



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

CLÊNIO SILVA CRUZ

**ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DO *Bacillus clausii* (O/C, N/R,
T e SIN) SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL**

Recife

2020

CLÊNIO SILVA CRUZ

ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DO *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa

Co-orientador: Prof. Dr. André de Lima Aires

Recife

2020

Catálogo na fonte:
bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

C957e Cruz, Clênio Silva
Estudo do potencial imunomodulatório do *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) sobre a Esquistossomose mansoni experimental / Clênio Silva Cruz. – 2020.
92 f.; il.

Orientadora: Vláudia Maria Assis Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas - CCM. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.
Inclui referências e anexo.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Esquistossomose. 3. Probióticos. 4. *Bacillus clausii*. 5. Imunomodulação. I. Costa, Vláudia Maria Assis (orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2020 - 108)

CLÊNIO SILVA DA CRUZ

ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DO *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 19/02/2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Virgínia Maria Barros de Lorena (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico esta dissertação a Sebastiana, Antônio, Aparecida, Lucicleide, Monalisa e Reniê. Amo vocês incondicionalmente

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos da minha família (pais, irmãos e sobrinhos) a quais dedico essa vitória e esse sonho. Obrigado por todo o carinho, amor, cuidados e ensinamentos. Como filho/irmão caçula, vocês me transformaram em quem eu sou hoje. Serei eternamente grato por tudo que vocês fizeram e têm feito por mim.

A meus amigos, em especial Jéssica, Marina, Iris e Paulo. Obrigado por terem compartilhado comigo momentos inesquecíveis e suportado meus dramas e minha chatice. A vida é mais colorida e leve com vocês.

A meus orientadores, Prof. André, Prof. Mônica, Prof. Eulália e Prof. Vláudia. Obrigado por acreditar e confiar esse trabalho a mim. Vocês despertaram meu amor pela pesquisa experimental. Vocês são profissionais incríveis, pessoas sensacionais e exemplos de vida.

Um agradecimento especialmente ao meu orientador, coorientador e AMIGO, André Aires. Sem palavras para explicar o quanto sou grato por todas as dicas, horas investidas em mim, risadas, paciência e encorajamentos. Uma honra compartilhar a graduação e o mestrado contigo.

A todos colegas e amigos do setor de Imunologia e Fármacos Antiparasitários do LIKA. Douglas, Lucas, Paulo, Victor, Hianna, João Victor, Wilza, Renan, Gabriela, Raul e Maria. Obrigado por toda ajuda nos experimentos que deram certo e nos que deram errado, por todos materiais e dicas compartilhados e pelos momentos descontraídos que passamos por compartilhar por tanto tempo o mesmo ambiente de trabalho. Vocês são incríveis!

As meninas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos, Prof. Eulália, Wilma e Marina Luizy, pela paciência, dicas e ajuda. Vocês foram fundamentais na execução desse trabalho.

Ao Sr. Hamilton e Dra. Hellena pela ajuda extremamente importante com os camundongos no biotério.

A professora Dr. Virginia Lorena, por toda ajuda com a citometria de fluxo.

A Sidcley e Romildo do Setor de Anatomia Patológica do HC, pela confecção das lâminas histopatológicas e aos professores Dra. Luciana Maria do departamento de Histologia e Embriologia e Dr. Mário Ribeiro do departamento de Patologia, pelas dicas e ajuda com a interpretação dos resultados histopatológicos.

Aos colegas da pós-graduação, em especial Carol, Sérgio e Milena.

A João Lucas pela ajuda com as tabelas do Excel.

A banca, pela disponibilidade de tempo para avaliação.

A todos os licenciados, bacharéis, mestres e doutores que foram meus professores desde o ensino fundamental.

A universidade Federal de Pernambuco, ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e ao CNPq, pela estrutura e fomento.

RESUMO

Estudos experimentais e clínicos tem demonstrado que diversos probióticos, incluindo o *Bacillus clausii*, apresentam potencial para prevenção e tratamento de parasitoses e capacidade de modulação das respostas imunes. Este estudo teve como objetivo avaliar o sobrenadante livre de células (SLC) de *B. clausii* sobre *Schistosoma mansoni* *in vitro* e o potencial de esporos de *B. clausii* de modular a resposta imune esquistossomose mansoni. Para avaliação *in vitro*, vermes foram incubados com SLC de *B. clausii* e monitorados por 5 dias consecutivos para avaliação da mortalidade e motilidade. Para avaliação *in vivo*, camundongos foram separados em cinco grupos (G1: não infectados e não tratados com esporos de *B. clausii*, G2: não infectados e tratados, G3: infectados e não tratados, G4: infectados e tratados antes da exposição cercariana e G5: infectados e tratados no início da ovoposição), para determinação da carga parasitária, ovos liberados com as fezes e retidos no fígado e no intestino, padrão de ovoposição, frequência de células TCD4+Foxp3+ e TCD4+IL17+ e concentração de citocinas Th1/Th2/Th17. Nossos resultados *in vitro* demonstraram o SLC de *B. clausii* não causou mortalidade nem alterou movimento de vermes *S. mansoni*. Quanto aos resultados *in vivo*, a administração esporos de *B. clausii* foi capaz de reduzir a carga de vermes total em 41.5% no grupo G4 e em 30.1% de vermes total no grupo G5. O tratamento com *B. clausii* reduziu significativamente o número de ovos liberados com as fezes em 68,7% no grupo G4 e 44,3% no grupo G5 e a carga de ovos depositados no intestino de animais do grupo G4 em 50,4%. *B. clausii* diminuiu os níveis de IL-4 no grupo G4 e aumentou no grupo G5. Foi visto aumento de IL-10 nos que grupos G4 e G5. *B. clausii* reduziu níveis de IFN- γ , TNF e IL-6 nos grupos G4 e G5. Os níveis de IL-17 foram significativamente maiores no grupo G4 e G5. *B. clausii* aumentou a frequência de células CD4+Foxp3+ nos animais dos grupos G2 e G4. Células CD4+IL17+, demonstrou-se aumento na frequência dessas células nos animais dos grupos G2, G4 e G5.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose. Probióticos. *Bacillus clausii*. Imunomodulação.

