontradas no grupo não tratado (NTD) de PES

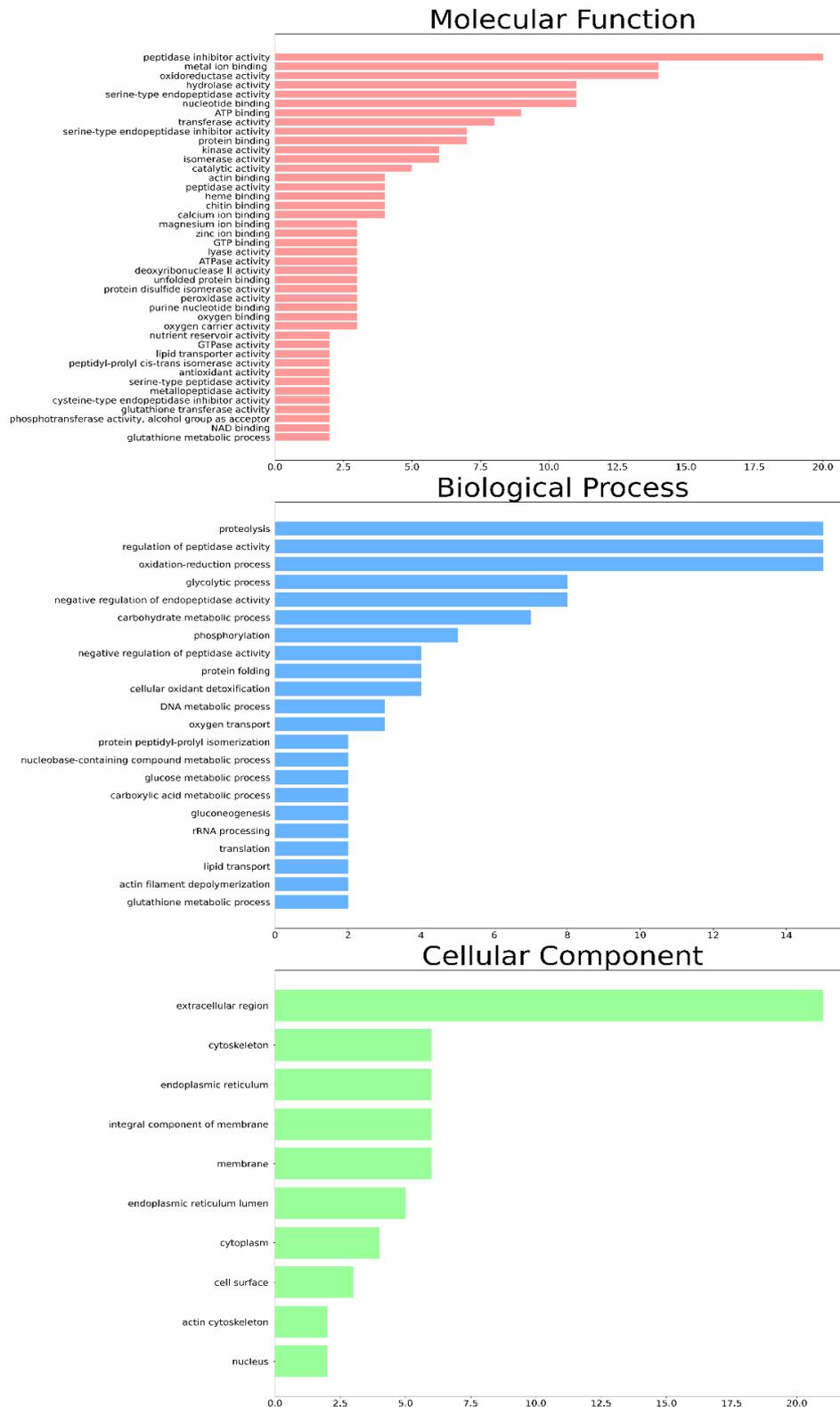


Legenda: Gráfico de ontologia genética das proteínas identificadas no grupo PES NTD. Onde se encontram três categorias: Molecular function (funções moleculares) em vermelho. Biological process (processos

biológicos) em azul. Cellular componente (componentes celulares) em verde. Onde cada uma das barras representa uma função de proteína diferente.

As proteínas identificadas no grupo PES NTD foram agrupadas em 138 categorias nos diferentes domínios. Na categoria de função molecular, podemos citar 16 proteínas com atividade inibidora de peptidase, 12 associadas à ligação com íons metálicos, 11 com ligação a nucleotídeos, oito associadas à atividade de hidrolase, e com atividade de oxirredutase e transferase, foram sete proteínas descritas para cada função (Gráfico 6). Este grupo foi seguido pela categoria de proteínas associadas à processos biológicos, incluindo 13 de regulação da atividade peptidase, nove em processo de glicólise, oito de proteólise, sete à processos de oxidorredução, finalizando com cinco proteínas associadas a cada um deste processo: atividades de ligação entre proteínas, processo metabólico de carboidratos e regulação negativa da atividade de endopeptidase (Gráfico 6). Por fim, a categoria de componentes celulares apresentou o menor número de proteínas, tendo nessa categoria, 16 provenientes de região extracelular, seis ao retículo endoplasmático, cinco ao lúmen do retículo endoplasmático, cinco à membrana plasmática e quatro ao citoesqueleto (Gráfico 6).

Gráfico 7 - Gráfico mostrando a ontologia genética das proteínas encontradas no grupo tratado (TD) de PES

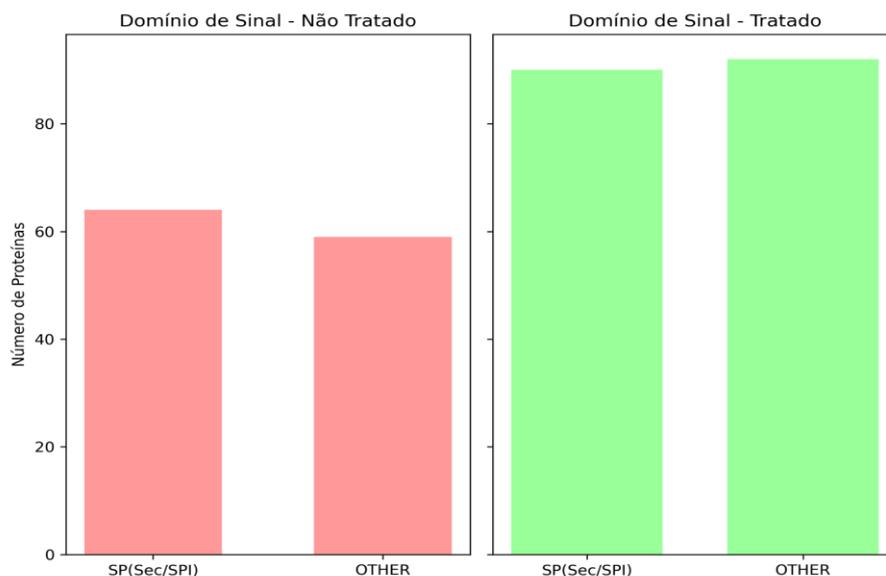


Legenda: Gráfico de ontologia genética do grupo PES TD. Onde se encontram três categorias: Molecular function (funções moleculares) em vermelho. Biological process (processos biológicos) em azul. Cellular component (componentes celulares) em verde. Onde cada uma das barras representa uma função de proteína diferente.

Relacionado à Ontologia Genética do grupo PES TD, foram agrupadas em 287 categorias, com as mais prevalentes em atividade de inibidor de peptidase, com 20 proteínas, seguida por 14 associadas à ligação de íons metálicos, 14 à atividade oxirredutase e, em 11 para cada, ligadas à atividade hidrolase, atividade endopeptidase tipo serina e ligação a nucleotídeos. Em relação ao domínio processo biológico, destaca-se 14 para cada uma dessas atividades de proteólise, regulação da proteólise e regulação da atividade de peptidase. Foram oito em processo glicolítico e outras oito na regulação negativa da atividade endopeptidase. Os componentes celulares foram associados à 20 proteínas de região extracelular, cinco ao citoesqueleto, outras cinco para cada: retículo endoplasmático, componente integral de membrana e membrana plasmática (Gráfico 7).

Ao comparar PES NTD e PES TD, identificamos que nos dois grupos, na categoria de funções moleculares, ambos têm a atividade de inibidor de peptidase como a função mais representativa. Porém o grupo PES TD apresenta um número mais expressivo, com 20 proteínas no total e 16 no PES NTD. Nos processos biológicos, houve uma diferença nas funções proteicas mais representadas : no grupo PES NTD, a função mais representativa foi a de regulação da atividade de peptidase com 13 proteínas, enquanto no PES TD foi a de proteólise com 14 proteínas. Já na categoria de componentes celulares, a função mais representada foi a região extracelular em ambos os grupos, com 16 proteínas no PES NTD e 20 proteínas no PES TD. Dessa forma, o grupo PES TD parece apresentar uma atividade de proteólise mais expressiva do que o PES NTD, o que pode ter implicações no parasitismo.

Gráfico 8 - Gráfico mostrando a presença de peptídeo sinal das proteínas encontradas nos grupos não tratado (NTD) e tratado (TD) de PES



Legenda: Gráfico que mostra o número de proteínas com e sem peptídeo sinal. Em vermelho referente ao grupo PES NTD e em verde referente ao grupo PES TD.

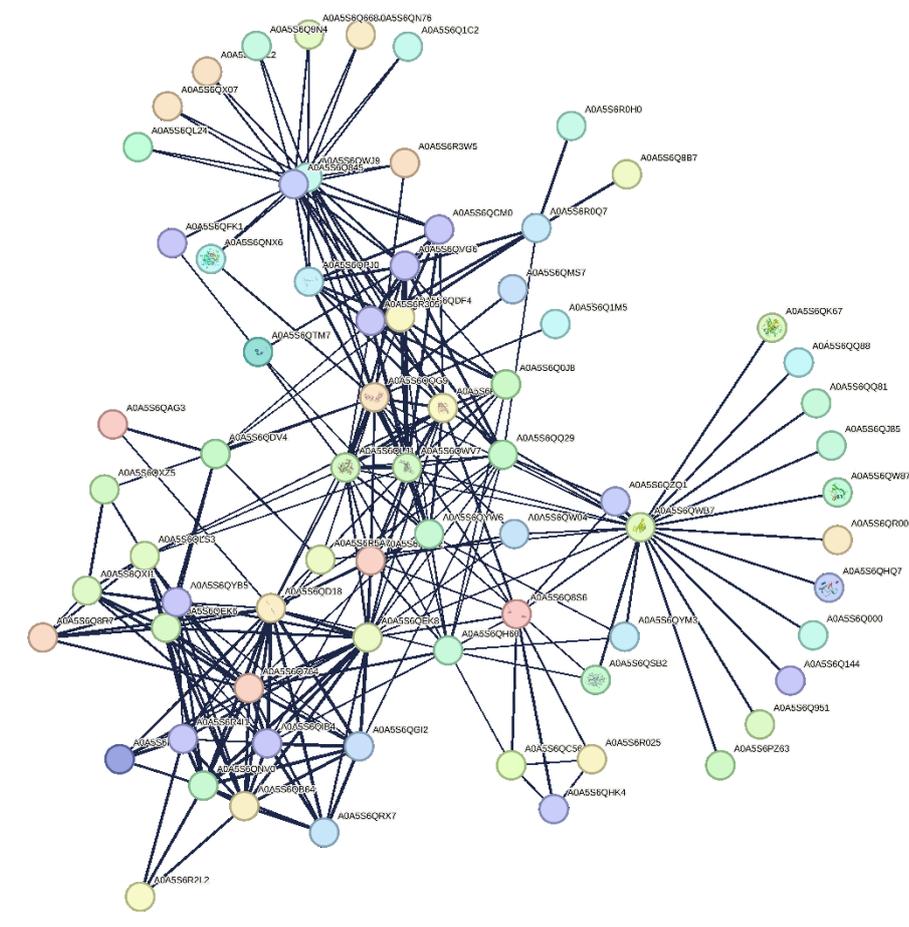
Além disso, realizamos análises da presença de peptídeo sinal nas proteínas de ambos os grupos. Essa análise permite uma compreensão mais detalhada do comportamento das proteínas para indicar diferenças nos mecanismos de secreção e função celular entre os grupos PES NTD e PES TD (Gráfico 8). Em nossos resultados, quando avaliamos o grupo PES NTD, das 123 proteínas analisadas, 64 apresentaram peptídeo sinal e 59 não apresentavam. Já no grupo PES TD, das 182 proteínas analisadas, 90 apresentaram peptídeos de sinal e 92 não apresentavam. Em percentual, isso indica que 52 % das proteínas do grupo NTD apresentaram peptídeo sinal, e no grupo TD 49,5% apresentavam peptídeo sinal. Para que uma proteína fosse designada como possuidora de um peptídeo de sinal, era necessário que ambas as plataformas (SignalP e Phobius) concordassem no resultado; caso contrário, a presença do peptídeo sinal não era considerada.

Essa análise pode nos ajudar a compreender a presença de vesículas extracelulares nesses produtos, uma vez que os peptídeos de sinal podem se relacionar com a secreção das proteínas por essa via. Algumas das proteínas, com peptídeos sinal, encontradas em nossos experimentos já foram identificadas em vesículas extracelulares previamente em outros estudos. Algumas dessas proteínas foram: 14\_3\_3 domain-containing protein, SCP domain-containing protein, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Heat shock 70, Aminopeptidase, Rab GDP dissociation inhibitor e Vitellogenin domain-containing protein.

A base de dados STRING foi usada para entendermos como as proteínas de cada grupo são diferentemente organizadas na forma de uma rede de interação proteína-proteína. Neste estudo, utilizamos tanto as proteínas exclusivas de cada grupo de PES quanto aquelas compartilhadas com os grupos somáticos. A inclusão das proteínas presentes em ambos os conjuntos, em vez de considerar apenas as exclusivas do PES, foi essencial para uma análise mais abrangente, uma vez que essas proteínas também foram identificadas nos grupos de PES e podem desempenhar um papel relevante no contexto estudado.

Cada proteína é representada por um círculo (Gráfico 9), onde cada uma delas tem o código para ser encontrada no banco de dados. As proteínas são ligadas umas às outras por linhas, que representam as relações entre cada uma delas, mostrando diferentes padrões de interação. Primeiramente, fizemos a análise do grupo PES NTD, onde existem algumas proteínas que fazem mais ligações do que outras.

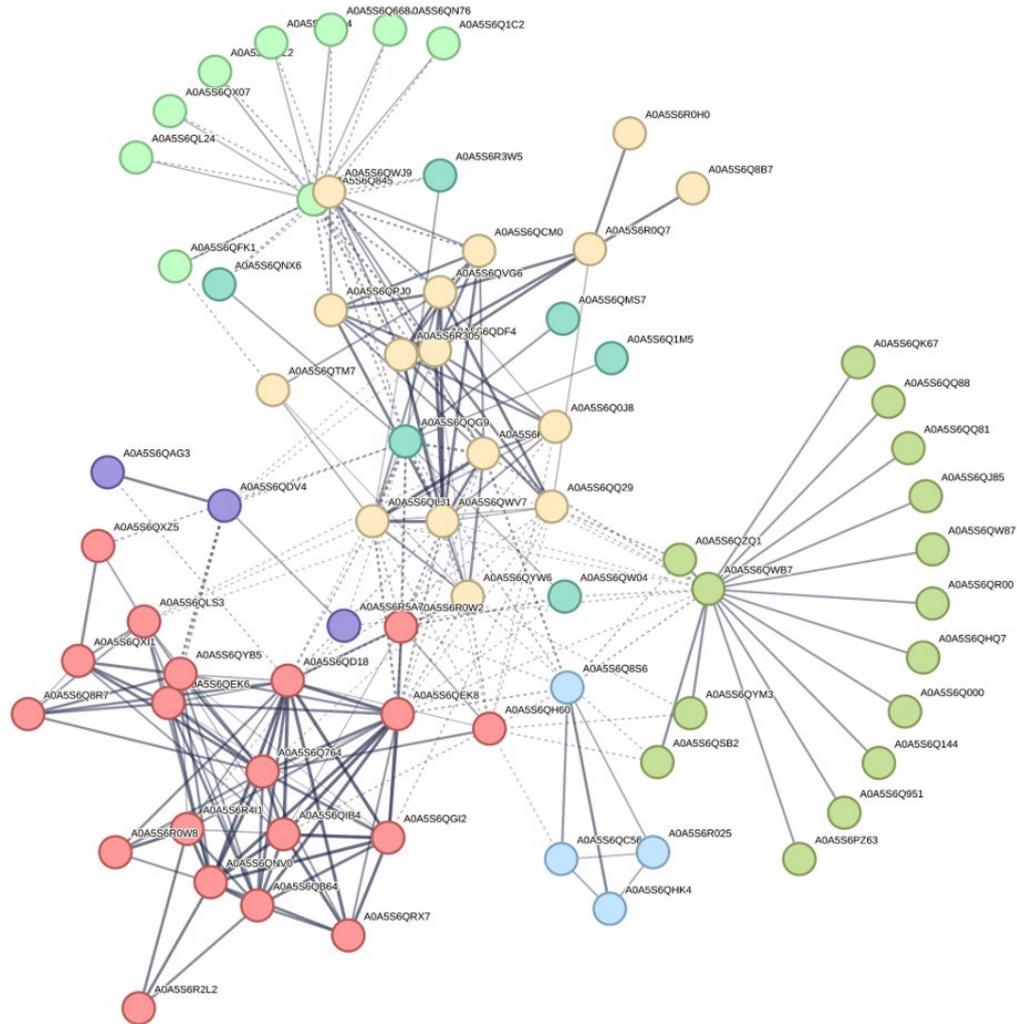
Gráfico 9 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína no grupo PES NTD



Legenda: Análise de rede da interação proteína-proteína do grupo PSE NTD. Cada proteína é representada por um círculo. As proteínas são ligadas umas às outras por linhas, que representam as relações entre cada uma delas, mostrando diferentes padrões de abundância experimental.