ABSTRACT

Experimental and clinical studies have shown that probiotics, including *Bacillus clausii*, have potential for the prevention and treatment of parasitosis and the ability to modulate immune responses. This study aimed to evaluate the cell-free culture supernatant (CFC) of *B. clausii* against *S. mansoni* *in vitro* and the potential of *B. clausii* spores to modulate the systemic immune response in experimental schistosomiasis. Our results showed that *in vitro*, CFS of *B. clausii* does not cause mortality nor movement change in *S. mansoni* adult worms. *In vivo*, *B. clausii* spores reduced the total worm burden in 41.5 and 30.1% and female worms in 43.1 and 39.1%, when administrated before cercarial exposure or in the onset of oviposition, respectively. Furthermore, in both therapeutic schemes, *B. clausii* spores reduced the load of eggs in the liver and intestine and eliminated with the feces. *B. clausii* decreased IL-4 levels in the G4 group and increased in the G5 group. An increase in IL-10 was seen in groups G4 and G5. *B. clausii* reduced levels of IFN- γ , TNF and IL-6 in groups G4 and G5. IL-17 levels were significantly higher in the G4 and G5 groups. *B. clausii* increased the frequency of CD4 + Foxp3 + cells in animals in groups G2 and G4. CD4 + IL17 + cells, an increase in the frequency of these cells was shown in animals in groups G2, G4 and G5. The present results demonstrate that administration of *B. clausii* spores favorably modulate parasitological parameters and the production of Th1/Th2/Th17 cytokines as well as the frequency of CD4+Foxp3+ T cells in experimental schistosomiasis mansoni.

Keywords: Schistosomiasis. *Schistosoma mansoni*. Probiotic. *Bacillus clausii*. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da esquistossomose no mundo.....	16
Figura 2 - Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de positividade por município. Brasil, 2010-2015.....	17
Figura 3 - Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	19
Figura 4 - Microbiota intestinal em adultos saudáveis.....	26
Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de ação exercidos pelos probióticos.....	29
Figura 6 - Formação dos grupos experimentais e esquema de tratamento.....	38
Figura 7 - Aquisição e análise de Linfócitos T CD4+ (A), CD4+IL17+ (B) e CD4+FoxP3+ (C).....	41

ARTIGO 1

Figura 1 - Efeito do tratamento com <i>Bacillus clausii</i> (10^9 UFC/ml) em diferentes esquemas terapêuticos (G4 e G5) sobre a carga parasitária (A), número de ovos presos no tecido hepático e intestinal (B), padrão de ovoposição (C) e ovos excretados nas fezes (D) de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> . ns resultado não significativo. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, ## $p < 0.002$, ### $p < 0.0002$, quando comparado com o grupo G3.....	51
--	----

ARTIGO 2

Figura 1 - Níveis de citocinas IL-4 (A) e IL-10 (B) de cultura de células esplênicas estimulados com esporos de <i>Bacillus clausii</i> ou Conavalina A (ConA), de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de <i>Bacillus clausii</i> (G2), camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> não	
--	--

tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ns = não significativo..... 68

Figura 2 - Níveis de citocinas IFN- γ (A), TNF (B), IL-17 (C) e IL-6 (D) de cultura de células esplênicas, estimulados com esporos de *Bacillus clausii* ou Concanavalina A (ConA), de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. *p<0.05, **0.005<X, ns = não significativo..... 69

Figura 3 - Frequência de células CD4+Foxp3+ (A) e células CD4+IL17+ (B) em cultura de células esplênicas, estimulados com esporos de *Bacillus clausii* ou Concanavalina A (ConA), e razão entre células Treg/Th17 (C) de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. Valores considerados significativos quando. *p<0.05, ns = não significativo..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>aaMφ</i>	Macrófagos Alternativamente Ativados
<i>Arg-1</i>	Arginase 1
<i>AST</i>	Alanina-Aspartato Transferase
<i>CBA</i>	Cytometric Bead Array
<i>CDC</i>	Centro De Controle E Prevenções De Doenças
<i>DALY</i>	Esperaça De Vida Corrigida Pela Incapacidade
<i>DC</i>	Células Dendríticas
<i>DC-SIGN</i>	Receptor De Lectina Tipo C
<i>Foxp3</i>	Forkhead Box P3
<i>G-CSF</i>	Fator Estimulador De Colônias Granulocitárias
<i>GM-CSF</i>	Fator Estimulador De Colônias De Macrófagos E Granulócitos
<i>ICAM</i>	Molécula De Adesão Intracelular 1
<i>IFN</i>	Interferon
<i>Ig</i>	Imunoglobulina
<i>IL</i>	Interleucina
<i>IPM</i>	Impulsos Por Minuto
<i>iTreg</i>	Células T Regulatórias Induzidas
<i>LDH</i>	Lactato Desidrogenase
<i>MHC</i>	Complexo De Histocompatibilidade Celular
<i>NK</i>	Natural Killer
<i>nTreg</i>	Células T Regulatórias Naturais
<i>PBS</i>	Solução Tampão Fosfato
<i>PZQ</i>	Prazinquantel
<i>SFB</i>	Soro Fetal Bovino
<i>SWAP</i>	Soluble Antigen Preparation of Adult Schistosomes
<i>TGF</i>	Fator De Transformação Do Crescimento Beta
<i>TNF</i>	Fator De Necrose Tumoral
<i>Treg</i>	Célula T Regulatória
<i>TSB</i>	Tryptic Soy Broth
<i>WHO</i>	Organização Mundial De Saúde
<i>γGT</i>	Gamaglutamil Transferase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE.....	16
2.2	ASPECTOS BIOLÓGICOS DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	18
2.3	RESPOSTA IMUNE CELULAR DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE.....	21
2.4	MICROBIOTA INTESTINAL, PROBIÓTICOS E ESQUISTOSSOMOSE MANSONI.....	24
2.4.1	Microbiota intestinal	24
2.4.2	Probióticos e esquistossomose	27
2.4.3	<i>Bacillus clausii</i>	31
3	PERGUNTA CONDUTORA	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	OBJETIVO GERAL.....	34
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	34
5	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	35
5.1	ISOLAMENTO DE ESPOROS E OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE <i>BACILLUS CLAUSII</i>	35
5.2	ANIMAIS, INFECÇÃO PELO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> E ÉTICA.....	35
5.3	ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	36
5.4	ANÁLISE <i>IN VIVO</i>	37
5.4.1	Formação dos grupos experimentais	37
5.4.2	Avaliação dos aspectos parasitológicos	39
5.5	CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS PARA ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
5.6	AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE LINFÓCITOS T.....	40
5.7	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	41
5.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	42
6	RESULTADOS	43