Gráfico 11 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína com clusters no grupo PES NTD

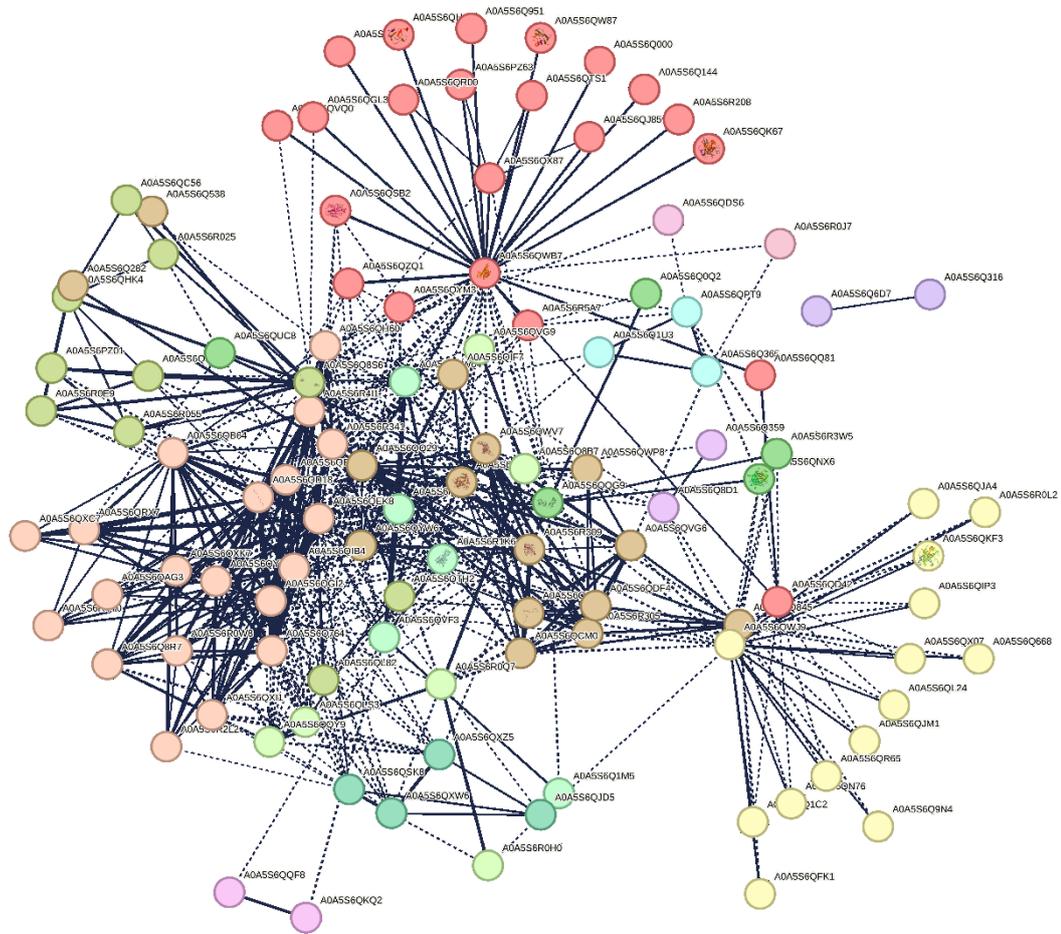


color	cluster Id	gene count	description
●	Cluster 1	19	+ Pyruvate metabolism
●	Cluster 2	16	+ Protein folding
●	Cluster 3	15	A0A5S6PZ63, A0A5S6Q000, A0A5S6Q144, A0A5S6Q951, A0A5S6QHQ7, A0A5S6Q...
●	Cluster 4	9	+ LDL clearance
●	Cluster 5	6	A0A5S6Q1M5, A0A5S6QMS7, A0A5S6QNX6, A0A5S6QQG9, A0A5S6QW04, A0A5S6...
●	Cluster 6	4	A0A5S6Q8S6, A0A5S6QC56, A0A5S6QHK4, A0A5S6R025
●	Cluster 7	3	+ Cysteine and methionine metabolism

Legenda: Rede mostrando clusters, cada um representa uma função ou via diferente do grupo PES NTD. As proteínas são representadas por círculos, sendo ligadas umas às outras por linhas, que representam as relações entre cada uma delas, mostrando diferentes padrões de abundância experimental. Cada cor representa um cluster diferente na rede.

Na rede de PES NTD (Gráfico 11), conseguimos demonstrar clusters indicando proteínas envolvidas nos processos de metabolismo de piruvato, dobramento de proteínas, eliminação de LDL e metabolismo de cisteína e metionina; além de outros que não conseguimos identificar em uma categoria, mas percebe-se que se relacionam de alguma forma.

Gráfico 12 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína com clusters no grupo PES TD



color	cluster id	gene count	description
●	Cluster 1	22	Mixed, incl. Cytoskeleton, and Ankyrin repeat
●	Cluster 2	20	+ Nucleoside diphosphate phosphorylation
●	Cluster 3	15	+ Protein folding
●	Cluster 4	14	+ Serine-type endopeptidase activity
●	Cluster 5	10	+ Regulation of actin polymerization or depolymerization
●	Cluster 6	6	+ Nicotinate and nicotinamide metabolism
●	Cluster 7	5	A0A5S6Q0Q2, A0A5S6QNX6, A0A5S6QQG9, A0A5S6QUC8, A0A5S6R3W5
●	Cluster 8	5	+ Eukaryotic Translation Elongation
●	Cluster 9	4	Fatty acid elongation
●	Cluster 10	3	Peptidase C1A, and Peptidase family A1 domain
●	Cluster 11	2	A0A5S6Q316, A0A5S6Q6D7
●	Cluster 12	2	Aldo-keto reductase, and Fatty acid binding
●	Cluster 13	2	A0A5S6QKQ2, A0A5S6QQF8
●	Cluster 14	1	A0A5S6QDS6
●	Cluster 15	1	A0A5S6R0J7

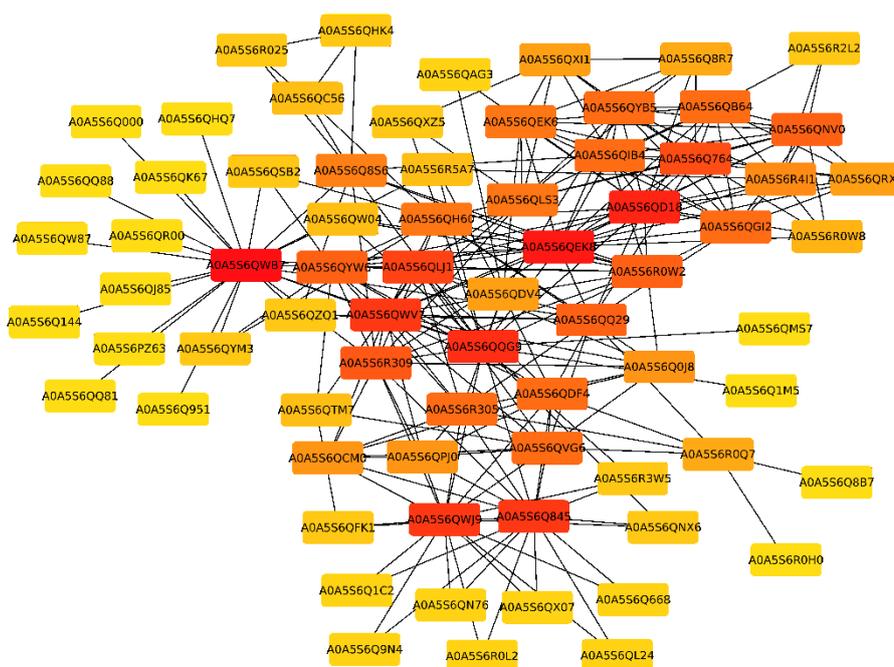
Legenda: Rede mostrando clusters, cada um representa uma função ou via diferente do grupo PES TD. As proteínas são representadas por círculos, sendo ligadas umas às outras por linhas, cada cor representa um cluster diferente na rede.

Já os clusters de PES TD (Gráfico 12), mostram grupos de proteínas relacionadas com fosforilação de nucleosídeo difosfato, dobramento de proteínas, atividades de endopeptidase do tipo serina, regularização de polimerização/despolimerização da actina, metabolismo de nicotinato e nicotinamida, alongamento de tradução, alongamento de ácidos graxos, peptidase C1A e da família com domínio A1, aldo-ceto redutase e ligação de ácidos graxos, além daqueles que não puderam ser identificados, mas que aparentemente apresentam alguma relação.

Podemos observar que além de PES TD ter uma rede maior, mais complexa e com mais proteínas, conseguimos separar ela em mais clusters do que a rede de PES NTD. Isso mostra a maior complexidade da resposta do helminto quando o hospedeiro foi tratado com antibiótico.

Em seguida, analisamos como e quais dessas proteínas tinham maior grau de importância dentro da rede de interação proteína-proteína. Sendo assim, usamos o programa Cytohubba, dentro da plataforma Cytoscape, para calcular as proteínas mais influentes dentro dessas redes.

Gráfico 13 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de importância delas no grupo PES NTD

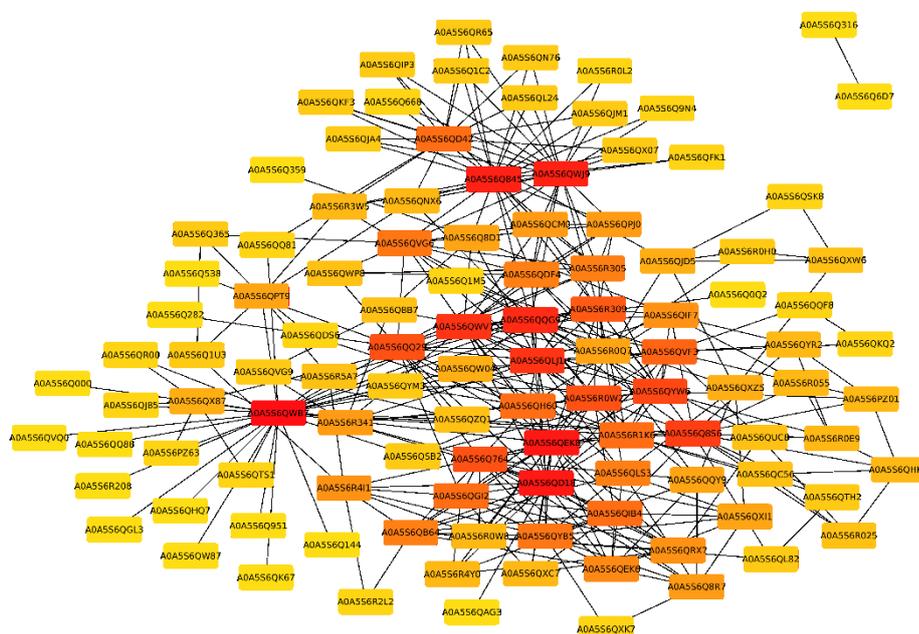


Legenda: Análise de rede da interação proteína-proteína do grupo PSE NTD, mostrando o grau de importância /interação na rede. Sendo os vermelhos com maior importância e os amarelos, com menor importância.

Nesta rede de grau de importância do grupo PES NTD (Gráfico 13), podemos perceber que as proteínas mais influentes são: A0A5S6QWB7 (14\_3\_3 domain-containing protein) com 23 de pontuação, A0A5S6QEK8 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) com 21 de

pontuação, A0A5S6QD18 (Enolase) com 20 de pontuação, A0A5S6QQG9 (Ubiquitin-like domain-containing protein) com 19 de pontuação, A0A5S6QWJ9 e A0A5S6Q845 (Vitellogenin domain-containing protein) com 17 de pontuação.

Gráfico 14 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de importância delas no grupo PES TD



Legenda: Análise de rede da interação proteína-proteína do grupo PSE TD, mostrando o grau de importância /interação na rede. Sendo os vermelhos com maior importância e os amarelos, com menor importância.

Já na rede de grau de importância do grupo PES TD (Gráfico 14), podemos perceber que as proteínas mais influentes são: A0A5S6QWB7 (14\_3\_3 domain-containing protein) com 31 de pontuação, A0A5S6QD18 (Enolase) e A0A5S6QEK8 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ambas com 24 de pontuação, A0A5S6QWJ9 e A0A5S6Q845 (Vitellogenin domain-containing protein) com 23 cada.

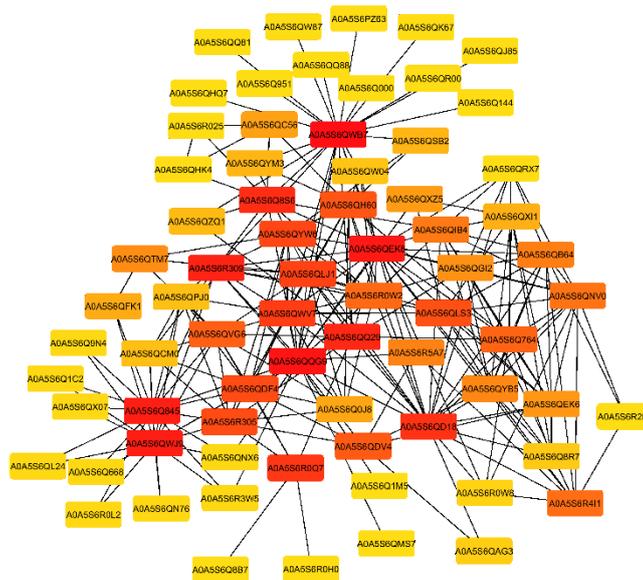
As proteínas mais importantes de cada grupo foram as mesmas, porém em ordens diferentes e com diferentes números de interações. A proteína 14\_3\_3 domain-containing protein permaneceu como a mais importante em ambas as redes, e em geral, todas as proteínas (14\_3\_3 domain-containing protein, Enolase, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e Vitellogenin domain-containing protein)

Essa proteína encontrada como a de maior importância, 14\_3\_3 domain-containing protein, é uma das que já foram encontradas em vesículas de *Trichuris*. Podendo indicar que

as proteínas encontradas em vesículas são de grande importância para a resposta do helminto ao ambiente.

Em seguida, fizemos a análise do Betweenness das redes. Esta centralidade identifica proteínas que atuam como pontes entre partes de uma rede e quantifica sua influência sobre o fluxo de informações. Nesse processo podemos analisar mais um fator de complexidade das redes de PES NTD e PES TD.

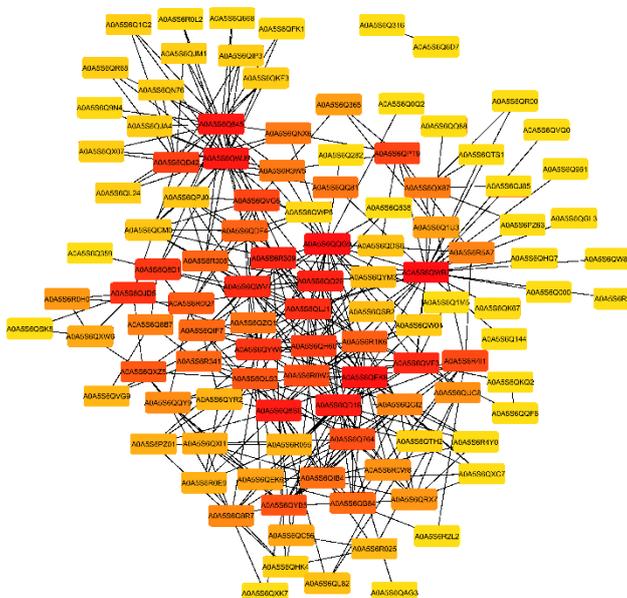
Gráfico 15 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de Betweenness no grupo PES NTD



Legenda: Análise de rede da interação proteína-proteína do grupo PSE NTD, mostrando o Betweenness da rede. Sendo os vermelhos com maior importância e os amarelos, com menor importância.

Nessa rede de PES NTD (Gráfico 15), podemos perceber que as proteínas com uma maior pontuação para o Betweenness são: A0A5S6QWB7 (14\_3\_3 domain-containing protein), A0A5S6QQG9 (Ubiquitin-like domain-containing protein), A0A5S6QEK8 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), A0A5S6QWJ9 e A0A5S6Q845 (Vitellogenin domain-containing protein) e A0A5S6R309 (HATPase\_c domain-containing protein).

Gráfico 16 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de Betweenness no grupo PES TD



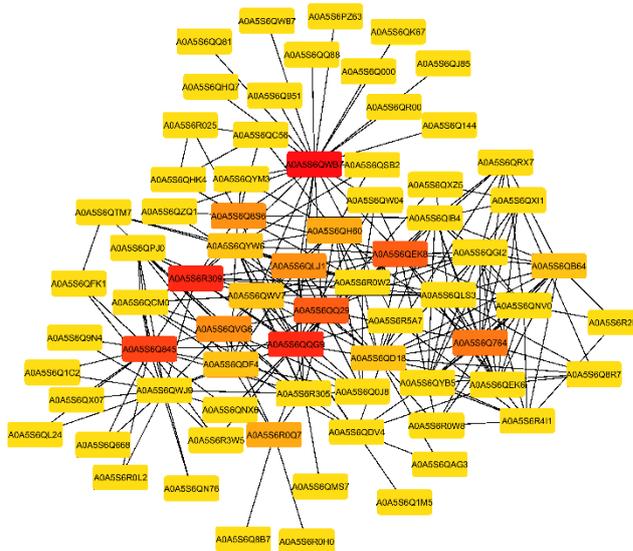
Legenda: Análise de rede da interação proteína-proteína do grupo PSE TD, mostrando o Betweenness da rede. Sendo os vermelhos com maior importância e os amarelos, com menor importância.

Já na rede de PES TD (Gráfico 16), podemos perceber que as proteínas com uma maior pontuação para o Betweenness são: A0A5S6QWB7 (14\_3\_3 domain-containing protein), A0A5S6QQG9 (Ubiquitin-like domain-containing protein), A0A5S6QEK8 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), A0A5S6QWJ9 e A0A5S6Q845 (Vitellogenin domain-containing protein)

Fazendo a comparação do Betweenness entre os grupos PES NTD e PES TD, podemos ver que as mesmas proteínas se encontram como as mais importantes na rede. Na maioria dessas proteínas, a pontuação delas foi maior na rede do grupo PES NTD, com exceção das proteínas 14\_3\_3 domain-containing protein e Ubiquitin-like domain-containing protein, que tiveram uma pontuação maior em PES TD.

Posteriormente, queríamos entender as relações das proteínas por uma rede de Bottleneck. Esta centralidade é usada para identificar proteínas conectoras-chave em redes de proteínas. Essas proteínas têm maior probabilidade de ser essenciais e apresentar propriedades funcionais relevantes.

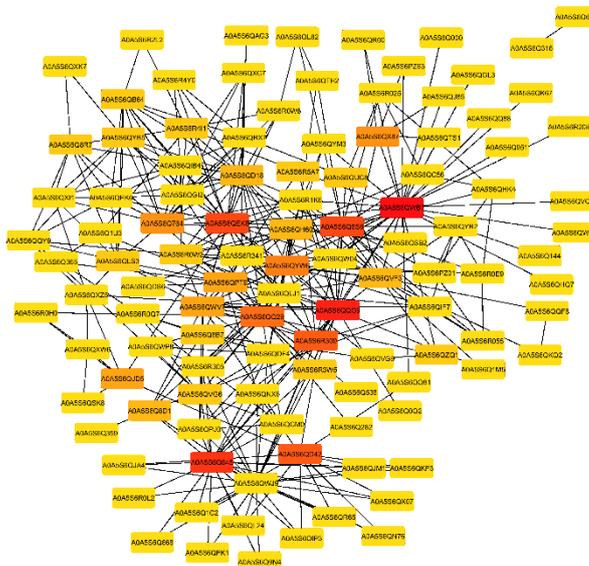
Gráfico 17 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de Bottleneck no grupo PES NTD



Legenda: Análise de rede da interação proteína-proteína do grupo PSE NTD, mostrando os gargalos da rede, ou seja o Bottleneck. Sendo os vermelhos com maior importância e os amarelos, com menor importância.

Já nas redes demonstrando os gargalos ou Bottlenecks, as proteínas com maiores pontuações do grupo PES NTD (Gráfico 17) foram: A0A5S6QWB7 (14\_3\_3 domain-containing protein), A0A5S6QQG9 (Ubiquitin-like domain-containing protein), A0A5S6R309 (HATPase\_c domain-containing protein), A0A5S6Q845 (Vitellogenin domain-containing protein), A0A5S6QEK8 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e A0A5S6QQ29 (thioredoxin-dependent peroxiredoxin).

Gráfico 18 - Gráfico de rede mostrando as interações proteína-proteína e o grau de Bottleneck no grupo PES TD



Legenda: Análise de rede da interação proteína-proteína do grupo PSE TD, mostrando os gargalos da rede, ou seja, o Bottleneck. Sendo os vermelhos com maior importância e os amarelos, com menor importância.

Na rede de Bottleneck de PES TD (Gráfico 18), as proteínas mais importantes foram: A0A5S6QWB7 (14\_3\_3 domain-containing protein), A0A5S6QQG9 (Ubiquitin-like domain-containing protein), A0A5S6Q845 (Vitellogenin domain-containing protein), A0A5S6QEK8 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e A0A5S6Q8S6 (Actin).