6.1	ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA EXPERIMENTAL PARASITOLOGY.....	43
6.2	ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO PARA A REVISTA BENEFICIAL MICROBES.....	59
7	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	92

1 INTRODUÇÃO

O efeito imunomodulador do *Bacillus clausii* foi observado apenas em estudos experimentais e clínicos de doenças inflamatórias e alérgicas, não havendo relatos na literatura do uso desse probiótico sobre a imunopatologia da esquistossomose (DI CARO et al. 2005, CIPRANDI et al. 2005, DAR et al. 2018). Alguns estudos demonstraram o potencial terapêutico de outras espécies probióticas, porém, os resultados obtidos são restritos apenas a análise dos aspectos parasitológicos da doença (KIRTE et al. 1996, MOHAMED et al. 2014, GHANEM et al. 2005, SANTOS et al. 2004). Assim sendo, para compreensão do efeito imunomodulador do *B. clausii* na esquistossomose, faz-se necessário além do estudo parasitológico, a avaliação de citocinas (Th1, Th2 e Th17) e células T regulatórias (CD4+Foxp3+) e Th17 (CD4+Th17+) as quais estão relacionadas com processo de imunopatogênese e gravidade da doença.

Quando avaliado o padrão de expressão dos genes em pacientes com esofagite após o tratamento com *B. clausii*, foi constatado redução na expressão de genes para a citocina IL-6 e receptor de IL-15, ao passo que aumentou a expressão do gene para IL-13, IL-1 β e seu receptor (DI CARO et al. 2005). Em outro estudo utilizando crianças com rinite alérgica, o *B. clausii* foi capaz de reduzir os níveis de IL-4 e eosinófilos e aumentar a produção de IL-10, TGF- β e IFN- γ (CIPRANDI et al. 2005). Também foi visto em camundongos com osteoporose após a menopausa, que o *B. clausii* levou à diminuição dos níveis das citocinas IL-6, IL-17 e TNF- α e de células Th17 (CD4+RoryT), enquanto aumentou os níveis da citocina IL-10 e de células Treg (CD4+Foxp3+), tanto na medula óssea como no baço desses animais (DAR et al. 2018). Desse modo é possível que o *B. clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN), possam modular favoravelmente a gravidade da esquistossomose pois, já é sabido que o aumento de IL-10, TGF- β e células Treg e a diminuição de células Th17, IL-6 e TNF- α , estão relacionados com o aumento da sobrevivência de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (RUTITZKY et al. 2001 e 2011, LEYLAND et al. 2010, BAUMGART et al 2006).

Na infecção experimental por *S. mansoni*, foi demonstrado que o imunopotenciador não específico *Corynebacterium parvum*, reduziu o dano hepático, com diminuição da carga parasitária e do diâmetro dos granulomas hepáticos, assim como aumento da quimiotaxia de leucócitos (KIRTE et al. 1996). Resultados

semelhantes foram obtidos utilizando *Lactobacillus sporogenes*, nesse estudo observou-se ainda diminuição no diâmetro de granulomas intestinais, modificação do padrão de ovoposição, e diminuição da fragmentação do DNA em leucócitos e células do fígado e do baço (MOHAMED et al. 2014). Ghanem et al. (2005). utilizando camundongos esquistossomóticos, alimentados com iogurte contendo quatro espécies de probióticos (*L. casei* B-444, *L. plantarum* B-531, *L. reuteri* B-14141 e *L. acidophilus*), verificaram um aumento nos níveis de IgM após a estimulação com SWAP *in vivo* Porém, esses estudos não se estenderam a análise dos aspectos imunológicos, importantes para a compreensão do mecanismo de proteção dos probióticos estudados, sobre a esquistossomose.

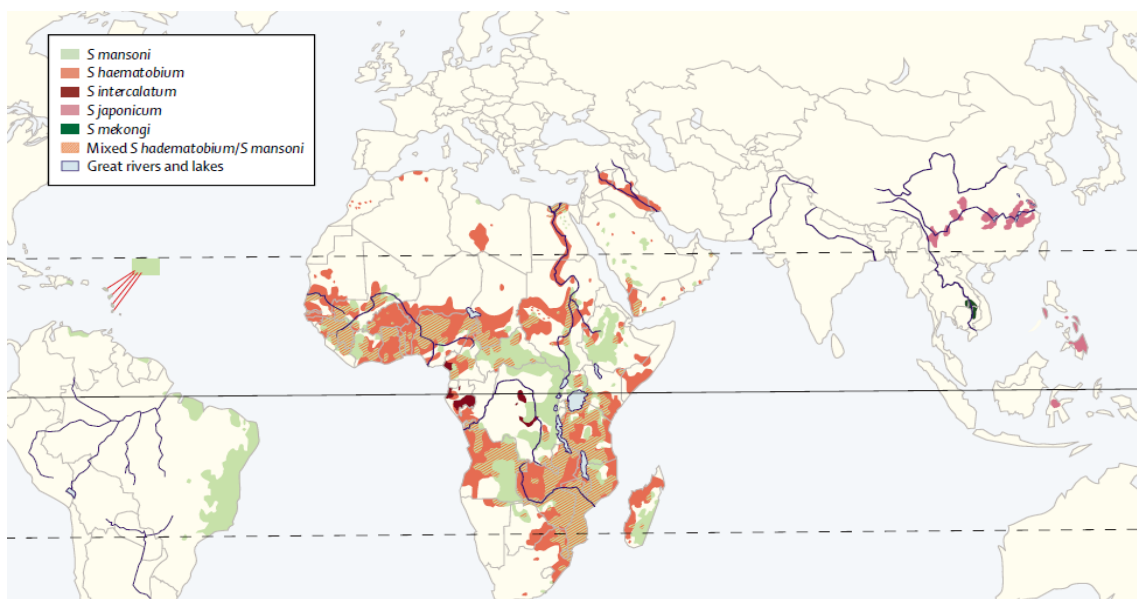
Diante do exposto, o presente trabalho pretende avaliar o potencial imunomodulatório do *B. clausii*, sobre os níveis de células T regulatória (CD4+Foxp3+) e Th17 (CD4+Th17+) concentração de citocinas dos perfis Th1 (IL-6, IFN, TNF), Th2 (IL-4, IL-10) e Th17 (IL-17A), assim como avaliar os aspectos parasitológicos (carga parasitária, ovos retidos no fígado e intestino, ovos liberados nas fezes e padrão de ovoposição) em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* cepa BH.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma infecção com alto grau de mortalidade e morbidade causada por parasitas trematódeos do gênero *Schistosoma*, endêmicos em 78 países e territórios de regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2019). O dano causado por essa infecção, representa um obstáculo no desenvolvimento humano e econômico pois prevalece sobretudo entre populações vulneráveis que vivem em áreas com saneamento básico precário e que possuem acesso limitado a serviços de saúde pública e educação (BRUUN & AAGAARD-HANSEN, 2008). A esquistossomose é responsável também por prejudicar o desenvolvimento ponderal e cognitivo de crianças, desabilitar os que estão infectados ao trabalho e perpetuar a pobreza e a desigualdade social, além de ocasionar perda de aproximadamente 3.518 DALYs (*Disability-Adjusted Life Years* – Anos de Vida Ajustados por Deficiência) (KARUNAMOORTHY et al. 2018, TIBIRIÇÁ et al. 2011, MITRA & MAWSON, 2017).

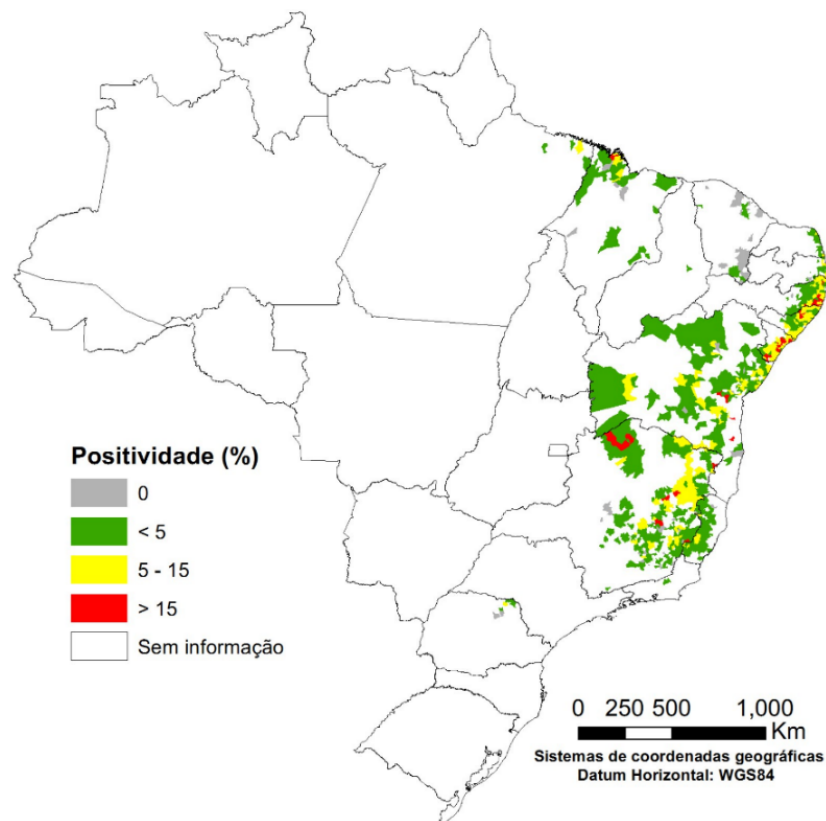
Figura 1 - Distribuição da esquistossomose no mundo.



Fonte: Gryseels et al. (2006)

Mundialmente, 219.9 milhões de pessoas (120.3 milhões de crianças em idade escolar e 99.5 milhões de adultos) estão infectados e cerca de 779 milhões vivem em áreas de risco constante para infecção (Figura 1). Dos infectados, 20 milhões de pacientes apresentam complicações crônicas e graves da doença, dos quais, apenas no continente africano, cerca 280.000 evoluem ao óbito anualmente (KARUNAMOORTHY et al. 2017; WHO, 2019).

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de positividade por município. Brasil, 2010-2015.



Fonte: Brasil - Ministério da Saúde (2016)

No Brasil cerca de 6-8 milhões de pessoas (4,6% da população total) estão infectadas com o *S. mansoni* e outras 25 milhões estão sob risco de infecção (Figura 2). A esquistossomose encontra-se em 16 das 27 unidades federativas, sendo as regiões Nordeste e Sudeste as mais afetadas pela doença com 74,7% e 24,8% dos novos casos, respectivamente. Nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba,

Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais, a doença apresenta caráter endêmico. Apenas entre os anos de 2008-2016 foram registrados pelo Ministério da Saúde do Brasil 2.275 internações e 4.473 óbitos por esquistossomose (BRASIL, 2018).

Apesar do número de óbitos registrados, foi visto no mesmo período, redução no número de novos casos e modificação no quadro epidemiológico da esquistossomose no território brasileiro. A taxa de positividade da doença caiu de 5,3% no ano de 2008 para 3,4% no ano de 2016 o que representa uma redução de 35,6%; no mesmo período observou-se também redução da taxa de mortalidade, que passou de 0,29 para 0,23 óbito/1 mil habitantes, redução que corresponde a aproximadamente 19,4% (BRASIL, 2018). Apesar dos avanços na redução do número de novos casos da esquistossomose no Brasil, o ônus econômico causado por essa infecção aos cofres públicos é alto, cerca de R\$ 155 milhões (US\$ 41,7 milhões) (NASCIMENTO et al. 2019), sendo que também o orçamento para seu controle e prevenção é extremamente subfinanciado pelo Governo Federal (TIBIRIÇA et al. 2011).