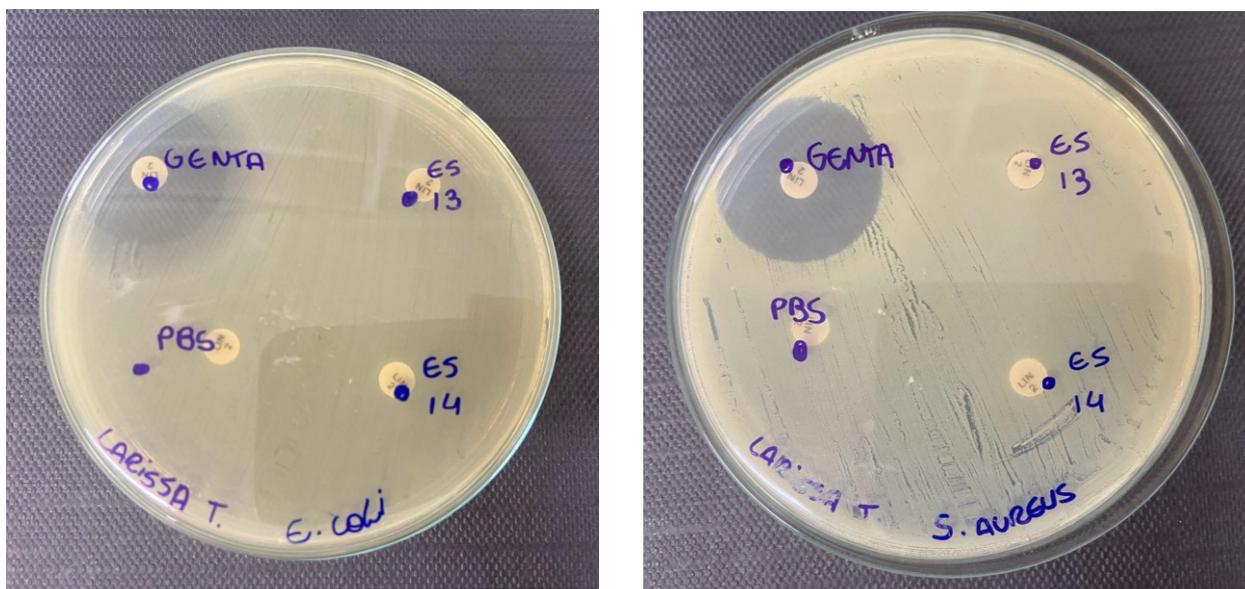
Quando fazemos a comparação das proteínas mais marcantes de cada rede, podemos notar algumas diferenças. As duas primeiras mais importantes em ambas são as mesmas (14\_3\_3 domain-containing protein e Ubiquitin-like domain-containing protein) porém com pontuações diferentes, sendo maiores em PES TD. Já as proteínas: HATPase\_c domain-containing protein, Vitellogenin domain-containing protein, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e thioredoxin-dependent peroxidoredoxin da rede PES NTD também são encontradas na rede PES TD, porém com menos importância em comparação a outras proteínas da mesma rede. E o mesmo acontece com as outras proteínas mais importantes encontradas na

rede PES TD (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e Actin) que também são encontradas na rede PES NTD, mas com pontuações levemente menores que PES TD.

### 3.2 Antibiogramas, produto de excreção e secreção de *T. muris* e o comportamento bacteriano

Nos experimentos envolvendo o antibiograma, observamos que a gentamicina (controle positivo) inibiu ambas as cepas (*E. coli* AB1157 e *S. aureus* ATCC25923), como esperado. Já o PBS estéril, não inibiu o crescimento das cepas (controle negativo). O PES não demonstrou ação inibitória em nenhuma das cepas (Figura 11).

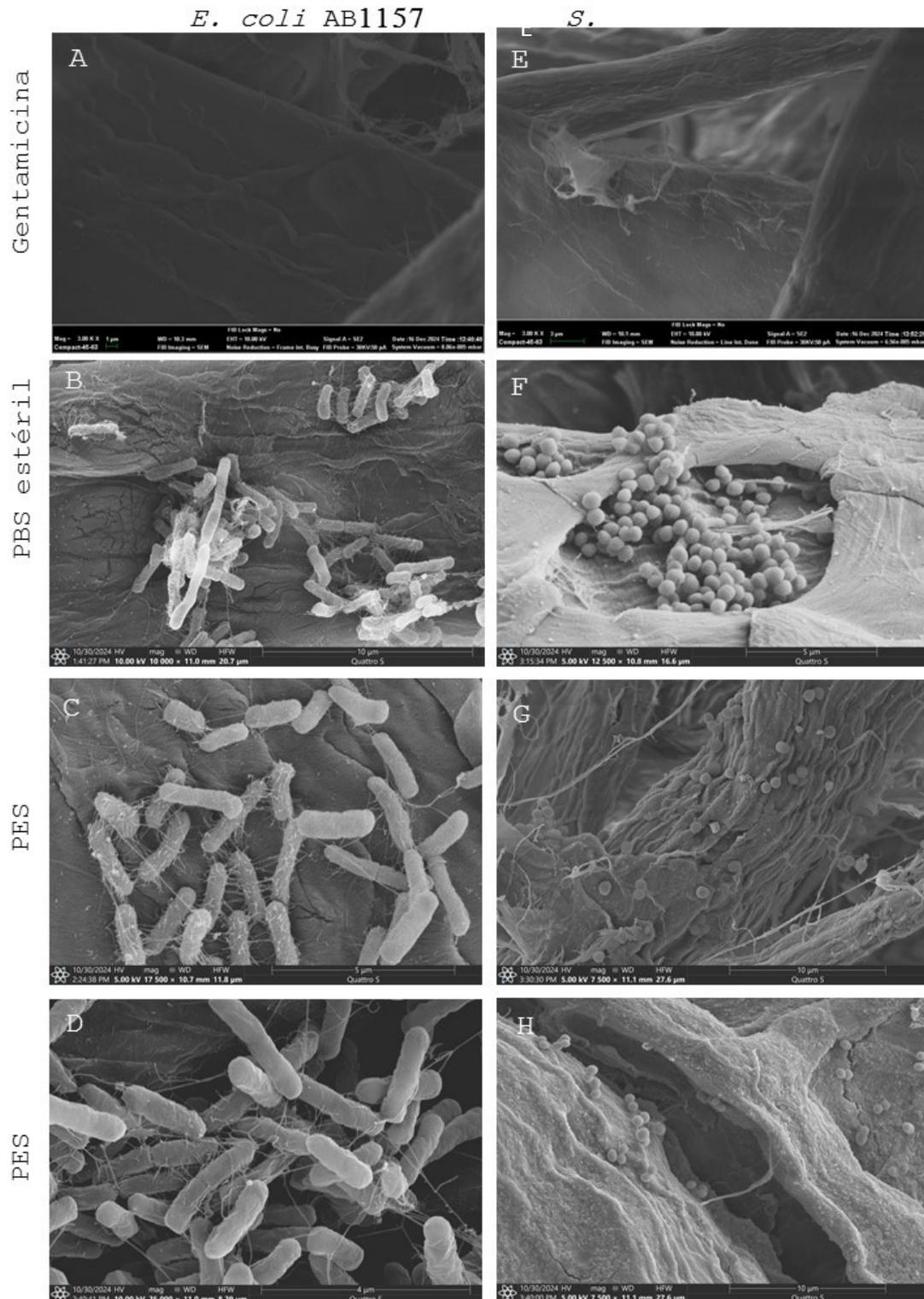
Figura 11 - Antibiogramas



Legenda: Na imagem a esquerda, o antibiograma com *E. coli* AB1157 (gram -). E a direita *S. aureus* ATCC25923 (gram +).

Para analisar se o PES influenciou na capacidade de agregamento das bactérias nos discos, realizamos a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Observamos que a *E. coli* não apresentou diferenças na agregação tanto no controle negativo quanto no disco com PES. Porém, em relação ao *S. aureus*, verificamos uma diferença em seu padrão de adesão no disco. Esse grupo bacteriano se agrupa, formando aglomerados em “cachos de uva” (figura 12F); mas quando em contato com o PES, as bactérias se organizaram de forma mais esparsa, sem formar este padrão de aglomerado (figura 12 G-H).

Figura 12 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura – Antibiograma



Legenda: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura dos discos de antibiograma. (A) Gentamicina - *E. coli* AB1157 (controle positivo). (B) PBS estéril - *E. coli* AB1157 (controle negativo). (C-D) PES - *E. coli* AB1157. (E) Gentamicina - *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo). (F) PBS estéril - *S. aureus* ATCC 25923 (controle negativo). (G-H) PES - *S. aureus* ATCC 25923.

### 3.3 Interação células intestinais, bactérias e produto de excreção e secreção

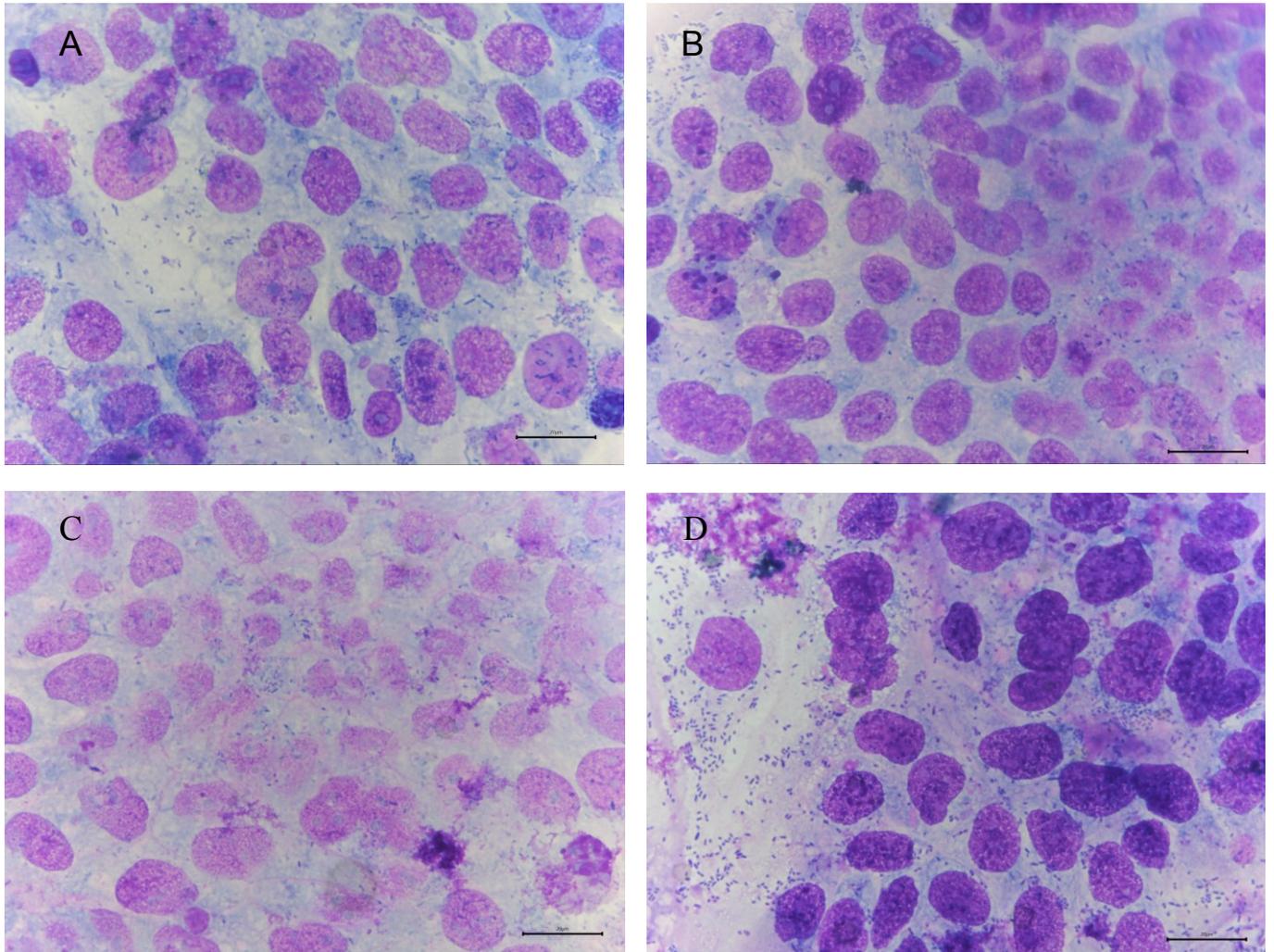
A interação das bactérias com monocamadas de células intestinais em contato com o PES foi realizada com três cepas diferentes: *E. coli* 042 (formadora de biofilme e pouco invasora), *E. coli* Dh5 $\alpha$  (não formadora de biofilme e não invasora) e *Salmonella* 020 (não formadora de biofilme e muito invasora). Submetemos cada uma dessas cepas a ambientes com dois tipos de células diferentes: T84 e Caco-2, submetidas à diferentes concentrações do PES (5, 10 e 50  $\mu\text{g/ml}$ ). As análises foram feitas usando a Microscopia de Luz e MEV.

### 3.4 Análise por Microscopia de Luz

#### 3.4.1 Células T84 - *E. coli* 042, *E. coli* Dh5 $\alpha$ e *Salmonella* c20

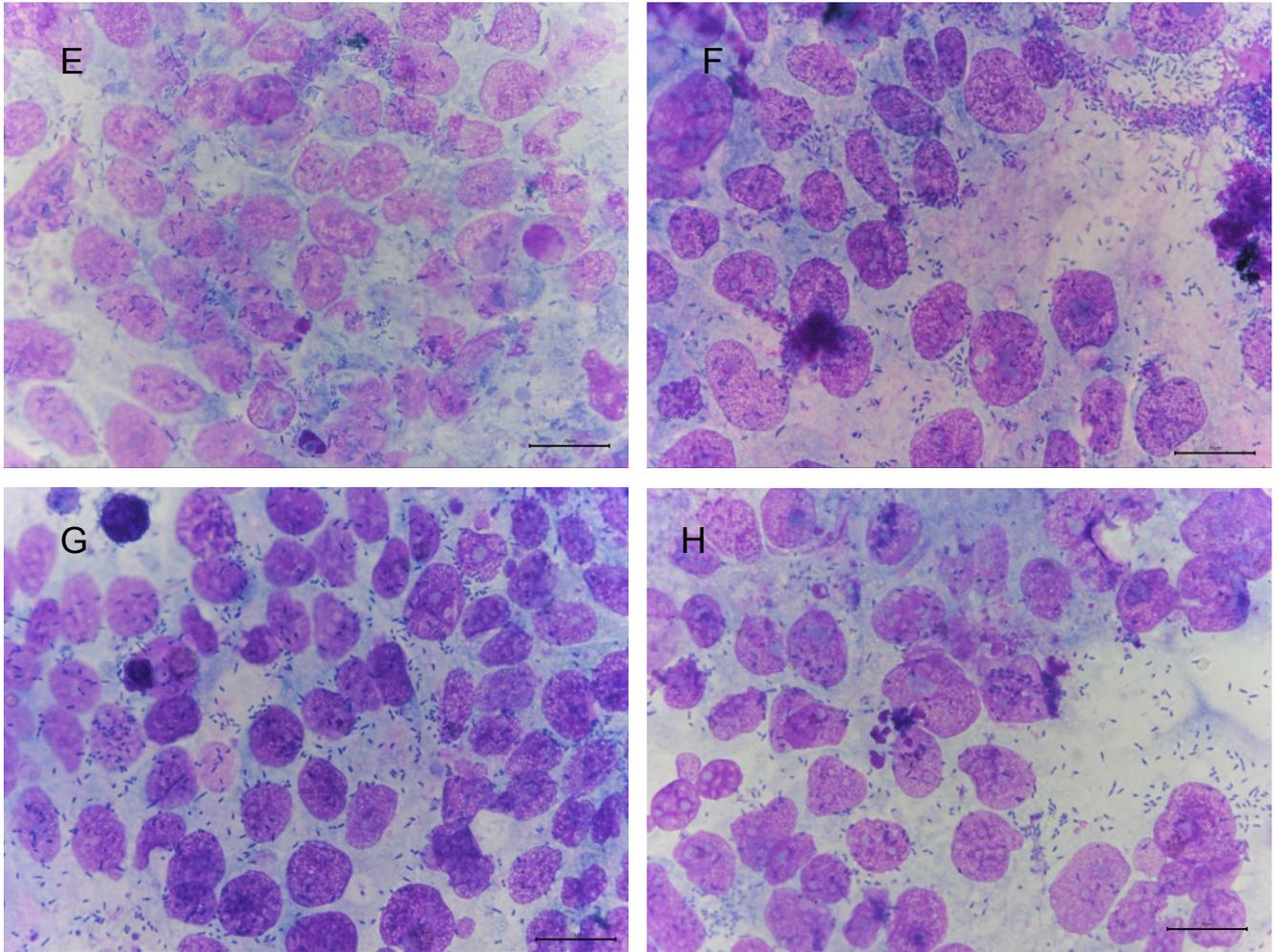
Na análise da interação das células T84 com *E. coli* 042, identificamos que a concentração de bactérias em presença de PES (5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ) diminuem em relação ao controle. Contrariamente, quando na presença de PES a 50  $\mu\text{g/ml}$ , observamos o aumento da concentração bacteriana em relação aos outros grupos, como destacamos na figura 13. Já ao analisar a monocamada de T84 em interação com as bactérias *E. coli* Dh5 $\alpha$  e *Salmonella* c20, representadas nas figuras 14 e 15, não identificamos um padrão, em análise qualitativa, não houve influência dos PES no comportamento de adesão das bactérias. Embora tenhamos observado essas diferenças, as mesmas não foram estatisticamente significativas.