O estado de Pernambuco apresenta 101 dos seus 167 municípios (cerca de 17,5% de sua área territorial) endêmicos para a esquistossomose, com a taxa de positividade entre as regiões do estado variando entre 0,5% e 5%. Pernambuco, também é o estado brasileiro que apresenta os maiores números de internações hospitalares por formas graves da esquistossomose e o segundo estado com maior percentual médio de positividade (3,77%) para a doença no Brasil. Em 2016, Pernambuco registrou 3.766 novos casos de esquistossomose e cerca de 175 óbitos (PERNAMBUCO, 2018).

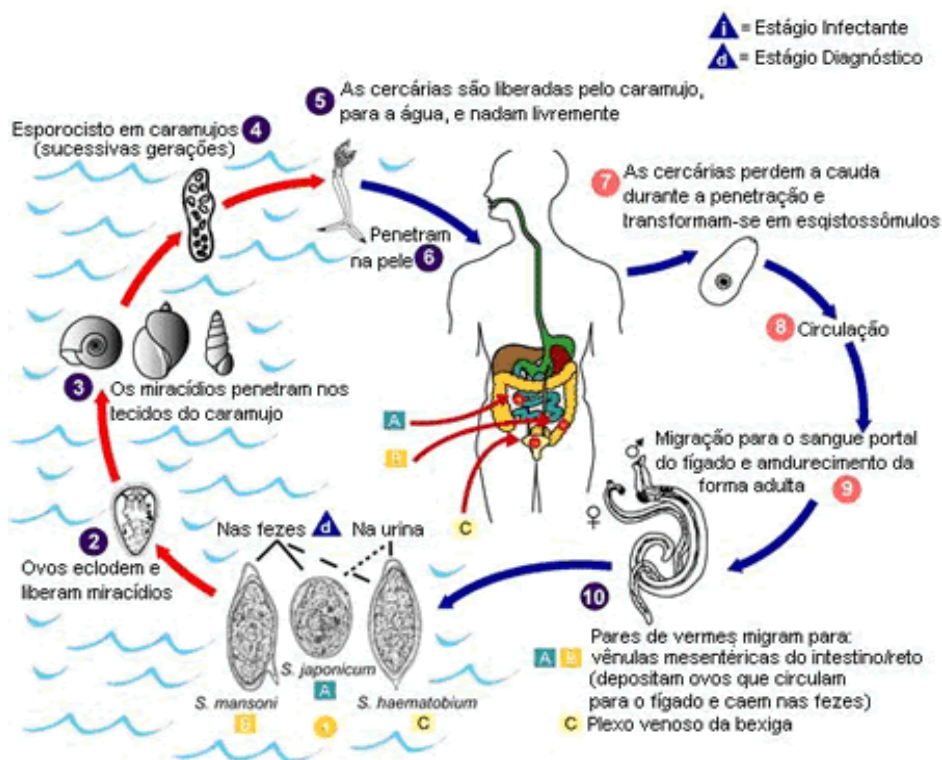
2.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO *SCHISTOSOMA MANSONI*

Os parasitas do gênero *Schistosoma* são helmintos trematódeos da classe Digenea, inteiramente adaptados ao parasitismo. Diferem de outros parasitas dessa classe, por serem endoparasitas sanguíneos obrigatórios e apresentarem evidente dimorfismo sexual. Das espécies do gênero *Schistosoma* com importância médica humana e epidemiológica podemos destacar: *S. hematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. japonicum*, *S. mansoni*. Sendo que apenas este último é o agente

etiológico da esquistossomose nas Américas e no Caribe, particularmente no Brasil, onde encontra-se o maior número de casos.

O *S. mansoni* demonstra diferentes adaptações biológicas tanto à vida livre aquática como também aos hospedeiros definitivos (*Homo sapiens* e roedores selvagens) e intermediários (caramujos do gênero *Biomphalaria*) (Figura 3). Os aspectos morfológicos e fisiológicos do parasita dependem exclusivamente do seu estágio de desenvolvimento durante seu complexo ciclo biológico heteróximo e compreendem o ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e vermes adultos (macho e fêmea) (REY, 2011).

Figura 3. Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

O ciclo biológico inicia-se aproximadamente 40 dias após a infecção do hospedeiro definitivo com a liberação de ovos pela fêmea de *S. mansoni*. Os ovos que alcançam a luz intestinal são liberados juntos com as fezes e ao entrar em contato

com reservas hídricas eclodem e liberam o miracídio, fase larval ciliada do parasita (REY, 2011).

Os miracídios possuem em sua região apical papilas denominadas de *terebratorium* responsáveis por facilitar o encontro e a aderência à superfície do hospedeiro intermediário. A penetração nos tecidos do molusco é possível graças a movimentos mecânicos giratórios e liberação de proteases por glândulas localizadas nas regiões laterais e apical do seu corpo (REY, 2011).

Após a penetração, o miracídio transforma-se em um novo tipo larvário de formato sacular cheio de células germinativas, o esporocisto primário, que através de poliembrião originam em seguida esporocistos secundários, os quais migram para o hepatopâncreas e ovovétis do caramujo e por reprodução assexuada transformam-se em cercárias (REY, 2011).

As cercárias, formas infectantes dos hospedeiros vertebrados, possuem cerca de 0,5 mm de comprimento e corpo segmentado em duas partes principais: cauda bifurcada, responsável pela locomoção, e corpo cercariano onde encontra-se presente as ventosas oral e ventral e glândulas de penetração e fixação. No processo de penetração na pele e/ou mucosas, as cercárias liberam enzimas proteolíticas (hialuronidases e collagenases) responsáveis pela degradação das camadas teciduais e atinge regiões mais internas, sendo a cauda abandonada no exterior nesse processo (REY, 2011).

Após a penetração e ocorrência de modificações estruturais, bioquímicas e fisiológicas, o corpo cercariano é agora denominado esquistossômulo e caracteriza-se como a forma imatura do *S. mansoni*. Os esquistossômulos por sua vez, migram para a corrente sanguínea e são passivamente arrastados para o coração e pulmões, tomam a circulação sistêmica e chegam ao sistema porta-hepático onde completam seu desenvolvimento e alcançam a fase adulta e maturação sexual (REY, 2011).

Quando adulto, o *S. mansoni* apresenta um evidente dimorfismo sexual. O verme macho possui cor branca, mede cerca de 1 cm de comprimento e na extremidade anterior possui uma ventosa oral e outra ventral; seu corpo é achatado, porém enrola-se dorso-ventralmente para formar uma fenda conhecida como canal ginecóforo, onde se aloja a fêmea do parasita. A fêmea, possui cerca de 1-1,6 cm e corpo cilíndrico, sua coloração é escura devido à presença de hemozoína (pigmento

derivado do metabolismo de hemoglobina) dentro do seu tubo digestivo e assim como o macho, apresenta duas pequenas ventosas na região anterior. A atração sexual dos vermes adultos se inicia na terceira semana pós-infecção nas veias do sistema porta-hepático, e em seguida ao acasalamento migram para as veias do mesentério inferior e para o plexo hemorroidário superior, dando início ao processo de ovoposição, e consequentemente ao ciclo biológico (REY, 2011).

2.3 RESPOSTA IMUNE CELULAR DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE

Com o início da ovoposição pela fêmea de *Schistosoma mansoni*, os antígenos dos ovos aprisionados na microvasculatura tecidual induzem através de complexos mecanismos dependentes da resposta imune celular, a formação do principal elemento patológico da esquistossomose, o granuloma.

Os linfócitos são as células da resposta imune celular, com a função de coordenar a formação do granuloma, através da produção e liberação de citocinas e anticorpos. Suas populações se diferenciam classicamente de acordo com sua função em: linfócitos B, linfócitos T citotóxicos ou CD8+ e linfócitos T auxiliares (Th) ou CD4+, esses por sua vez, quando ativados, subdividem-se em dois padrões principais distintos de acordo com seus fenótipos de secreção de citocinas, denominados Th1 e Th2 (STOCKINGER et al. 2006; ZHANG & BEVAN, 2011; ABBAS et al. 2017).

Os linfócitos Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias em resposta a vírus e microrganismos que infectam e/ou ativam macrófagos e células *Natural Killer* (NK), essas citocinas incluem principalmente o Interferon tipo Gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina (IL)-2. O IFN- γ é a citocina chave deste perfil, e sua função está relacionado com a ativação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), troca isotípica de imunoglobulinas nos linfócitos B e inibição da síntese de citocinas pelo perfil Th2. Os linfócitos Th2 secretam citocinas como a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, em resposta a alérgenos e infecções parasitárias. As citocinas IL-4 e IL-5, induzem respostas inflamatórias ao aumentarem a produção de Imunoglobulina (Ig)-E, proliferação e ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, enquanto que a IL-10 é conhecida por sua função anti-inflamatória (STOCKINGER et al. 2006; ZHANG & BEVAN, 2011; ABBAS et al. 2017).

A resposta imune contra o *S. mansoni* inicia-se no momento de penetração da cercária na pele e/ou mucosas dos hospedeiros, sendo geralmente evidenciada pela dermatite cercariana no local da infecção e aparecimento de sintomas brandos e inespecíficos. A dermatite cercariana é caracterizada pelo desenvolvimento de hipersensibilidade mediada por Imunoglobulina Ig-E e secreção de citocinas por células mononucleares teciduais inatas como TNF, IL-1 β , IL-12 e IL-6 (MOUNTFORD & TROTTEIN 2004; JENKINS et al. 2005). Essa resposta inflamatória tecidual garante em parte a redução da carga parasitária do hospedeiro e regride em cerca de uma semana.

Posterior à penetração, entre 3-5 semanas, antígenos presentes nos esquistossômulos e no tegumento do parasita quando adulto, são fagocitados por células dendríticas (DC) que ativam uma resposta imune pro-inflamatória Th1 com aumento significativo nos níveis de citocinas como IL-1, IL-6, IFN- γ e TNF (PEARCE & MACDONALD, 2002). Com o início da ovoposição cerca de 5-6 semanas após a infecção, ocorre mudança no perfil de resposta para o tipo Th2, com aumento na produção de IL-4, IL-5 e IL-10. Estudos demonstram que a IL-10 produzida durante esse período está relacionada com essa mudança no perfil de secreção das citocinas (SILVIA et al. 1999). Foi visto também que a resposta Th2 está relacionada com o desenvolvimento do granuloma (YAMASHITA & BOROS, 1992) e caso ela não se desenvolva de forma correta, a resposta inicial pro-inflamatória Th1 se intensifica causando a morte precoce do hospedeiro (BRUNET et al. 1997).

Apesar da resposta Th2 possuir potencial em modular respostas imunes pró-inflamatórias iniciais, o seu prolongamento contribui para geração da cronicidade e desenvolvimento da fibrose. Fallon et al. (2000) demonstraram que a IL-13, é o principal estímulo fibrogênico na esquistossomose, após verificarem que camundongos IL-13^{-/-}, apresentavam aumento na sobrevivência pós-infecção correlacionado com redução do nível de fibrose hepática. O potencial fibrogênico da IL-13 é explicado por sua capacidade de estimular fibroblastos e macrófagos alternativamente ativados (aaM Φ) a expressar a arginase-1 (Arg-1), enzima responsável por promover a síntese do colágeno (ORIENTE et al. 2000; WILSON et al. 2007).

Estudos sobre o mecanismo de modulação da IL-10 sobre o processo de formação do granuloma, demonstram que camundongos IL-10^{-/-}, desenvolveram perfil

misto Th1/Th2 com níveis elevados de IFN- γ , IL-4 e IL-5; demonstrando que a IL-10 exibe ação supressiva sobre ambos os perfis, prevenindo o surgimento de patologias Th1 ou Th2 polarizadas (HOFFMANN et al. 2000). A IL-10 possui capacidade de induzir e manter células T regulatórias (Treg) e diminuir a expressão de co-estimuladores e de moléculas do MHC de classe II nas células apresentadoras de antígenos e macrófagos, modificando a resposta das células Th aos antígenos do parasita (FLORES-VILLANUEVA et al. 1993).