Figura 13 - Microscopia de Luz - Células T84 - *E. coli* 042

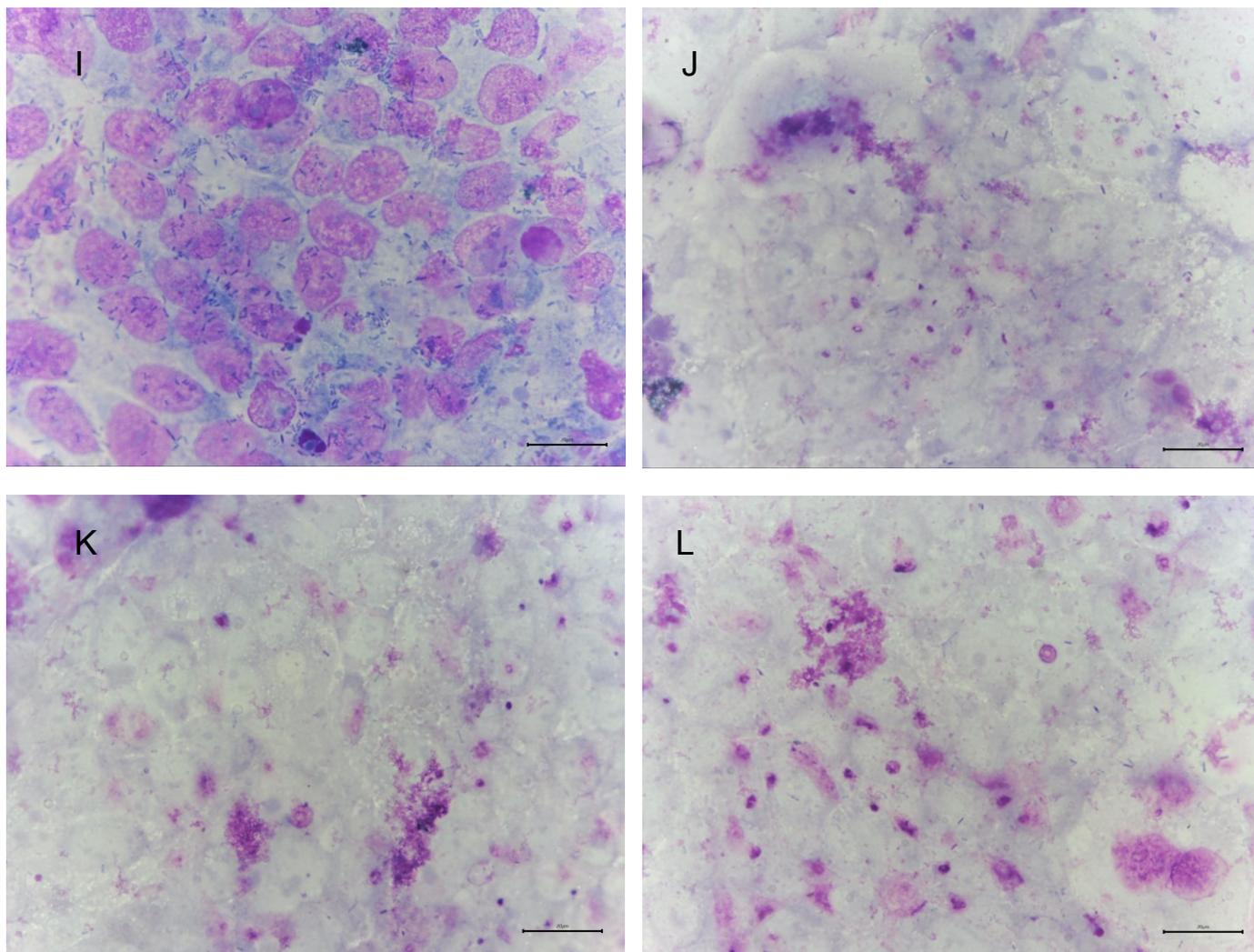


Legenda: Imagens de Microscopia de Luz das células T84 em contato com *E. coli* 042 e PES em diferentes concentrações. (A) - controle. (B) - PES 05 µg/ml (C) - PES 10 µg/ml (D) - PES 50 µg/ml

Figura 14 - Microscopia de Luz - Células T84 - *E. coli* Dh5□



Legenda: Imagens de Microscopia de Luz das células T84 em contato com *E. coli* Dh5□ e PES em diferentes concentrações. (E) - controle. (F) - PES 05 µg/ml (G) - PES 10 µg/ml (H) - PES 50 µg/ml

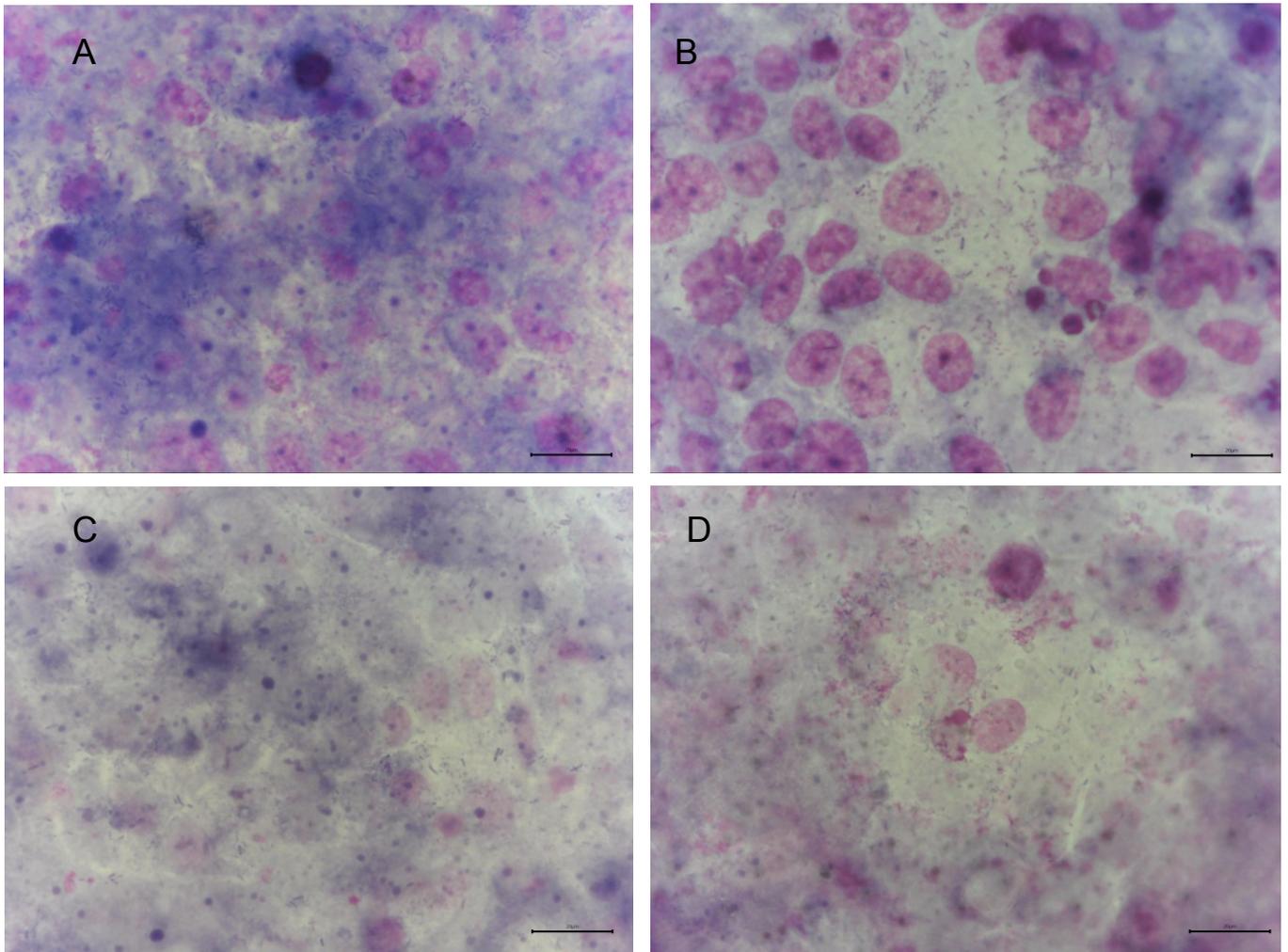
Figura 15 - Microscopia de Luz - Células T84 - *Salmonella c20*

Legenda: Imagens de Microscopia de Luz das células T84 em contato com *Salmonella c20* e PES em diferentes concentrações. (I) - controle. (J) - PES 05 µg/ml (K) - PES 10 µg/ml (L) - PES 50 µg/ml

#### 3.4.2 Células Caco-2 - *E. coli* 042, *E. coli* Dh5□ e *Salmonella c20*

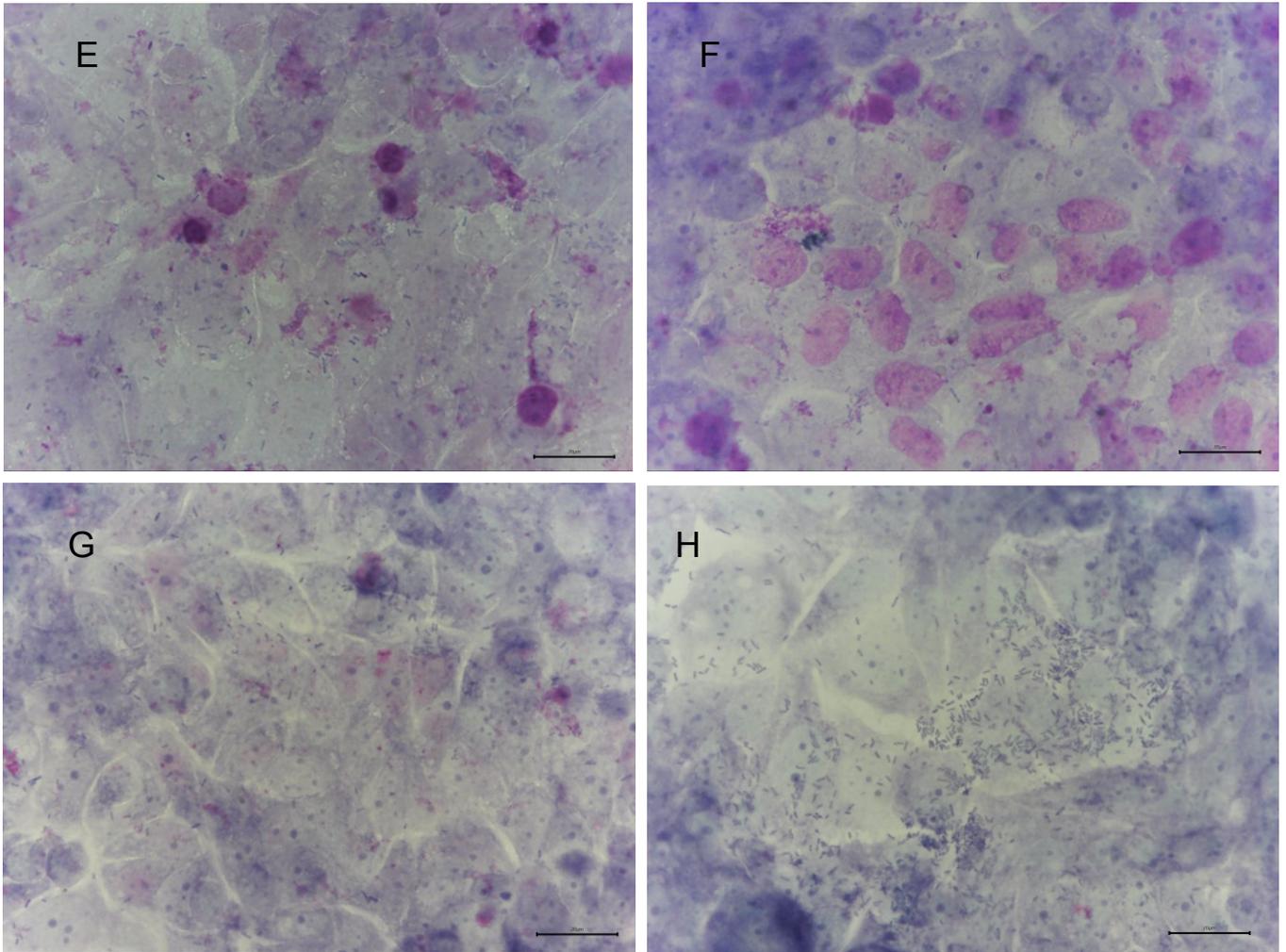
Nas análises realizadas com células Caco-2, identificamos que a *E. coli* 042 e *Salmonella c20*, representados nas figuras 16 e 18, não apresentaram variação de concentração ao comparar com os controles e com PES. Somente a bactéria *E. coli* Dh5□ que apresentou aumento de bactérias aderidas nas concentrações maiores de PES, como podemos observar na figura 17. Porém, estatisticamente não foi significativo.

Figura 16 - Microscopia de Luz - Células Caco-2 - *E. coli* 042



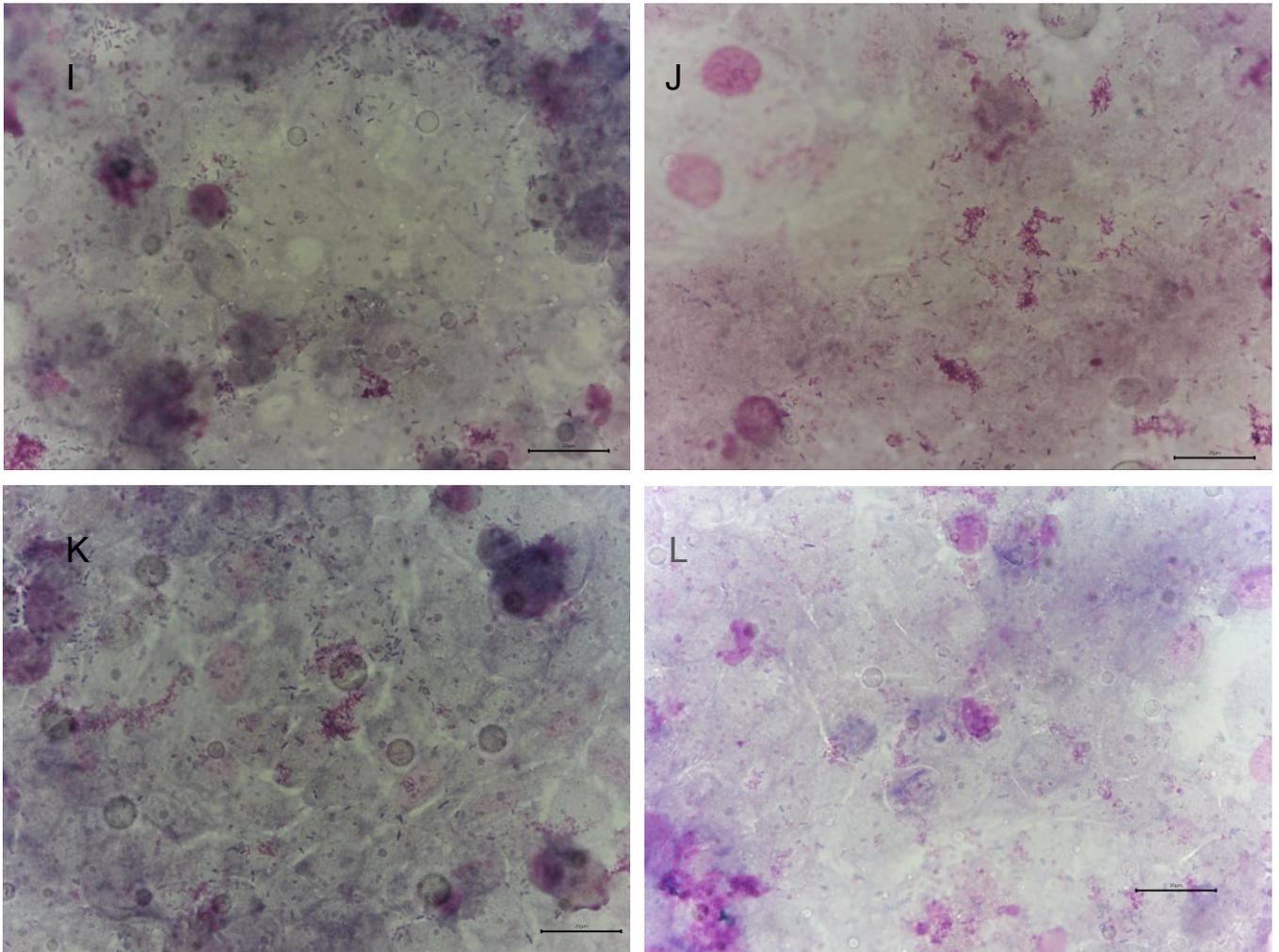
Legenda: Imagens de Microscopia de Luz das células Caco-2 em contato com *E. coli* 042 e PES em diferentes concentrações. (A) - controle. (B) - PES 05 µg/ml (C) - PES 10 µg/ml (D) - PES 50 µg/ml

Figura 17 - Microscopia de Luz - Células Caco-2 - *E. coli* Dh5 $\alpha$



Legenda: Imagens de Microscopia de Luz das células Caco-2 em contato com *E. coli* Dh5 $\alpha$  e PES em diferentes concentrações. (E) - controle. (F) - PES 05 µg/ml (G) - PES 10 µg/ml (H) - PES 50 µg/ml

Figura 18 - Microscopia de Luz - Células Caco-2 - *Salmonella c20*



Legenda: Imagens de Microscopia de Luz das células Caco-2 em contato com *Salmonella c20* e PES em diferentes concentrações. (I) - controle. (J) - PES 05 µg/ml (K) - PES 10 µg/ml (L) - PES 50 µg/ml

Tabela 1 - Média da contagem de bactérias de cada condição

	042 Controle	042 PES 05	042 PES 10	042 PES 50	DH5a controle	Dh5a PES 05	DH5a PES 10	DH5a PES 50	020 Controle	020 PES 05	020 PES 10	020 PES 50
T84	353.4	326.1	277.8	486.5	591.6	420.4	544.1	325	64	51.5	106.7	115.5
Caco-2	165.2	166	216.2	186.8	142.4	144	199.6	322.8	113.6	87	117	95.6

Legenda: Tabela apresentando as médias da contagem bacteriana em diferentes condições, considerando o tipo de célula, a concentração de PES e a espécie de bactéria.

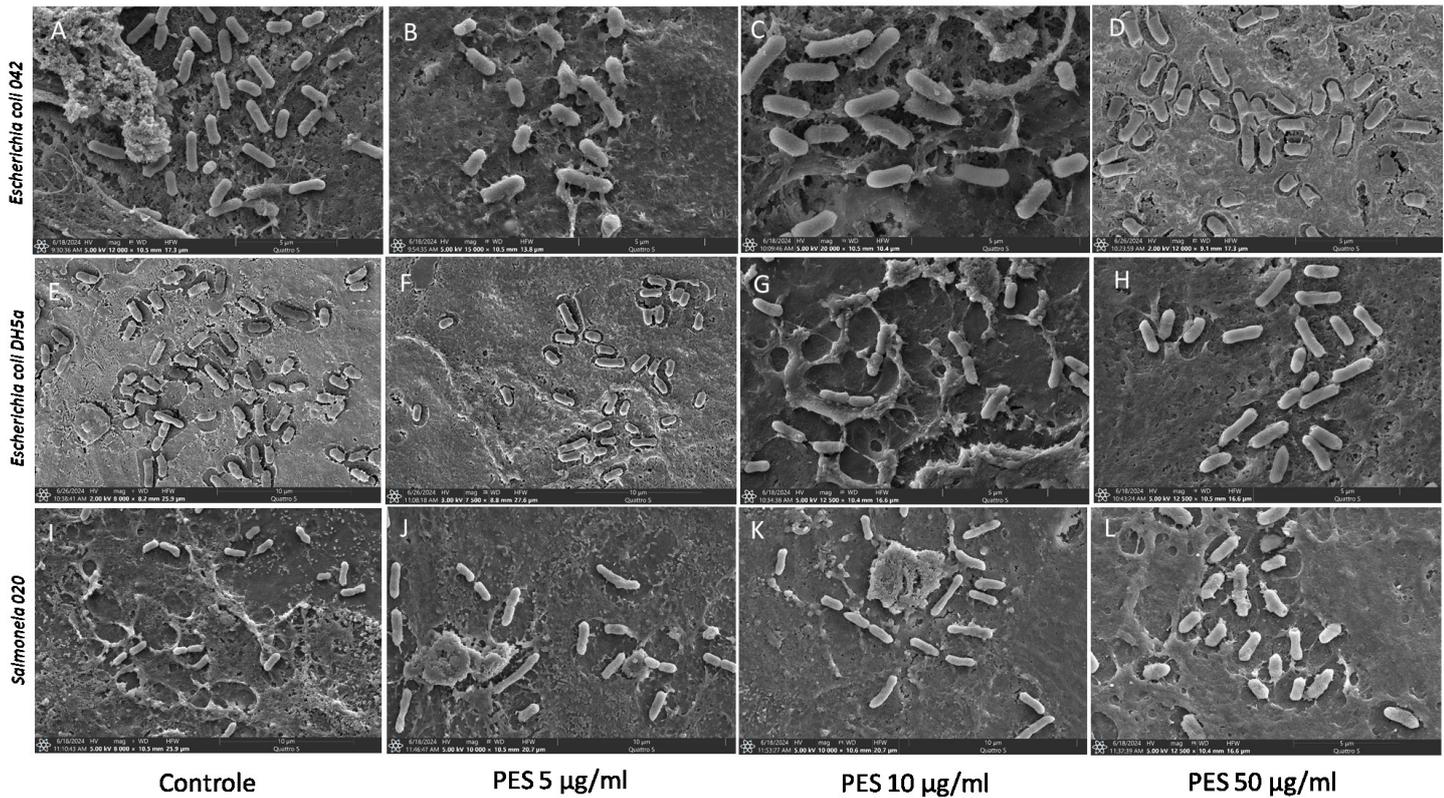
### 3.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura com as Células T84

Para caracterizar em detalhes a ultraestrutura da interação dessas bactérias com a superfície da membrana plasmática das células intestinais, usamos a MEV. Quando em interação com a monocamada de células T84, a *E. coli* 042, que apresenta padrão agregativo e pouco invasivo, apresentou evidências de característica invasiva, quando exposta a concentrações elevadas de PES, principalmente com PES 50 µg/ml (Figura 19 (A-D)). Essa característica pode ser observada nas imagens que revelam um processo de fusão e penetração na membrana das células da monocamada.