As células Treg desempenham papel central na manutenção da tolerância imunológica e no controle das respostas imunes. São divididas em dois tipos principais, naturais e induzidas, que diferem quanto a sua origem, fenótipo e função (ADEEGBE & NISHIKAWA, 2013). As células Treg naturais (nTreg—CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) se originam no timo e expressam o fator de transcrição FoxP3 (*Forkhead Box P3*), responsável por controlar seu desenvolvimento e funções (LI et al. 2015). As nTreg exibem grande quantidade de TCR (*T Cell Receptor*) e desempenham suas funções supressivas principalmente através da interação célula-célula. Células Treg induzidas (iTreg), se originam na periferia e suas funções são relacionadas a secreção de citocinas imunossupressoras. As iTreg, compreendem diferentes subtipos de células, incluindo células Tr1 (Tr1—CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) produtoras de IL-10 e células Th3 (Th3—CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) produtoras de TGF- β (*Transforming Growth Factor— β*) (LOURENÇO & LA CAVA, 2011).

Estudos experimentais demonstraram que antígenos derivados do *S. mansoni* são capazes de induzir a expansão de células Treg. Cardoso et al. (2009), demonstraram que os antígenos Sm22.6, PIII e Sm29, induziram a expansão significativa de células Treg CD4⁺FoxP3⁺ e Treg CD4⁺FoxP3⁺IL-10⁺ em camundongos infectados com *S. mansoni*. No estudo realizado por Amu et al. (2010) a infecção com vermes machos de *S. mansoni*, levou ao aumento de células Treg pulmonares e consequente redução da resposta alérgica anti-ovalbumina no pulmão. Quanto a importância das Treg para o processo imunomodulatório e formação do granuloma, Baumgart et al. e Taylor et al. (2006), demonstraram que as células naTreg são necessárias para manutenção do balanço entre os perfis Th1 e Th2 de maneira independente da secreção de IL-10. Singh et al. (2004) em seu estudo, demonstrou que as Treg CD4⁺CD25⁺ possuem capacidade no controle da formação do granuloma, mecanismo crucial para proteção do hospedeiro contra formas graves da doença.

Outro estudo também demonstrou que as Treg CD4⁺CD25⁺ produtoras de IL-10, estão associadas com a redução da morbidade e aumento da sobrevivência de camundongos infectados com *S. mansoni* (HESSE et al. 2004).

Estudos demonstraram que a imunopatologia esquistossomose não é uma consequência exclusiva da interação entre citocinas do perfil Th1 e do perfil Th2. Nesse contexto o perfil Th17 tem sido implicado no desenvolvimento de resposta granulomatosa severa durante a esquistossomose mansoni. A resposta imune pró-inflamatória induzida pelo perfil Th17 está relacionada principalmente com secreção da IL-17A, interleucina responsável por promover indução de moléculas de adesão celular (ICAM 1) e a secreção de várias citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF, G-CSF e GM-CSF) e quimiocinas (CXCL1, CXCL5, CCL2 e CCL7) que resultam em infiltrados inflamatórios ricos em neutrófilos e contribuem para a gravidade da infecção (LARKIN et al. 2012; IWAKURA et al. 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que o bloqueio da IL-17A está implicado com a redução do tamanho de granulomas induzidos pelo o SEA (Antígeno Solúvel dos Ovos) do *S. mansoni* (EZZ et al. 2018). Nesse contexto, estudos *in vivo* também demonstraram que a IL-17A está envolvida no desenvolvimento de patologias severas induzidas pelos ovos do *S. mansoni* (RUTITZKY et al. 2005, 2008; RUTITZKY & STADECKER 2011; SHAINHEIT et al. 2011). Recentemente, Kalantari et al. (2019) demonstraram em camundongos CBA, que a ativação do receptor de lectina tipo C, CD209a (homólogo do DC-SIGN humano), está relacionado com a imunopatologia severa induzida por Th17, observada nesses animais.

2.4 MICROBIOTA INTESTINAL, PROBIÓTICOS E ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

2.4.1 Microbiota intestinal

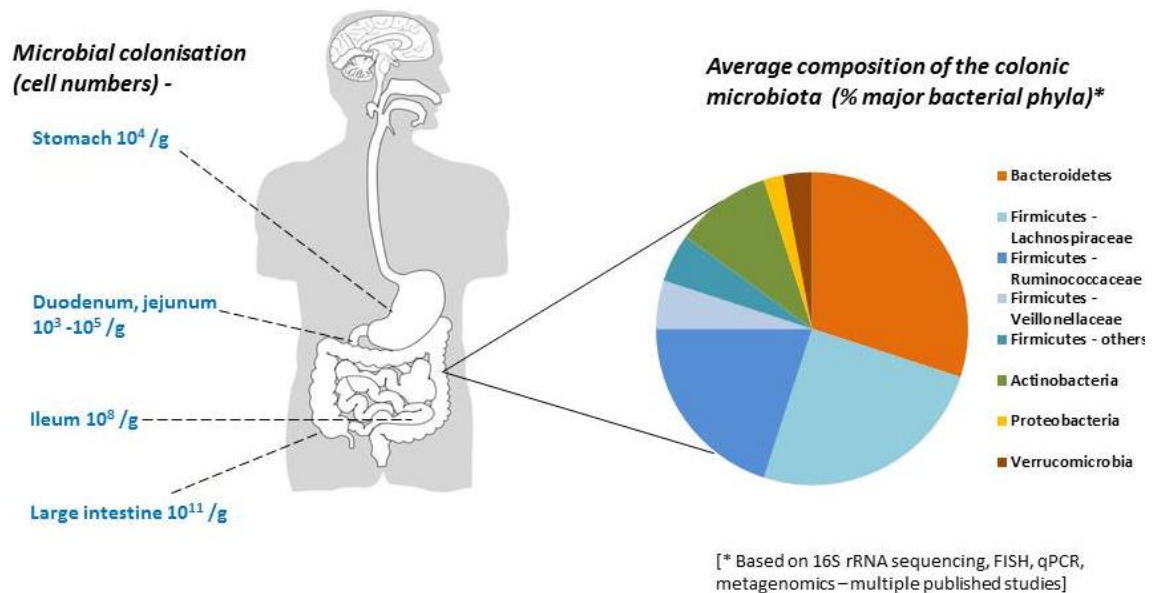
O epitélio intestinal humano possui uma superfície de aproximadamente 400 m², sendo colonizado por mais de 1000 espécies bacterianas distintas que em conjunto formam a microbiota intestinal (HUTTENHOWER et al. 2012). A quantidade de células bacterianas que constitui a microbiota intestinal é estimada em cerca de

10^{13} (SENDER et al. 2016) e o seu genoma total quando caracterizado, ultrapassam em 10 vezes o conteúdo genético humano (GILL et al. 2006).