Com a bactéria *E. coli* Dh5 $\square$ , que não tem perfil invasivo ou de formação de biofilme, não observamos mudança na capacidade de invasão, porém, destacamos que PES induziu a sua agregação, figura 20 (E-H), sugerindo uma formação de biofilme dessas bactérias. É possível observar mais estruturas filamentosas entre elas, se agregando em grupos, destacando grupos grandes na concentração de 50 µg/ml (figura 20 H).

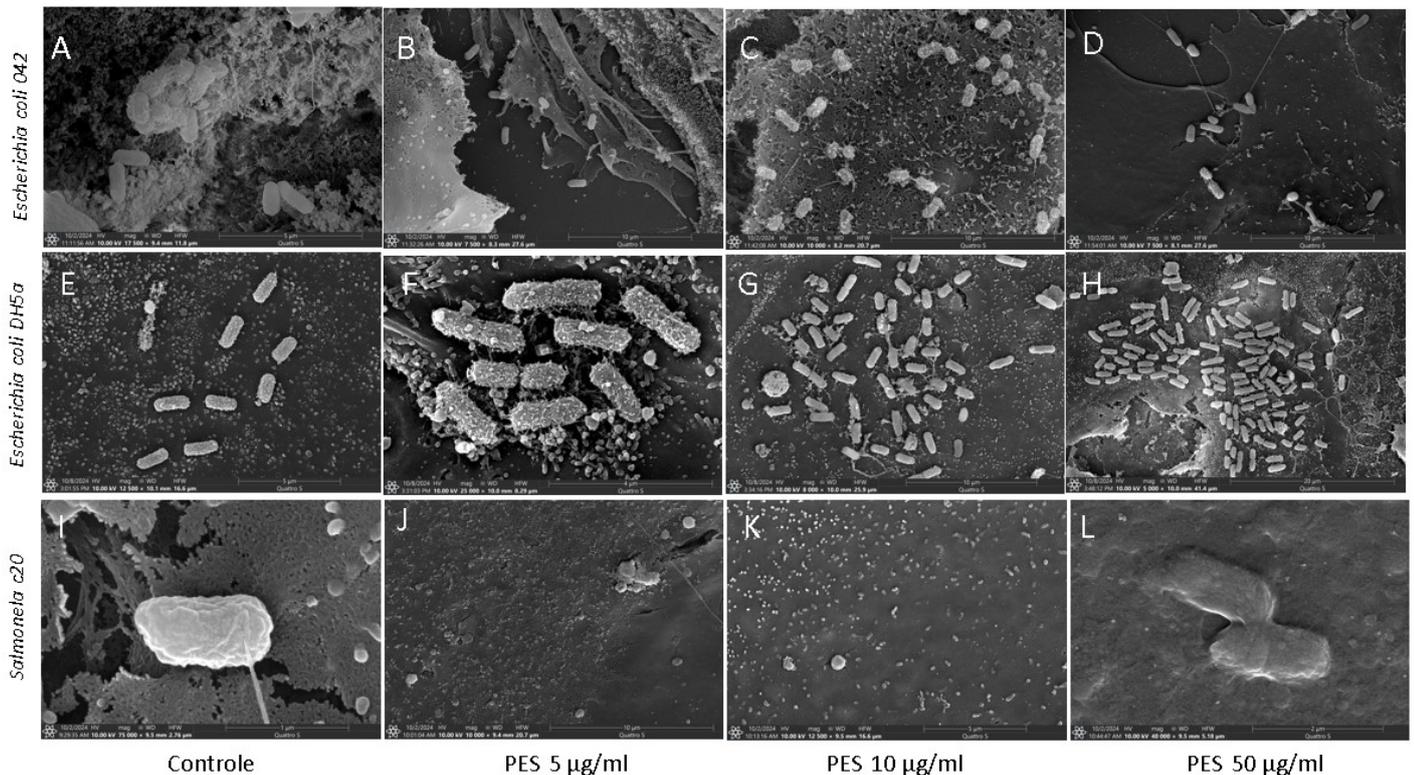
Explorando o comportamento da *Salmonella* c20, bactéria não formadora de biofilme, mas com alto perfil invasivo, não identificamos mudanças em seu comportamento com as diferentes concentrações de PES, como podemos observar nas figuras 19 e 20 (I-L).

Figura 19 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura - Células T84



Legenda: Imagens de MEV da interação das bactérias com a monocama de células T84 com PES em diferentes concentrações. (A) Interação *E. coli* 042 sem PES - controle. (B) Interação *E. coli* 042 com PES 05  $\mu\text{g/ml}$ . (C) Interação *E. coli* 042 com PES 10  $\mu\text{g/ml}$ . (D) Interação *E. coli* 042 com PES 10  $\mu\text{g/ml}$ . (E) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  sem PES - controle. (F) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 05  $\mu\text{g/ml}$ . (G) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 10  $\mu\text{g/ml}$ . (H) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 50  $\mu\text{g/ml}$ . (I) Interação *Salmonella* c20 sem PES - controle. (J) Interação *Salmonella* c20 com PES 05  $\mu\text{g/ml}$ . (K) Interação *Salmonella* c20 com PES 10  $\mu\text{g/ml}$ . (L) Interação *Salmonella* c20 com PES 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Figura 20 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura - Células T84



Legenda: Imagens de MEV da interação das bactérias com a monocamada de células T84 com PES em diferentes concentrações. (A) Interação *E. coli* 042 sem PES - controle. (B) Interação *E. coli* 042 com PES 05  $\mu$ g/ml. (C) Interação *E. coli* 042 com PES 10  $\mu$ g/ml. (D) Interação *E. coli* 042 com PES 10  $\mu$ g/ml. (E) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  sem PES - controle. (F) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 05  $\mu$ g/ml. (G) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 10  $\mu$ g/ml. (H) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 50  $\mu$ g/ml. (I) Interação *Salmonella* c20 sem PES - controle. (J) Interação *Salmonella* c20 com PES 05  $\mu$ g/ml. (K) Interação *Salmonella* c20 com PES 10  $\mu$ g/ml. (L) Interação *Salmonella* c20 com PES 50  $\mu$ g/ml

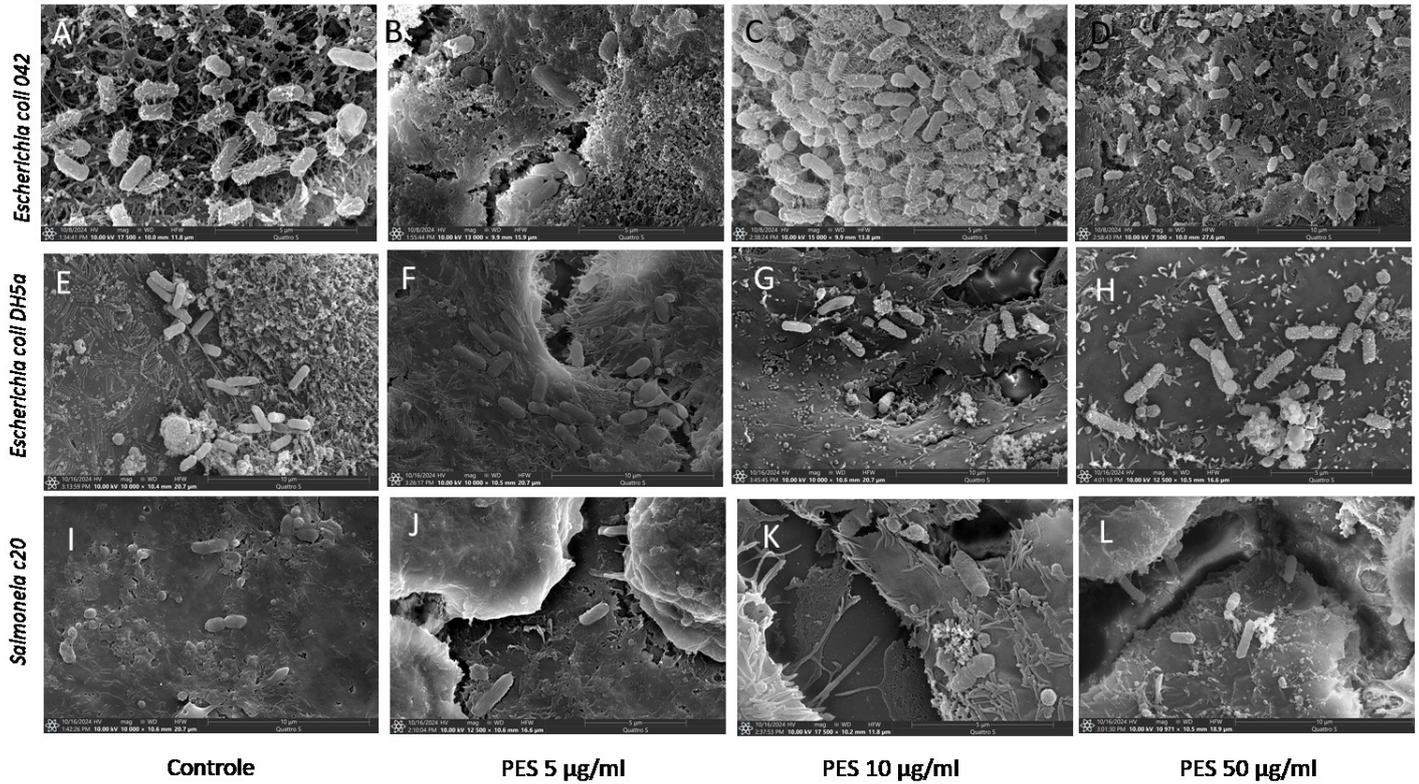
### 3.6 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura - Células Caco-2

Já nas análises usando a MEV com a monocamada de células Caco-2, vimos que a *E. coli* 042 aumentou seu perfil agregativo entre si conforme o aumento da concentração de PES, ficando mais aglomeradas e com estruturas filamentosas, (figura 21 (A-D)), sendo na concentração 10  $\mu$ g/ml (figura 21 C), a que mais evidenciou esse comportamento.

Com a *E. coli* Dh5 $\alpha$  que não tem perfil invasor, não houve diferença em seu comportamento, com exceção da concentração de 5  $\mu$ g/ml de PES (figura 21-F) onde, aparentemente, começaram um processo que sugere invasão de células, não sendo observado nas outras concentrações (figura 21 G-H). Por fim, a *Salmonella* c20, figura 21 (I-L), também

não teve mudanças aparentes em seu comportamento quando em contato com as células Caco-2.

Figura 21 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura - Células Caco-2



Legenda: Imagens de MEV da interação das bactérias com a monocamada de células Caco-2 com PES em diferentes concentrações. (A) Interação *E. coli* 042 sem PES - controle. (B) Interação *E. coli* 042 com PES 05  $\mu$ g/ml. (C) Interação *E. coli* 042 com PES 10  $\mu$ g/ml. (D) Interação *E. coli* 042 com PES 10  $\mu$ g/ml. (E) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  sem PES - controle. (F) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 05  $\mu$ g/ml. (G) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 10  $\mu$ g/ml. (H) Interação *E. coli* Dh5 $\alpha$  com PES 50  $\mu$ g/ml. (I) Interação *Salmonella* c20 sem PES - controle. (J) Interação *Salmonella* c20 com PES 05  $\mu$ g/ml. (K) Interação *Salmonella* c20 com PES 10  $\mu$ g/ml. (L) Interação *Salmonella* c20 com PES 50  $\mu$ g/ml

## 4 DISCUSSÃO

A tricuriase é uma doença causada por nematoides do gênero *Trichuris*, no qual o *T. trichiura* é o parasito de humanos. Em nossos estudos, exploramos o modelo experimental murino, infectado com o *T. muris*. Esses parasitos possuem seus Produtos de Excreção e Secreção (PES) ricos em microRNAs e proteínas que são estudadas por diferentes grupos, associando a eles diversas funções, dentre elas a mais explorada é a capacidade de imunomodulação (Harnett, 2014; Schachter *et al.*, 2020)

Na caracterização proteômica dos PES de *T. muris* provenientes de camundongos não tratados e tratados com antibiótico (PES NTD e PES TD respectivamente), analisamos como os fármacos piperacilina sódica + tazobactam influenciaram na composição proteica destes produtos. O produto foi obtido do sobrenadante da cultura de parasitos e o conteúdo somático de parasitos macerados. No total, foram encontradas 188 proteínas presentes entre os dois grupos de produto. Sendo 117 proteínas compartilhadas, mas em diferentes abundâncias; 65 proteínas encontradas somente em PES TD e 6 encontradas somente no PES NTD. Diante disso, consideramos duas possibilidades como potenciais causadoras desse processo: 1 - a alteração pode resultar de uma ação direta do fármaco sobre a biologia do parasito; ou 2- a resposta pode ser consequência de mudanças na microbiota do hospedeiro, levando o parasito a reagir e se adaptar a essas alterações ambientais.

As proteínas encontradas somente em PES NTD foram: galectina, domínio C-terminal contendo fibrinogênio, fosfolipase A2, glicose-6-fosfato isomerase, peptidil-prolil cis-trans isomerase e gamma-cistationase. Sendo a fosfolipase A2, a proteína que só teve abundância nesse grupo, não sendo encontrada em PES TD nem nos grupos de conteúdo somático. Essa proteína é responsável por fazer a hidrólise de glicerofosfolipídeos de membrana, resultando em ácido araquidônico, que é um ácido graxo poli-insaturado (Murakami, 2023). Ela está associada a processos como digestão e metabolismo de fosfolipídeos, defesa, transdução de sinais e inflamação (Sun *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 2017).

As demais proteínas foram encontradas nos grupos somáticos, mas não em PES TD, por exemplo: a galectina, que pode ter ação anti-inflamatória e imunoregulatória (Law *et al.*, 2020), além de ter sido descrita com ação antimicrobiana (Amstalden, 2021). Proteínas com domínio C-terminal contendo fibrinogênio já foram identificadas em outros estudos com invertebrados, mais especificamente moluscos (*Biomphalaria glabrata*, *Haliothis discus* e *Sinonovacula constricta*) crustáceos (*Marsupenaeus japonicus*) e insetos (*Armigeres subalbatus*), onde

desempenham um papel importante na resposta de defesa contra patógenos, como bactérias. (Wang *et al.*, 2004; Hanington e Zhang, 2010; Chai *et al.*, 2012; Adema, 2015; Zou, *et al.*, 2021). A glicose-6-fosfato isomerase é uma proteína muito conhecida entre várias espécies, sendo relacionada com a via glicolítica (Achari *et al.*, 1981). A Peptidil-prolil cis-trans isomerases catalisam ligações peptídicas, ajudam no enovelamento de outras proteínas, parecem participar nos processos de sinalização, reconhecimento da superfície celular, como chaperonas e resposta ao choque térmico (Mourão 2005). E a gamma-cistationase está relacionada com o metabolismo de aminoácidos sulfurados, catalisando principalmente a cistationina em cisteína (Stipanuk, 2004).

Já no grupo PES TD, das 65 proteínas que não se apresentam em PES NTD, algumas se destacam como FABP domain-containing protein, GST class-pi e cystatin domain-containing protein e Elongation factor 1-alpha. As FABP domain-containing proteins (fatty acid binding proteins) foram encontradas em estudos com uma espécie de caranguejo, onde essas proteínas atuam com ação antimicrobiana (Tan *et al.*, 2015). As proteínas da família GSTs (glutathione S-transferases), são associadas à desintoxicação de eletrófilos de xenobióticos e resistência a fármacos (Henderson *et al.*, 1998; Kazemnezhad *et al.*, 2006). Cystatin domain-containing protein, foram associadas em um estudo envolvendo *Ascaris lumbricoides* (Caraballo *et al.*, 2021), com possíveis propriedades imunomodulatórias. Além disso, podem apresentar outras funções, como ações relacionadas ao estresse, ações inibitórias e regulação fisiológica, além de possivelmente ter atividade antimicrobiana (Midha *et al.*, 2018). A proteína Elongation factor 1-alpha foi encontrada em um estudo referente ao extrato do ovo não embrionado de *Trichuris trichiura*, e é conhecida por estar relacionada com a biossíntese proteica (Cruz *et al.*, 2021a).

Esses dados destacam o impacto do tratamento no perfil proteico dos parasitos, refletindo mudanças nas proteínas secretadas e/ou excretadas em resposta ao ambiente alterado pelo antibiótico. Essa variação proteica pode estar associada a mecanismos de adaptação com a microbiota hospedeira, indicando alvos potenciais para a compreensão da fisiopatologia desta infecção em equilíbrio com as bactérias presentes nos intestinos.

Outras proteínas importantes foram identificadas em ambos os grupos, embora em abundâncias diferentes. No mapa de calor (*heat map*), há representação das proteínas encontradas nos grupos PES NTD e PES TD, permitindo uma visualização gráfica das abundâncias de proteínas específicas em cada grupo. Ao todo, foram encontradas 117 proteínas, onde 79 foram mais expressas no grupo tratado e 38 foram mais expressas no grupo não tratado. Mais um fator que indica que o tratamento do hospedeiro com antibiótico, interferiu na resposta ao ambiente que esses nematoides se encontram.

Alguns dos domínios proteicos mais encontrados entre os grupos foram WAP (Whey acidic proteins) e SCP. As WAP domain-containing protein são proteínas encontradas em muitas outras espécies de animais, porém o que a destaca é a seu potencial antimicrobiano (Amparyup *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013), além de existirem estudos com essas proteínas para desenvolvimento de vacinas para helmintos (Wainwright e Shears, 2022). As SCP domain-containing protein, também encontrada em diversos outros estudos envolvendo helmintos, é conhecida por ter ação imunomoduladora, além de ajudar no processo de penetração no intestino (Morante *et al.*, 2017). Entre os dois grupos de análise, o PES TD foi o que apresentou maior abundância experimental de ambas.

Esses achados reforçam a hipótese de que o tratamento com antibiótico pode alterar o perfil proteômico dos parasitos, favorecendo a abundância experimental de proteínas que potencialmente auxiliam na adaptação ao ambiente alterado, principalmente com a eliminação da microbiota bacteriana.

Com a análise do KEGG, avaliamos as vias metabólicas de cada um dos grupos. Em PES NTD, entendemos que as vias eram: metabolismo de amido e sacarose (starch and sucrose metabolismo), metabolismo de piruvato (pyruvate metabolismo), processamento de proteínas no retículo endoplasmático (protein processing in endoplasmic reticulum), via das pentoses fosfato (pentose phosphate pathway), vias metabólicas (metabolic pathways), glicólise/ gliconeogênese (glycolysis/ gluconeogenesis), metabolismo de frutose e manose (fructose and mannose metabolismo), metabolismo da cisteína e metionina (cysteine and methionine metabolismo), metabolismo de carbono (carbon metabolismo), biossíntese de aminoácidos (biosynthesis of amino acids) e metabolismo de aminoaçúcares e nucleotídeos de açúcar (amino sugar and nucleotide sugar metabolismo). Vias comuns para que o parasito possa sobreviver a esse ambiente em que ele já é adaptado.

No grupo PES TD, foram identificadas as seguintes vias: metabolismo de piruvato, processamento de proteínas no retículo endoplasmático, vias metabólicas, glicólise/gliconeogênese, metabolismo de carbono, biossíntese de aminoácidos e metabolismo de aminoaçúcares e nucleotídeos de açúcar. Todos esses processos também estavam presentes no grupo PES NTD, que pela análise da KEGG, apresentou um número maior de vias expressas em comparação ao PES TD. Destacamos que a antibioticoterapia altera o perfil das vias em comparação à ausência de tratamento. Dessa forma, é possível observar que o tratamento impactou a resposta do parasito, evidenciando mais uma vez, como ele se adapta ao ambiente, neste caso, a modificação da microbiota do hospedeiro causada pelo tratamento com antibiótico podendo fornecer um ambiente de estresse ao parasito.

Essas vias destacam a plasticidade metabólica adaptativa dos parasitos que sofre interferência com o tratamento, mais uma vez destacando uma provável adaptação fisiológica dos nematoides ao ambiente com pressão seletiva imposta pelo uso do antibiótico.

Essas descobertas, em conjunto com os dados do diagrama de Venn apresentados, confirmam que o tratamento com antibiótico no hospedeiro altera substancialmente o perfil proteico desses nematoides, sugerindo insights sobre os mecanismos de adaptação destes nematoides com o tecido hospedeiro e às enterobactérias.

Com a análise de ontologia genética (GO) foi possível observar que os PES de ambos os grupos, tem um forte perfil proteolítico, já dentre as funções mais expressas, muitas são relacionadas com ativação, inibição e quebra de peptídeos e mucinas (Mckerrow *et al.*, 2006; Hasnain *et al.*, 2012). Isso se destaca devido ao comportamento invasivo do parasito, já que ele precisa penetrar no intestino grosso do hospedeiro para se estabelecer, e para isso, a atividade de quebra de moléculas dessa parede intestinal, inclusive proteínas, torna-se estratégico e fundamental. Em PES TD, a função de proteólise está mais expressa do que em PES NTD (na qual a mais expressa é a regulação da atividade de peptidases), podendo indicar que o tratamento interferiu na necessidade de maior quebra de proteínas, para melhor penetração, alimentação e regulação de outros processos biológicos.

Outro ponto de maior expressão em ambos, foi em ligações de íons metálicos (metal ion binding), que são proteínas que interagem com diversos metais como lítio, sódio, potássio, magnésio, cálcio, cobre ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  respectivamente), dentre outros; e estas proteínas participam de diversas vias biológicas importantes para a homeostase do organismo (Yamashita *et al.*, 1990), destacando a Lactamase B domain containing protein que pode ter ação antimicrobiana e a Peptidase\_M14 domain-containing protein que pode ter uma relação com o parasitismo ajudando na quebra de proteínas.

Também se observa que componentes da região extracelular estão muito expressos em ambos os grupos, se diferenciando entre PES NTD e PES TD; isso pode ocorrer quando o parasito enfrenta condições diferentes, levando a diferentes necessidades, como Wang *et al.*, percebeu em 2021, ao analisar diferentes isolados de *T. pseudospiralis*.

A atividade de endopeptidase do tipo serina (serine type-endopeptidase activity) também estava presente em ambos os grupos, como as peptidases S1 domain-containing proteins. Há estudos que indicam que as serina proteases são de extrema importância para degradação de mucinas, deixando-as com uma textura mais porosa. Trabalhos com *T. muris*, destacam que essas enzimas agem principalmente em Muc2, atuando na região N-terminal, promovendo a despolimerização desta mucina (Hasnain *et al.*, 2012). Destaca-se que o tratamento

teve uma influência nesta abundância experimental, podendo indicar o aumento da atividade do parasito com a maior capacidade de degradação de mucinas nesta condição. Esta ação ajudaria na permanência do parasito no intestino, na cópula e na postura dos ovos pelas fêmeas, e isso pode ter sido influenciado pela redução da microbiota intestinal.

Em nossos resultados, encontramos outros tipos de proteases, além do tipo serina-protease. As proteases do tipo serpina, são conhecidas como inibidoras de serinas (*Serine protease inhibitors*); foram encontradas em alguns estudos com *T. suis*, com potencial ação imunomodulatória, regulando mastócitos presentes na mucosa intestinal (Rhoads *et al.*, 2000a; Rhoads *et al.*, 2000b; Knox, 2006; Molehin *et al.*, 2012), além de fazer a polarização de macrófagos M2 (Leroux *et al.*, 2018). As serpinas foram encontradas nos dois grupos de PES, mas também em maior quantidade nos grupos tratados com antibióticos.

Proteases de cisteína (Cysteine proteases) também foram encontradas em nosso estudo; elas estão altamente relacionadas com digestão e invasão entre diversas espécies de helmintos (Caffrey *et al.*, 2018); porém já foi visto que também pode ter potencial imunomodulatório e de degradar mucinas (Hasnain *et al.*, 2012). Diferente das outras proteases, a atividade de endopeptidase do tipo cisteína (cysteine-type endopeptidase activity) foi encontrada mais expressa nos nematoides provenientes do grupo não tratado, como também conseguimos ver na análise por KEGG.

Na comparação dos resultados das redes, observamos respostas diferentes entre os grupos. Utilizando a plataforma e base de dados StringDB, analisamos como cada proteína se relaciona com as demais. Identificamos que a rede do grupo PES TD é maior e mais complexa do que a rede do PES NTD, apresentando um número maior de proteínas e conexões.

Os clusters das redes identificados estão em coerência com outros resultados obtidos, por exemplo, na rede PES NTD, observamos que o metabolismo de cisteína e metionina (*cysteine and methionine metabolism*) está bem representado, corroborando os dados de ontologia genética, onde essa função também se destacou. Já na rede PES TD, notamos grande expressão da atividade de endopeptidase do tipo serina (*serine-type endopeptidase activity*), alinhada à predominância dessa função nesse grupo. Além disso, a função de dobramento de proteínas (*protein folding*) está bem representada em ambas as redes, sendo expressa de forma significativa nos dois grupos. Proteínas com essa função desempenham um papel crucial ao auxiliar outras proteínas a alcançarem sua conformação tridimensional ideal durante sua formação (Berezovsky *et al.*, 2017). Esse processo é essencial para manter a funcionalidade das proteínas, uma vez que sua atividade biológica está diretamente relacionada à sua estrutura.

Depois de simular os resultados no StringDB, usamos o aplicativo Cytohubba, do programa Cytoscape para realizar três análises: o grau de importância, betweenness e bottleneck. O grau de importância avalia a relevância de uma proteína dentro da rede, sendo assim, um maior grau tem uma maior chance dessas proteínas serem essenciais (Chin, *et al.*, 2014). O betweenness, é uma análise que indica uma proteína como intermediária de interações entre outras proteínas. O bottleneck representa pontos críticos de interação podendo impactar nas vias associadas, o que pode limitar ou regular estas interações proteína-proteína (Yu *et al.*, 2007).

Nas redes de grau de importância, identificamos proteínas semelhantes em ambos os grupos: 14\_3\_3 domain-containing protein, Enolase, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e Vitellogenin domain-containing. E outras proteínas destacadas como importantes também apareceram, porém com menor grau, como: Heat shock protein 70, WAP domain-containing protein em ambos os grupos; e em PES TD: FABP domain-containing protein e Galectina, todas discutidas mais a frente. Sendo a enolase, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 14\_3\_3 domain-containing protein e a Heat Shock 70 proteínas encontradas em outros estudos com rede, como exemplo na pesquisa de Cui *et al.*, 2021, na qual analisa cistos de *Taenia solium*.

Já nas redes analisando o betweenness, em ambos os grupos as proteínas mais expressivas também foram iguais: 14\_3\_3 domain-containing protein, Ubiquitin-like domain-containing protein, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e Vitellogenin domain-containing protein. Esses resultados indicam que, embora a antibioticoterapia tenha uma influência significativa, ela não afetou as atividades metabólicas essenciais do parasito. Isso reforça a relevância em nossos achados, pois há evidências de que a adaptação metabólica do parasito está mais relacionada à sua capacidade de se ajustar a um ambiente alterado do que a um impacto prejudicial direto. Esses dados enfatizam a importância da relação parasito-hospedeiro-microbiota na tricuriase, destacando os mecanismos adaptativos envolvidos.

Nas redes de *bottleneck*, observamos diferenças, mas com semelhanças importantes. As proteínas 14-3-3 domain-containing protein, Ubiquitin-like domain-containing protein, Vitellogenin domain-containing protein e Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apareceram em ambos os grupos entre as cinco com papel mais crítico na rede. Nos dois grupos a HATPase\_c domain-containing protein também estava entre as mais importantes, destacando que apenas no grupo PES TD. a actina esteve presente de maneira expressiva em ambos os grupos. Isso poderia acontecer pois a actina é uma das proteínas mais abundantes em eucariotos,

além de ser uma das proteínas mais que participa de interações entre proteínas (Dominguez e Holmes, 2011).

A proteína 14-3-3 domain-containing protein foi a que teve mais destaque entre todas essas análises. Ela é conhecida por estar envolvida na regulação de diversas vias, podem se quinases, fosfatases e receptores transmembranas (Fu *et al.*, 2000). Os resultados que encontramos indicam que essa proteína desempenha um papel crítico, alinhando-se com as discussões presentes na literatura. Além disso, já foi observado que proteínas com esse domínio podem ser encontradas em vesículas extracelulares de *Trichuris*, reforçando sua importância funcional e a potencial ação em alvos celulares do hospedeiro (Eichenberger *et al.*, 2018).

Os resultados apresentados indicam que as redes de interação proteína-proteína dos grupos PES NTD e PES TD compartilham várias proteínas de alta centralidade, embora apresentem diferenças significativas nas ordens de importância e nas pontuações obtidas. A proteína 14\_3\_3 domain-containing protein se destacou como a mais influente em ambas as redes em múltiplos critérios (grau de importância, betweenness e bottleneck), reforçando seu papel potencialmente crucial nas interações analisadas.

A Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e a Vitellogenin domain-containing protein também já foram descritas em associação com vesículas extracelulares de helmintos como o próprio *Trichuris* (Eichenberger *et al.*, 2018). A Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase desempenha diversos papéis em vias metabólicas, como por exemplo a via glicolítica (White e Garcin, 2017). A Vitellogenin domain-containing protein também é encontrada em outros parasitos e tem sido investigada como um potencial candidata para o desenvolvimento de vacinas (Shears *et al.*, 2018).

A Ubiquitin-like domain-containing protein também está relacionada com a regulação de diversos processos biológicos, como reparação de DNA, transcrição, ciclo celular, dentre outros (Hochstrasser, 2009). A HATPase\_c domain-containing protein está relacionada com o metabolismo de ATP e as histidina quinases, influenciando na transdução de sinais (Capra e Laub, 2012). E por fim, a actina, que é um dos principais componentes do citoesqueleto, influenciando diretamente nos processos de motilidade celular, polaridade e formato da célula, além de estimular a contração muscular e regulação da transcrição (Dominguez e Holmes, 2011).

A consistência no aparecimento dessas proteínas em múltiplos critérios, bem como sua conexão com vesículas extracelulares, sugere que elas desempenham papéis essenciais na resposta do helminto ao ambiente, indicando como são importantes para sua sobrevivência.

Estudos futuros podem explorar as funções biológicas específicas dessas proteínas em cada grupo, bem como investigar seu potencial aplicação no controle de parasitos.

Algumas das proteínas analisadas desempenham papéis fundamentais em diversos processos intracelulares. No contexto extracelular, sua presença nos produtos de excreção e secreção do *T. muris* pode estar associada à renovação da cutícula ou na atividade imunomoduladora, resultando na liberação dessas proteínas no ambiente. No entanto, algumas delas, como enolase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), são classificadas como "moonlighting proteins". Essas proteínas exercem funções primárias essenciais dentro da célula, atuando em vias metabólicas importantes, mas, quando encontradas no meio extracelular, podem assumir funções secundárias distintas (Satala et al., 2020). A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase pode apresentar diversas outras funções além de participar na via glicolítica; como por exemplo, pode atuar como regulação transcricional, transporte de ferro, até mesmo imunomodulação de células B (Singh e Bhalla, 2020). A enolase também além na via glicolítica, mas já foi visto que pode ter ação de adesinas, evasão imune, e outras funções em diferentes espécies de bactérias (Singh e Bhalla, 2020).

Muitas das proteínas encontradas em nosso estudo já foram descritas anteriormente e como já discutido, muitas dessas proteínas possuem uma função de modular o sistema imune do hospedeiro, a função mais estudada dos PES de helmintos (Tritten *et al.*, 2017). Algumas das proteínas encontradas em nossos resultados que possuem essa função, são: galectina (Tritten *et al.*, 2017); Heat Shock (Zininga *et al.*, 2018; Hayon *et al.*, 2021); macrophage migration inhibitory factor (Santos *et al.*, 2013); cystatin domain-containing protein (Caraballo *et al.*, 2021), adenylate kinase isoenzyme 1 (Ionescu, 2019); ShKT domain-containing protein (Mcneilly *et al.*, 2017); Deoxyribonuclease-2-alpha ou DNase II (Cybulska, 2022); phosphoenolpyruvate carboxykinase (Santos *et al.*, 2013), Fructose biphosphate aldolase (Santos *et al.*, 2013), e as SCP domain-containing protein e algumas serpinas, como já citado anteriormente. Dentre essas proteínas, as que mais estavam expressas no grupo PES TD, em comparação com o grupo não tratado, foram: macrophage migration inhibitory factor, cystatin domain-containing protein, adenylate kinase isoenzyme 1, ShKT domain-containing protein, Deoxyribonuclease-2-alpha e SCP domain-containing protein. Por outro lado, a galectina foi encontrada com mais abundância experimental no PES NTD e a Heat Shock 70 se manteve semelhante entre os grupos. Proteínas Heat Shock são conhecidas com atuante em situações de estresse, além de poderem agir como imunomoduladoras (Zininga *et al.*, 2018); e já foi encontrada em diversos outros estudos com produto de excreção e secreção de *Trichuris* (Santos *et al.*, 2013), e ovos não embrionados do parasito (Cruz *et al.*, 2021). O equilíbrio entre os dois

grupos em relação às proteínas Heat Shock traz mais uma evidência de que a resposta do parasito está mais atrelada a alteração do meio do que diretamente na ação do fármaco no parasito.

As nucleases, como a DNase, também podem ter influência na composição da microbiota bacteriana. Sua principal função é degradar moléculas de DNA, reduzindo a ativação exacerbada de células do sistema imune do hospedeiro (Wang et al., 2021). Esse efeito pode favorecer o crescimento bacteriano, uma vez que a menor resposta imune pode permitir a proliferação das bactérias no sítio parasitário.

Por outro lado, as nucleases podem interferir em certas interações bacterianas, especialmente na formação de biofilme. O DNA extracelular desempenha um papel essencial nesse processo, contribuindo para a estrutura, estabilidade e resistência dos biofilmes (Sharma e Rajpurohit, 2024). Dessa forma, a degradação do DNA extracelular pode comprometer a formação e a manutenção dessas comunidades bacterianas.

Diferentes grupos vêm se dedicando ao desenvolvimento de vacinas como estratégia complementar ao combate às helmintíases. Muitas dessas iniciativas tem utilizado proteínas específicas que foram identificadas em nossos resultados nos PES do *T. muris*. Dentre essas proteínas, destacam-se as do tipo WAP (Whey Acidic Protein domain), amplamente expressas em espécies do gênero *Trichuris*, que foi originalmente descrita no leite de mamíferos. Proteína WAP desempenha funções antimicrobianas, regula a atividade de proteases (Li et al., 2013) e possivelmente na imunomodulação, agindo na inibição de proteases, modulação da inflamação e cicatrização principalmente de regiões de mucosas (Wilkinson, et al., 2011; Wainwright e Shears, 2022). Em um dos estudos sobre desenvolvimento de vacinas, a proteína recombinante do tipo WAP, denominada Tm-WAP49, com peso molecular de 49 kDa, foi testada em camundongos e demonstrou resultados promissores, alcançando 48% de proteção contra *T. muris* (Briggs et al., 2018). Além disso, outros grupos estão investigando proteínas com domínio WAP como potenciais candidatas para vacinas (Wainwright e Shears, 2022).

Além dessas proteínas, estudos destacam o fator inibidor de migração de macrófagos (MIF), proteína com propriedades imunomoduladora atuando na inibição da migração de linfócitos para os tecidos (Santos et al., 2013). Trabalhos prévios com *Trichinella spiralis*, nematoide tricurídeo e que também apresenta banda bacilar, mostraram resultados positivos ao testar essa proteína com atividade protetora para infecção, sendo também uma candidata em potencial para o desenvolvimento de vacina (Tang et al., 2011). Nesta mesma linha, outra candidata forte é a fosfatase 2A (PP2A), uma enzima envolvida na digestão e metabolismo de fosfolipídeos; sinalização da transdução e na defesa contra o hospedeiro, possuindo um papel

antimicrobiano, em mamíferos se localiza principalmente nas células de Paneth, no intestino, e nas células de Kupffer no fígado (Mukarami, 1997). Experimentos anteriores testaram a PP2A em *Haemonchus contortus*, nematoide parasito de ruminantes, e também em *Teladorsagia circumcincta*, outro nematoide parasito de caprinos e ovinos. Os resultados foram promissores, sugerindo que a PP2A também pode ser explorada como uma possível candidata para vacinas contra *Trichuris* e outros nematoides (Hayon *et al.*, 2021).

Existem diversos estudos que usam proteínas do produto de excreção e secreção como alvo de vacinas como visto anteriormente. Ao funcionarem como alvos da vacina, muitas dessas proteínas, que são importantes na migração, penetração, reprodução, nutrição e defesa contra o hospedeiro poderiam ser alvos dessas vacinas (Asmaa *et al.*, 2020). Esses são alguns exemplos de proteínas que são essenciais para a sobrevivência dos helmintos, como alvo serão degradadas, impedindo o prosseguimento de seus ciclos de vida.

Os peptídeos de sinal é um termo usado para curtas sequências de peptídeos que ficam na região N-terminal e determinam a via de secreção e o local alvo onde as proteínas exercer sua função (Hajar Owji *et al.*, 2018). Essa análise da presença ou não desse peptídeo permite compreender a relação de determinadas proteínas com vesículas extracelulares, uma vez que, os peptídeos de sinal sugerem que especificamente estas proteínas dos PES estariam atreladas ao processo da secreção por vesículas. As proteínas encontradas em nossos experimentos, e que já foram identificadas em vesículas extracelulares, foram: 14\_3\_3 domain-containing protein, Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Vitellogenin domain-containing protein, SCP domain-containing protein, Heat shock 70, actina, já citadas anteriormente, aminopeptidase, Rab GDP dissociation inhibitor, Intermediate filament protein, Triosephosphate isomerase, Fructose biphosphate aldolase class I.

As aminopeptidases são enzimas que promovem a quebra de aminoácidos da extremidade amino-terminal de diversas proteínas (Taylor, 1993); sendo de extrema importância na digestão, degradação de outras proteínas e regulação de diversas vias. Já a Rab GDP dissociation inhibitor são proteínas que vão promover a regulação de Rab GTPases, estas nas quais são enzimas cruciais para formação correta de vesículas, além de garantirem que cheguem no sítio alvo (Stenmark, 2009). A intermediate filament protein A tem uma função estrutural, participando da composição do citosqueleto (Goldman, 2011). A triosephosphate isomerase e a fructose biphosphate aldolase, desempenham um papel importante na glicólise, sendo essenciais para uma produção eficiente de energia (Helfert *et al.*, 2001; Lorentzen *et al.*, 2005).

As mais abundantes em PES NTD foram: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Heat shock 70, actin, aminopeptidase, Triosephosphate isomerase. Enquanto em PES TD foram: SCP domain-containing protein, 14\_3\_3 domain-containing protein, Vitellogenin domain-containing protein, Heat shock 70, actin, Rab GDP dissociation inhibitor, Intermediate filament protein, Fructose biphosphate aldolase class I. Sendo assim, já que o PES TD apresenta um número maior de proteínas com esses domínios, é possível inferir que a quantidade de vesículas nesse grupo também seja mais elevada, sugerindo uma resposta mais complexa pelo helminto.

Diante disso, a atividade proteica via o direcionamento por vesículas extracelulares é muito mais poderosa em relação ao seu potencial atividade nas células alvo. Sabidamente as glândulas bacilares promovem um contato direto entre o tecido do parasito e as células epiteliais do hospedeiro (Tilney *et. al.*, 2015; Lopes-Torres., 2020) e evidências mostram que vesículas podem estar associadas às glândulas bacilares (Lopes Torres et al., 2013; Lopes-Torres et al., 2020). Associando estes resultados, sugerimos que as aminopeptidases, com sua função de clivar aminoácidos da extremidade amino-terminal de proteínas, desempenham um papel crucial no parasitismo de nematoides do gênero *Trichuris*, contribuindo para a digestão de proteínas do hospedeiro e a modulação do ambiente tecidual durante a penetração e migração tecidual. A presença de Rab GDP dissociation inhibitors, reguladoras de Rab GTPases, é fundamental para a formação e transporte eficaz de vesículas, assegurando a entrega de moléculas essenciais ao sítio alvo no processo de invasão e reorganização tecidual. A intermediate filament protein A, com sua função estrutural no citoesqueleto, pode estar associada à adaptação e estabilidade celular do parasito, permitindo sua integração ao tecido do hospedeiro, na formação e manutenção dos túneis sinciciais. Já a triosephosphate isomerase e a fructose biphosphate aldolase, participantes da glicólise, são essenciais para garantir a produção de energia necessária para sustentar os processos metabólicos envolvidos tanto na invasão, formação dos túneis sinciciais e na imunomodulação promovida pelo parasito. Assim, podemos inferir que as vesículas extracelulares destes parasitos são importantes para os processos de nutrição, produção de energia, imunomodulação e regulação do estresse.

Outras proteínas encontradas possuem papéis de destaque, como por exemplo a protein disulfide isomerase, encontrada em ambos os grupos, que é uma enzima que ajuda na formação/correção de ligações dissulfeto em diversas proteínas, processo importante para que estas se estruturam em sua forma tridimensional e possam realizar suas funções (Cao *et al.*, 2014). Essas proteínas também podem promover uma atividade antioxidante, podendo proteger o nematoide de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelo sistema imune do

hospedeiro, ajudando no estabelecimento do parasitismo (Wang *et al.*, 2021). A Deoxyribonuclease II (DNase II) foi mais expressa no grupo PES TD, essas são enzimas que desempenha um papel importante na permanência dos helmintos no intestino, especialmente a DNase II $\alpha$ , já que sua principal função é de promover a degradação de moléculas de DNA derivadas de células mortas. Ao realizar essa quebra, a DNase II previne respostas pró-inflamatórias excessivas, reduzindo a ativação exacerbada do sistema imunológico do hospedeiro, o que beneficia o parasito a criar um ambiente favorável para sua sobrevivência (Wang *et al.*, 2021).

Outros estudos mostraram que a infecção provocada por *Trichuris* spp. e outros helmintos altera a microbiota do hospedeiro. Este pode ser um impacto em decorrência da atividade dos antígenos intrínsecos ao corpo do parasito, de seus metabólitos e, em especial destaque como consequência da atividade das proteínas presentes nos PES, que já possuem diferentes funções descritas, dentre elas, a atividade antimicrobiana (Abner *et al.*, 2001; Ashour e Othman, 2020; Midha *et al.*, 2018; Beyhan, *et al.*, 2023). Holm, 2015, mostrou que bactérias da microbiota intestinal dos filos Firmicutes, Proteobacteria e Lactobacillaceae aumentam quando há diminuição de Bacteroidetes, e isso foi mostrado na tricuriase murina experimental no período entre o 27° e 35° dias de infecção. Schachter *et al.* 2020, também mostraram ao comparar camundongos infectados com os controles que a microbiota sofre alterações, em destaque às enterobactérias patogênicas, que prevalecem sobre outros grupos, quando o animal está infectado. Os dados destes trabalhos mostram que a presença do *T. muris* causa um desbalanço na microbiota do hospedeiro, diminuindo a diversidade e aumentando a abundância de determinados grupos.

Tendo em vista essas mudanças da microbiota, analisamos como alguns grupos de bactérias se comportavam em contato com o PES, tentando fazer uma associação funcional às proteínas descritas nas análises proteômica. Foram encontradas diversas proteínas com perfis antimicrobianos, dentre elas: galectin (Amstalden, 2022), Fibrinogen C-terminal domain-containing protein (Murakami, *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004), WAP domain-containing protein (Amparyup *et al.*, 2008), já discutida anteriormente, FABP domain-containing protein (Tan *et al.*, 2015), cystatin domain-containing protein (Midha *et al.*, 2018), Lactamase B domain-containing protein (Sulaiman *et al.*, 2022), Saposin B-type domain-containing protein e cysteine proteins (Abner *et al.*, 2001). Embora ambos os grupos tenham apresentado um número semelhante de proteínas, a maioria delas estava mais expressa no grupo PES TD. Esse resultado difere da nossa hipótese inicial, na qual esperávamos maior abundância de proteínas com atividade antimicrobiana no grupo PES NTD, quando a microbiota estaria completamente

estabelecida. Esse padrão também foi observado em proteínas imunomoduladoras, que apresentaram maior abundância nos animais tratados. Isso sugere que o ambiente intestinal alterado pelo tratamento pode ter induzido uma resposta metabólica diferenciada do parasito. Em resposta a essa alteração ambiental, o nematoide parece ter aumentado a produção de determinadas proteínas, possivelmente como um mecanismo compensatório para lidar com o desequilíbrio gerado.

Abner *et al.* (2001) demonstraram que o PES de *T. suis* apresenta propriedades antimicrobianas. Ao realizar experimentos de antibiograma com diversas espécies, incluindo *E. coli*, *S. aureus* e *Campylobacter jejuni*, foi observado que o PES deste parasita possui atividade antimicrobiana, tanto contra bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas. Além disso, a sensibilidade bacteriana ao produto foi proporcional à sua concentração, com *C. jejuni* apresentando a inibição mais significativa. Em nossos resultados de antibiograma não observamos essa atividade. Em nenhuma das bactérias testadas (*S. aureus* ATCC25923 e *E. coli* AB1157) observamos a formação de halos de inibição ao redor dos discos contendo o PES de *T. muris*. Esses achados destacam que é fundamental testar uma maior variedade de espécies bacterianas e utilizar diferentes concentrações de PES, considerando que identificamos proteínas com potencial antimicrobiano, cuja atividade deveria ter sido detectada em nossos experimentos. Destacamos que, quando analisamos os discos do antibiograma por meio de MEV, observamos que a cepa de *S. aureus*, apresentou uma leve alteração em seu comportamento (Figura 11 E-H). As células mostraram uma redução no padrão agregativo, ficando mais dispersas quando em contato com o produto. Esse resultado sugere que, embora o PES não tenha inibido o crescimento bacteriano, ele pode ter interferido na organização ou interação celular, indicando um efeito potencialmente prejudicial para bactéria.

Os resultados da monocamada de células T84 e Caco-2 também demonstraram algumas mudanças de comportamento de algumas bactérias testadas em contato com diferentes concentrações de PES. Na ML, não observamos grandes diferenças na avaliação quantitativa nem qualitativa da distribuição de bactérias na maioria dos grupos quando a estatística foi feita.

Já nos resultados de MEV, observamos algumas mudanças importantes no comportamento das bactérias. A *E. coli* 042 pareceu adquirir características invasivas quando exposta a concentrações elevadas de PES. Já com a cepa *E. coli* Dh5 $\alpha$ , avaliamos que o produto aumentou a quantidade de estruturas filamentosas entre as bactérias, sugerindo um potencial de formação de biofilme sobre monocamada tecidual. Quando em contato com a monocamada de Caco-2, observamos que a *E. coli* 042 também aumentou a quantidade de estruturas filamentosas entre si, sugerindo que seu perfil agregativo foi potencializado. Nas imagens de

*E. coli* Dh5□, não observamos diferença em seu comportamento, com exceção quando está em contato com PES 5 µg/ml onde aparentemente elas começaram um processo de invasão de células. Esses dados corroboram com estudos anteriores, na qual outros grupos identificaram que a infecção por *T. muris*, muda a composição da microbiota do hospedeiro; diminuindo a diversidade, mas aumentando a abundância de alguns grupos bacterianos específicos (Holm *et al.*, 2015).

O tratamento do hospedeiro com antibióticos modificou significativamente sua microbiota intestinal, alterando o ambiente em que o parasito se desenvolve. Em resposta a essas mudanças, o nematoide apresentou uma produção diferenciada de PES, evidenciada pelo aumento na produção, abundância experimental, complexidade e interação de determinadas proteínas. Esse comportamento sugere um mecanismo adaptativo do parasito, possivelmente visando compensar o desequilíbrio gerado no intestino do hospedeiro, garantindo sua sobrevivência e manutenção do parasitismo

## CONCLUSÃO

- a) Os produtos de excreção-secreção (PES) de *Trichuris muris* apresentam composição proteica complexa e pode ser modulada pela composição da microbiota intestinal;
- b) O tratamento com piperacilina sódica + tazobactam não interferiu na produção de proteínas associadas ao metabolismo celular fundamental do parasito, mas aumentou a diversidade/complexidade proteica e a quantidade de proteínas com atividade imunomoduladora e antimicrobiana;
- c) Os PES impactaram na redução do perfil agregativo da *S. aureus* ATCC25923 e alteraram o comportamento das bactérias *E. coli* 042 e *E. coli* Dh5 $\alpha$  em interação com monocamada de células T84 e Caco-2;
- d) A composição da microbiota e a atividade dos PES influenciam no comportamento de bactérias intestinais, ratificando que a fisiopatologia da tricuriase resulta da interação parasito, hospedeiro e microbiota.

Tabelas suplementares:

[https://drive.google.com/drive/folders/1sKu-A18sNTfQYspnoow1EaPTfTAAr2Dq?usp=drive\\_link](https://drive.google.com/drive/folders/1sKu-A18sNTfQYspnoow1EaPTfTAAr2Dq?usp=drive_link)



## REFERÊNCIAS

- ABNER, S.R *et al*, *Trichuris suis*: Detection of Antibacterial Activity in Excretory-Secretory Products from Adults, *Experimental parasitology*, v. 99, n. 1, p. 26–36, 2001.
- ABUZEID, ASMAA M. I. *et al*, Twenty-five-year research progress in hookworm excretory/secretory products, *Parasites & Vectors*, v. 13, n. 1, 2020.
- ACEITUNO-VALENZUELA, U. *et al*. Identification of a type II cystatin in *Fragaria chiloensis*: A proteinase inhibitor differentially regulated during achene development and in response to biotic stress-related stimuli. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 129, p. 158–167, ago. 2018.
- ACHARI, A. *et al*, Glucose - 6 - phosphate isomerase, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 293, n. 1063, p. 145–157, 1981.
- ADAK ; KHAN, Mojibur R, An insight into gut microbiota and its functionalities, *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 76, n. 3, p. 473–493, 2018.
- ADEMA, Coen M, Fibrinogen-Related Proteins (FREPs) in Mollusks, *Results and problems in cell differentiation*, p. 111–129, 2015.
- AHMADI JOUYBARI, Toraj *et al*, Evaluating Effect of Albendazole on *Trichuris trichiura* Infection: A Systematic Review Article, *Iranian journal of parasitology*, v. 11, n. 4, p. 441–447, 2016.
- AMIN, Omar M, Classification of the Acanthocephala, *Folia Parasitologica*, v. 60, n. 4, p. 273–305, 2013.
- AMPARYUP, Piti; DONPUDSA, Suchao ; TASSANAKAJON, Anchalee, Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities, *Developmental & Comparative Immunology*, v. 32, n. 12, p. 1497–1509, 2008.
- AMSTALDEN, Martin Krähenbühl, *Novos aspectos do efeito antibacteriano de galectinas ligantes de lipopolissacarídeo*, 2022.
- ANWAR, Haseeb *et al*, Biodiversity of Gut Microbiota: Impact of Various Host and Environmental Factors, *BioMed Research International*, v. 2021, p. 1–9, 2021.
- ARORA, N. *et al*, *Taenia solium* excretory secretory proteins (ESPs) suppresses TLR4/AKT mediated ROS formation in human macrophages via hsa-miR-125, *PLoS neglected tropical diseases*, v. 17, n. 12, 2023.
- ARUMUGAM, Manimozhiyan *et al*, Enterotypes of the human gut microbiome, *Nature*, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 2011.
- ASHOUR, Dalia S. ; OTHMAN, Ahmad A., Parasite–bacteria interrelationship, *Parasitology Research*, v. 119, n. 10, p. 3145–3164, 2020.

- ASMAA M. I. ABUZEID *et al*, Twenty-five-year research progress in hookworm excretory/secretory products, **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, 2020.
- BÄCKHED, Fredrik. *et al*, Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine, *Science*, v. 307, n. 5717, p. 1915–1920, 2005.
- BANCROFT, Allison J *et al*, Gastrointestinal nematode expulsion in IL-4 knockout mice is IL-13 dependent, *European Journal of Immunology*, v. 30, n. 7, p. 2083–2091, 2000.
- BANCROFT, Allison J *et al*, WSX-1: A Key Role in Induction of Chronic Intestinal Nematode Infection, *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 12, p. 7635–7641, 2004.
- BANCROFT, Allison J. ; GRENCIS, Richard K., Immunoregulatory molecules secreted by *Trichuris muris*, *Parasitology*, v. 148, n. 14, p. 1757–1763, 2021.
- BARDA, Beatrice, Ivermectin and albendazole against *Trichuris trichiura*: a long and winding road, *Lancet. Infectious diseases/The Lancet. Infectious diseases*, v. 22, n. 1, p. 10–12, 2022.
- BARRETO, Hugo C ; GORDO, Isabel, Intrahost evolution of the gut microbiota, *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, n. 9, p. 590–603, 2023.
- BANCROFT, Allison J. ; GRENCIS, Richard K., Immunoregulatory molecules secreted by *Trichuris muris*, *Parasitology*, v. 148, n. 14, p. 1757–1763, 2021.
- BEHNIAFAR, H. *et al*, The global prevalence of *Trichuris trichiura* infection in humans (2010-2023): A systematic review and meta-analysis, *Journal of infection and public health*, v. 17, n. 5, 2023. BEREZOVSKY, Igor N.; GUARNERA, Enrico ; ZHENG, Zejun, Basic units of protein structure, folding, and function, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 128, p. 85–99, 2017.
- BEYHAN, Yunus E. ; YILDIZ, Muhammed R., Microbiota and parasite relationship, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 106, n. 4, p. 115954, 2023.
- BIBBÒ S; IANIRO G; GIORGIO V; SCALDAFERRI F; MASUCCI L; GASBARRINI A; CAMMAROTA G, The role of diet on gut microbiota composition, *European review for medical and pharmacological sciences*, v. 20, n. 22, 2016.
- BLAXTER, MARK ; KOUTSOVOULOS, GEORGIOS, The evolution of parasitism in Nematoda, *Parasitology*, v. 142, n. Suppl 1, p. S26–S39, 2015.
- BLOUIN, Michael S; LIU, Jie ; BERRY, Ralph E, Life cycle variation and the genetic structure of nematode populations, *Heredity*, v. 83, n. 3, p. 253–259, 1999.
- Brasil Saudável. Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/brasil-saudavel>>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- BRIGGS, Neima *et al*, *Trichuris muris* whey acidic protein induces type 2 protective immunity against whipworm, *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 8, p. e1007273–e1007273, 2018.
- CAFFREY, Conor R *et al*, Cysteine proteases as digestive enzymes in parasitic helminths, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 8, p. e0005840–e0005840, 2018.

- CAO, Xiaodan *et al*, Cloning, expression and characterization of protein disulfide isomerase of *Schistosoma japonicum*, *Experimental Parasitology*, v. 146, p. 43–51, 2014.
- CAPRA, Emily J ; LAUB, Michael T, Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems, *Annual Review of Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 325–347, 2012.
- CASTAÑEDA, Sergio *et al*, Characterizing Excretory-Secretory Products Proteome Across Larval Development Stages in *Ascaris suum*, *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory), 2024.
- CARABALLO, Luis; ZAKZUK, Josefina; ACEVEDO, Nathalie, Helminth- derived cystatins: the immunomodulatory properties of an *Ascaris lumbricoides* cystatin, *Parasitology*, v. 148, n. 14, p. 1744–1756, 2021.
- CHAI, Ying-Mei *et al*, A novel protein with a fibrinogen-like domain involved in the innate immune response of *Marsupenaeus japonicus*, *Fish & Shellfish Immunology*, v. 32, n. 2, p. 307–315, 2011.
- CHAPMAN, Social Behaviours and Networks of Vervet Monkeys Are Influenced by Gastrointestinal Parasites, *PloS one*, v. 11, n. 8, 2016.
- CHANNAVEERAPPA, D.; NGOUNOU, Armand G ; DARIE, Costel C, Bottlenecks in Proteomics: An Update, *Advances in experimental medicine and biology*, p. 753–769, 2019.
- CHIN, Chia-Hao *et al*, cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome, *BMC Systems Biology*, v. 8, n. S4, 2014.
- COLLINS, James J, Platyhelminthes, *Current Biology*, v. 27, n. 7, p. R252–R256, 2017.
- COSTA, Tathiane de Oliveira Alves. *Antibioticoterapia em associação com anti-helmíntico na tricuriase experimental em fase crônica*. 2023. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.
- CRUZ, Katalina *et al*, *Trichuris trichiura* egg extract proteome reveals potential diagnostic targets and immunomodulators, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 3, p. e0009221, 2021a.
- CRUZ, Katalina *et al*, Case report: Control of intestinal nematodes in captive *Chlorocebus sabaeus*., *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 2021b.
- CUI, Yaxuan *et al*, Proteomic Analysis of *Taenia solium* Cyst Fluid by Shotgun LC-MS/MS, *Journal of Parasitology*, v. 107, n. 5, 2021.
- CUTILLAS, C. *et al*, *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species, *Acta Tropica*, v. 111, n. 3, p. 299–307, 2009.
- CYBULSKA, A. Immunoproteomic Analysis of *Trichinella britovi* Proteins Recognized by IgG Antibodies from Meat Juice of Carnivores Naturally Infected with *T. britovi*, *Pathogens*, v. 11, n. 10, p. 1155–1155, 2022.

DARLAN D. M. *et al*; I, Overview of Immunological Responses and Immunomodulation Properties of *Trichuris* sp.: Prospects for Better Understanding Human Trichuriasis, *Life*, v. 11, n. 3, p. 188–188, 2021.

DIAS, Yan Emygdio *et al*, Three-Dimensional Models of Soil-Transmitted Helminth Eggs from Light Microscopy Images, *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 7, n. 9, p. 216–216, 2022.

DOMINGUEZ, Roberto ; HOLMES, Kenneth C., Actin Structure and Function, *Annual Review of Biophysics*, v. 40, n. 1, p. 169–186, 2011.

DUQUE-CORREA, María A *et al*, Defining the early stages of intestinal colonisation by whipworms, *Nature Communications*, v. 13, n. 1, 2022.

EBNER, F *et al*, Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease, *Allergy*, v. 69, n. 11, p. 1489–1497, 2014.

EICHENBERGER, R. M. *et al*. Characterization of *Trichuris muris* secreted proteins and extracellular vesicles provides new insights into host–parasite communication. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 7, n. 1, p. 1428004, 21 jan. 2018.

EMIDIO, N. B. *et al*. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações, *HU Revista*, v. 41, n. 3 e 4, 2015.

E.J. LOPES-TORRES *et al*, On the structural organization of the bacillary band of *Trichuris muris* under cryopreparation protocols and three-dimensional electron microscopy, *Journal of structural biology*, v. 212, n. 2, p. 107611–107611, 2020.

ELSE, K ; WAKELIN, D, Genetic variation in the humoral immune responses of mice to the nematode *Trichuris muris*, *Parasite Immunology*, v. 11, n. 1, p. 77–90, 1989.

ELSE, K.J.; HÜLTNER, L. ; GRENCIS, R.K., Modulation of cytokine production and response phenotypes in murine trichuriasis, *Parasite Immunology*, v. 14, n. 4, p. 441–449, 1992.

ELSE, Kathryn J *et al*, Whipworm and roundworm infections, *Nature reviews. Disease primers*, v. 6, n. 1, 2020.

FORMAN, Ruth *et al*, Un-“Egg”-Plored: Characterisation of Embryonation in the Whipworm Model Organism *Trichuris muris*, *Frontiers in Tropical Diseases*, v. 2, 2021.

FU, H *et al*, 14-3-3 Proteins: Structure, function, and regulation, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2000.

GALLAGHER, Christa A *et al*, Should monkeys wash their hands and feet: A pilot-study on sources of zoonotic parasite exposure., *One Health*, v. 7, p. 100088–100088, 2019.

GOLDSTEIN, Bob, On the evolution of early development in the Nematoda, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 356, n. 1414, p. 1521–1531, 2001.

GOLDMAN, Robert D *et al*, Inroads into the structure and function of intermediate filament networks, *Journal of Structural Biology*, v. 177, n. 1, p. 14–23, 2011.

HAJAR OWJI *et al*, A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications, *European Journal of Cell Biology*, v. 97, n. 6, p. 422–441, 2018.

HANINGTON, Patrick C ; ZHANG, Si-Ming, The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation, *Journal of Innate Immunity*, v. 3, n. 1, p. 17–27, 2010.

HANSEN, Tina V.A *et al*, Uptake of benzimidazoles by *Trichuris suis* in vivo in pigs, *International Journal for Parasitology Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 2, p. 112–117, 2014.

HANSEN, T. *et al*, Glucose Absorption by the Bacillary Band of *Trichuris muris*, *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 9, p. e0004971–e0004971, 2016.

HASNAIN, Sumaira Z *et al*, Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes, *The Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 5, p. 893–900, 2011.

HASNAIN, Sumaira Z *et al*, Serine Protease(s) Secreted by the Nematode *Trichuris muris* Degrade the Mucus Barrier, *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*, v. 6, n. 10, p. e1856–e1856, 2012.

HARNETT, William, Secretory products of helminth parasites as immunomodulators, *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 195, n. 2, p. 130–136, 2014.

HAYES, K. S. *et al*. Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris*, 2010.

HAYON, Jesica *et al*, Advances in vaccine development for human trichuriasis, *Parasitology*, v. 148, n. 14, p. 1783–1794, 2021.

HELFERT, Sandra *et al*, Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*, *Biochemical Journal*, v. 357, n. 1, p. 117–117, 2001.

HENDERSON, Colin J. *et al*, Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function, *Chemico-Biological Interactions*, v. 111-112, p. 69–82, 1998.

HOCHSTRASSER, Mark, Origin and function of ubiquitin-like proteins, *Nature*, v. 458, n. 7237, p. 422–429, 2009.

HOLM, J. B. *et al*, Chronic *Trichuris muris* Infection Decreases Diversity of the Intestinal Microbiota and Concomitantly Increases the Abundance of Lactobacilli, *PLOS ONE*, v. 10, n. 5, p. e0125495–e0125495, 2015.

HURST, Rebecca J. M.; Else, Kathryn J. *Trichuris muris* research revisited: a journey through time, *Parasitology*, v. 140, n. 11, p. 1325–1339, 2013.

INATOMI, S. Submicroscopic structure of the egg shell of helminth. A study on *Trichuris vulpis*. *Acta Med.*, v. 14, n. 4, p. 257–260, 1960.

IONESCU, Mihaela Ileana, Adenylate Kinase: A Ubiquitous Enzyme Correlated with Medical Conditions, *The Protein Journal*, v. 38, n. 2, p. 120–133, 2019.

JENKINS, Simon N ; WAKELIN, D, The source and nature of some functional antigens of *Trichuris muris*, *Parasitology*, v. 74, n. 2, p. 153–161, 1977.

JOURDAN, P. M. *et al*, Soil-transmitted helminth infections, *The Lancet*, v. 391, n. 10117, p. 252–265, 2018.

KATZ, Naftale, Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses, *Fiocruz.br*, 2018.

KAZEMNEZHAD S *et al*, Class-Pi Of Glutathione S-Transferases, *Www.sid.ir*, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2006.

KETZIS, Jennifer K; VERMA, Ashutosh ; BURGESS, Graham, Molecular characterization of *Trichuris serrata*, *Parasitology Research*, v. 114, n. 5, p. 1993–1995, 2015.

KLEMENTOWICZ, T. E; TRAVIS, M. A; GRENCIS, R. K. *Trichuris muris*: a model of gastrointestinal parasite infection, 2012.

KNOX, D P, Proteinase inhibitors and helminth parasite infection, *Parasite Immunology*, v. 29, n. 2, p. 57–71, 2006.

LAW, Hannah L. *et al*, A Pro-resolving Role for Galectin-1 in Acute Inflammation, *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, 2020.

LEROUX, Louis-Philippe *et al*, Analysis of the *Trichuris suis* excretory/secretory proteins as a function of life cycle stage and their immunomodulatory properties, *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 2018.

LI, Shuang *et al*, A Double WAP Domain-Containing Protein Es-DWD1 from *Eriocheir sinensis* Exhibits Antimicrobial and Proteinase Inhibitory Activities, *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. e73563–e73563, 2013.

LILLYWHITE, J E *et al*, Identification and characterization of excreted/secreted products of *Trichuris trichiura*, *Parasite Immunology*, v. 17, n. 1, p. 47–54, 1995.

LIMA, L. R. Caracterização morfológica, ultraestrutural e modelagem 3D de ovos embrionados de *Trichuris muris*. 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019. Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres.

LITTLEWOOD, D.T.J., Platyhelminth systematics and the emergence of new characters, *Parasite*, v. 15, n. 3, p. 333–341, 2008.

- LORENTZEN, Esben *et al*, Mechanism of the Schiff Base Forming Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase: Structural Analysis of Reaction Intermediates, *Biochemistry*, v. 44, n. 11, p. 4222–4229, 2005.
- LOUKAS, Alex *et al*, Hookworm infection, *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, n. 1, 2016.
- LUNA ; ROBERTO, O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas, *Cadernos de Saúde Pública*, v. 36, n. suppl 2, 2020.
- LÝSEK, H.; MALÍNSKÝ, J.; JANISCH, R. Ultrastructure of eggs of *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758. I. Egg-shells. *Folia parasitologica*, v. 32, n. 4, p. 381–384, 1985.
- MAIR, Iris; ELSE, Kathryn J. ; FORMAN, Ruth, *Trichuris muris* as a tool for holistic discovery research: from translational research to environmental bio-tagging, *Parasitology*, v. 148, n. 14, p. 1722–1734, 2021.
- MCKERROW, James H *et al*, PROTEASES IN PARASITIC DISEASES, *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, v. 1, n. 1, p. 497–536, 2006.
- MCNEILLY, Tom N *et al*, Niche-specific gene expression in a parasitic nematode; increased expression of immunomodulators in *Teladorsagia circumcincta* larvae derived from host mucosa, *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 2017.
- MIDHA, Ankur *et al*, The Intestinal Roundworm *Ascaris suum* Releases Antimicrobial Factors Which Interfere With Bacterial Growth and Biofilm Formation, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle de geohelmintíases, [s.l.: s.n., s.d.], 2012.
- MOLEHIN, ADEBAYO J; GOBERT, GEOFFREY N ; MCMANUS, DONALD P, Serine protease inhibitors of parasitic helminths, *Parasitology*, v. 139, n. 6, p. 681–695, 2012.
- MONTANER, Sergio *et al*, The Role of Extracellular Vesicles in Modulating the Host Immune Response during Parasitic Infections, *Frontiers in Immunology*, v. 5, 2014.
- MOSER, Wendelin; SCHINDLER, Christian; KEISER, Jennifer, Efficacy of recommended drugs against soil transmitted helminths: systematic review and network meta-analysis, *BMJ. British medical journal*, p. j4307–j4307, 2017.
- MOORTHY, Vasee S; GOOD, Michael F ; ADRIAN VS HILL, Malaria vaccine developments, *Lancet*, v. 363, n. 9403, p. 150–156, 2004.
- MORANTE, Taylor *et al*, Revisiting the *Ancylostoma Caninum* Secretome Provides New Information on Hookworm–Host Interactions, *PROTEOMICS*, v. 17, n. 23-24, 2017.
- MOURÃO, M. M. Análise de Transcritos Produzidos por Trans-splicing em *Schistosoma mansoni*. Universidade Federal de Minas Gerais. Orientadora: Glória Regina Franco Agosto de 2005, [s.l.: s.n., s.d.].

- MURAKAMI, Makoto *et al*, Regulatory Functions of Phospholipase A2, Critical Reviews™ in Immunology, v. 17, n. 3-4, p. 225–283, 1997.
- MURAKAMI, Makoto *et al.*, Regulatory Functions of Phospholipase A2, 2017.
- MURAKAMI, Makoto, The phospholipase A2 superfamily as a central hub of bioactive lipids and beyond, Pharmacology & Therapeutics, v. 244, p. 108382–108382, 2023.
- NCBI; Taxonomy. Taxonomy browser (Nematoda). Nih.gov. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=6231&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>>. Acesso em: 13 fev. 2025.
- NEAR, Thomas J; GAREY, James R ; NADLER, Steven A, Phylogenetic Relationships of the Acanthocephala Inferred from 18S Ribosomal DNA Sequences, Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 10, n. 3, p. 287–298, 1998.
- NEVES, DP. Parasitologia Humana, 11<sup>a</sup> ed, São Paulo, Atheneu, 2005.
- NICHOLAS, W.L, The Biology of the Acanthocephala, Advances in Parasitology/Advances in parasitology, p. 671–706, 1973.
- ONO, Kenji *et al*, Secretion of signal peptides via extracellular vesicles, Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 560, p. 21–26, 2021.
- REDDY, Aditya ; FRIED, Bernard, The use of *Trichuris suis* and other helminth therapies to treat Crohn's disease, Parasitology research, v. 100, n. 5, p. 921–927, 2007.
- RHOADS, Marcia L; FETTERER, Raymond H ; HILL, Dolores E, *Trichuris suis*: A Secretary Serine Protease Inhibitor, Experimental Parasitology, v. 94, n. 1, p. 1–7, 2000a.
- RHOADS, M.L *et al*, *Trichuris suis*: A Secretary Chymotrypsin/Elastase Inhibitor with Potential as an Immunomodulator, Experimental Parasitology, v. 95, n. 1, p. 36–44, 2000b.
- ROBERTSON, Amicha *et al*, Bacterial contact induces polar plug disintegration to mediate whipworm egg hatching, bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory), 2023.
- ROBERTS L. S. Foundations of Parasitology 9th Edition, Editorial Reviews McGrawhill, 688 pages, 2013.
- RUTHERFORD, S T ; BASSLER, B L, Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 2, n. 11, p. a012427–a012427, 2012.
- SADJJADI, Fatemeh Sadat *et al*, Proteomics investigation of human sera for determination of postoperative indicators of pulmonary cystic echinococcosis, Journal of Cardiothoracic Surgery, v. 18, n. 1, 2023.
- SANTOS, Leonardo N *et al*, A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects, Parasite Immunology, v. 35, n. 5-6, p. 188–193, 2013.

SATALA, Dorota *et al*, Moonlighting Proteins at the Candidal Cell Surface, *Microorganisms*, v. 8, n. 7, p. 1046–1046, 2020.

SCHACHTER, J; OLIVEIRA, D.A. *et al*. Whipworm Infection Promotes Bacterial Invasion, Intestinal Microbiota Imbalance, and Cellular Immunomodulation, 2020.

SHARMA, Dhirendra Kumar ; YOGENDRA SINGH RAJPUROHIT, Multitasking functions of bacterial extracellular DNA in biofilms, *Journal of Bacteriology*, v. 206, n. 4, 2024.

SHEARS, R K *et al*, Extracellular vesicles induce protective immunity against *Trichuris muris*, *Parasite Immunology*, v. 40, n. 7, 2018.

SILVA, A. C. da. A influência da antibioticoterapia na tricuriase em fase crônica. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019. Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres.

SINGH, Nadia ; BHALLA, Needhi, Moonlighting Proteins, *Annual Review of Genetics*, v. 54, n. 1, p. 265–285, 2020.

SMITH, Valerie J *et al*, Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans, *Developmental & Comparative Immunology*, v. 32, n. 7, p. 758–772, 2008.

SPECHT, Sabine ; KEISER, Jennifer, Helminth infections: Enabling the World Health Organization Road Map, *International journal for parasitology/International Journal for Parasitology*, v. 53, n. 8, p. 411–414, 2023.

STENMARK, H. Rab GTPases as Coordinators of Vesicle Traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 513-525, 2009

STIPANUK, Martha H, SULFUR AMINO ACID METABOLISM: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine, *Annual Review of Nutrition*, v. 24, n. 1, p. 539–577, 2004.

SULAIMAN, Jordy Evan *et al*, Proteome profiling of evolved methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with distinct daptomycin tolerance and resistance phenotypes, *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.

SUN, G Y. *et al.*, Phospholipases A2 and Inflammatory Responses in the Central Nervous System, *Neuromolecular Med*, 2009.

SZKLARCZYK, Damian *et al*, The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets, *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D605–D612, 2020.

TAN, Shang-Jian *et al*, Fatty acid binding protein FABP3 from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* participates in antimicrobial responses, *Fish & Shellfish Immunology*, v. 43, n. 1, p. 264–274, 2015.

TANG, F *et al*, Evaluation of the immune response induced by DNA vaccines expressing MIF and MCD-1 genes of *Trichinella spiralis* in BALB/c mice, *Journal of Helminthology*, v. 86, n. 4, p. 430–439, 2011.

TANNOCK, Gerald W *et al*, Ecological behavior of *Lactobacillus reuteri* 100-23 is affected by mutation of the luxS gene, *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8419–25, 2005.

TAYLOR, Allen, Aminopeptidases: structure and function, *The FASEB Journal*, v. 7, n. 2, p. 290–298, 1993.

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

TORRES, E. J. L.; SOUZA, W. de; MIRANDA, K. Comparative analysis of *Trichuris muris* surface using conventional, low vacuum, environmental and field emission scanning electron microscopy. *Veterinary Parasitology*, v. 196, p. 409-416, 2013.

TRAVERSA, Donato, Are we paying too much attention to cardio-pulmonary nematodes and neglecting old-fashioned worms like *Trichuris vulpis*?, *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 1, 2011.

TRITTEN, L. *et al*. Excretory/secretory products from the gastrointestinal nematode *Trichuris muris*, 2017.

WAINWRIGHT, Eleanor ; SHEARS, Rebecca K, *Trichuris* WAP and CAP proteins: Potential whipworm vaccine candidates?, *PLoS neglected tropical diseases*, v. 16, n. 12, p. e0010933–e0010933, 2022.

WANG, X *et al*, A novel lectin with a fibrinogen- like domain and its potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus* against bacteria, *Insect Molecular Biology*, v. 13, n. 3, p. 273–282, 2004.

WANG, Jianbin; DAVIS, Richard E, *Ascaris*, *Current Biology*, v. 30, n. 10, p. R423–R425, 2020.

WANG, Yang *et al*, Comparative analysis of excretory–secretory products of muscle larvae of three isolates of *Trichinella pseudospiralis* by the iTRAQ method, *Veterinary parasitology*, v. 297, p. 109119–109119, 2021.

WANGCHUK, P. *et al*, Metabolomic profiling of the excretory–secretory products of hookworm and whipworm, *Metabolomics*, v. 15, n. 7, 2019.

WHO, Neglected tropical diseases, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>. Acesso em: 09 set. 2024.

WHO, Ending NTDs together towards 2030. Disponível em: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/ending-ntds-together-towards-2030>>. Acesso em: 10 set. 2024.

- WHO, Global report on neglected tropical diseases 2024. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/global-report-on-neglected-tropical-diseases-2024>>. Acesso em: 10 set. 2024.
- WHITE, Michael R ; GARCIN, Elsa D, D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Structure and Function, Sub-cellular biochemistry/Subcellular biochemistry, p. 413–453, 2017.
- WILKINSON, Thomas S *et al*, WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity, *Biochemical Society Transactions*, v. 39, n. 5, p. 1409–1415, 2011.
- WRIGHT, K.A, Cuticular inflations in whipworms, *Trichuris* spp., *International Journal for Parasitology*, v. 5, n. 4, p. 461–463, 1975.
- YAMASHITA, M M *et al*, Where metal ions bind in proteins., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, n. 15, p. 5648–5652, 1990.
- YAO, Chaoqun *et al*, Molecular species identification of *Trichuris trichiura* in African green monkey on St. Kitts, West Indies, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 2018.
- YOUSEFI, Yeganeh *et al*, *Trichuris muris* Model: Role in Understanding Intestinal Immune Response, Inflammation and Host Defense, *Pathogens*, v. 10, n. 8, p. 925–925, 2021.
- YU, Haiyuan *et al*, The Importance of Bottlenecks in Protein Networks: Correlation with Gene Essentiality and Expression Dynamics, *PLoS Computational Biology*, v. 3, n. 4, p. e59, 2007.
- ZAFAR H;SAIER MH, Gut Bacteroides species in health and disease, *Gut microbes*, v. 13, n. 1, 2021.
- ZAMAN V, Scanning electron microscopy of *Trichuris trichiura* (Nematoda), *Acta tropica*, v. 41, n. 3, 2021.
- ZAKERI, Amin *et al*, Parasite worm antigens instruct macrophages to release immunoregulatory extracellular vesicles, *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 10, n. 10, 2021.
- ZAVALA, Fidel, RTS,S: the first malaria vaccine, *The Journal of clinical investigation/The journal of clinical investigation*, v. 132, n. 1, 2022.
- ZININGA, Tawanda; LEOGANG RAMATSUI ; ADDMORE SHONHAI, Heat Shock Proteins as Immunomodulators, *Molecules*, v. 23, n. 11, p. 2846–2846, 2018.
- ZMORA, Niv; SUEZ, Jotham ; ELINAV, Eran, You are what you eat: diet, health and the gut microbiota, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 16, n. 1, p. 35–56, 2019.
- ZOU, Yuelian *et al*, Identification and diversity of fibrinogen-related protein (FREP) gene family in *Haliotis discus hannai*, *H. rufescens*, and *H. laevigata* and their responses to *Vibrio parahemolyticus* infection, *Fish & Shellfish Immunology*, v. 119, p. 613–622, 2021.