O ser humano inicia a aquisição de sua própria microbiota logo após o nascimento, porém estudos tem indicado que a colonização pode iniciar ainda no útero (COLLADO et al. 2016) Os primeiros anos de vida representa um período crucial para o desenvolvimento de uma microbiota saudável. Inicialmente a microbiota intestinal é altamente variável e a convergência para população microbiana “adulta”, não ocorre até o terceiro ano de idade (PALMER, et al. 2007; BERGSTRÖM et al. 2014). Diversos fatores contribuem para determinação de sua composição, como: tipo de parto (cesárea ou normal), amamentação, uso de antibióticos, exposição a microrganismos maternos e ambientais, pressão de seleção ecológica devido as interações microbianas, dieta e genética do hospedeiro (TANAKA & NAKAYAMA, 2017).

Com a evolução de novas técnicas para análises genéticas, foi possível quantificar e identificar espécies que não cultiváveis em meios tradicionais, o que permitiu melhor entendimento sobre dinâmica e composição da microbiota intestinal (GILL et al. 2006). Dentre os filos dominantes em humanos adultos saudáveis, destacam-se os bacilos Gram-negativos Bacteroidetes e os Gram-positivos Firmicutes, que compreendem cerca de 90% das bactérias presentes na microbiota intestinal, seguidos pelos filos Actinobacteria e Proteobacteria (ARUMUGAM et al. 2011). Apesar de existir uma alta diversidade de espécies microbiana e uma variação dessas entre indivíduos, a composição gênica das bactérias é relativamente homogênea (Figura 4) (RINNINELLA et al. 2019). Fungos, protozoários, vírus e archaeas também compõem uma parte da microbiota intestinal, sendo que suas funções ainda são pouco conhecidas (LAFOREST-LAPOINTE & ARRIETA, 2017; LIMA et al. 2019)

Figura 4 - Microbiota intestinal em adultos saudáveis



Fonte: Le Chatelier et al. (2013)

A microbiota intestinal tem um efeito contínuo e dinâmico no sistema imunológico do hospedeiro. As bactérias são fundamentais no desenvolvimento de respostas inatas e adaptativas protetoras contra patógenos e manutenção das vias regulatórias da mucosa, envolvidas na manutenção da tolerância oral de antígenos inócuos (BELKAID & HARRISON, 2017). Além disso, diversas outras funções são atribuídas a microbiota intestinal como: metabolização de fibras dietéticas, produção de peptídeos antimicrobianos e vitaminas, competição por nutrientes e sítios de adesão com patógenos e manutenção de funções metabólicas e permeabilidade intestinal (JANDHYALA et al. 2015; ROWLAND et al. 2018). Assim alterações na microbiota intestinal (disbiose), possuem efeitos prejudiciais à saúde do hospedeiro, desregulando o sistema imune, desequilibrando vias metabólicas e aumentando a suscetibilidade a doenças infecciosas e não infecciosas (HOOKS & O'MALLEY, 2017).

Evidências crescentes destacam a importância da microbiota intestinal na patogênese da esquistossomose mansoni. Holzschneider et al. (2013) demonstraram que a administração de antibióticos e antimicóticos de amplo espectro em camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni*, resultou em redução substancial da inflamação intestinal e do desenvolvimento do granuloma. Além disso, os autores relataram que respostas imunes específicas contra o *Schistosoma* foram alteradas

quando avaliaram a produção de citocinas dos camundongos infectados com depleção da microbiota ao estimular *in vitro* com SEA ou α CD3 linfócitos dos linfonodos mesentéricos. Demonstrou-se redução dos níveis de IFN- γ e IL-10 e apesar de não significativo aumento de IL-13. Foi visto também redução na excreção fecal de ovos em camundongos com microbiota depletada. Esse foi o primeiro estudo a demonstrar que a microbiota intestinal possui papel direto no desenvolvimento da resposta imune responsável pela patogênese da esquistossomose.

Quanto ao impacto do *S. mansoni* sobre a composição da microbiota intestinal, Jenkins et al. (2018) demonstraram que camundongos C57BL/6 infectados, apresentaram aumento de grupos bacterianos que podem desempenhar papéis na fisiopatologia da esquistossomose por possuírem funções imunomodulatórias (*Lactobacillus* spp.), por influenciarem a integridade da barreira epitelial (*Akkermansia muciniphila*) e induzirem inflamação intestinal (*Dorea* spp. e *Bacteroides acidifaciens*). O estudo realizado por Floudas et al. (2019) demonstrou que camundongos BALB/C infectados com vermes machos ou com casais de *S. mansoni*, apresentaram alteração na composição do microbioma intestinal, tornando-os mais susceptíveis à colite experimental. Ainda nesse estudo, foi visto que camundongos livres de patógenos (*germ free*) não infectados que compartilharam o mesmo ambiente dos animais infectados, também adquiriram susceptibilidade a colite experimental via aquisição da microbiota. Schneeberger et al. (2018), investigando a associação entre o *S. mansoni* e o Praziquantel sobre a composição da microbiota intestinal no contexto de um estudo clínico randomizado e controlado com crianças em idade escolar, infectadas, verificaram que o perfil taxonômico geral e os indicadores de diversidade microbiana estavam próximos de uma estrutura “saudável” e que o tratamento com Praziquantel não foi associado a mudança nos perfis taxonômicos dos microrganismos intestinais. Contudo, os autores concluem que embora este estudo mostre dados preliminares, ele permanece baseado apenas nessa população pediátrica específica, sendo necessário uma coorte maior para confirmação desses resultados.

2.4.2 Probióticos e esquistossomose

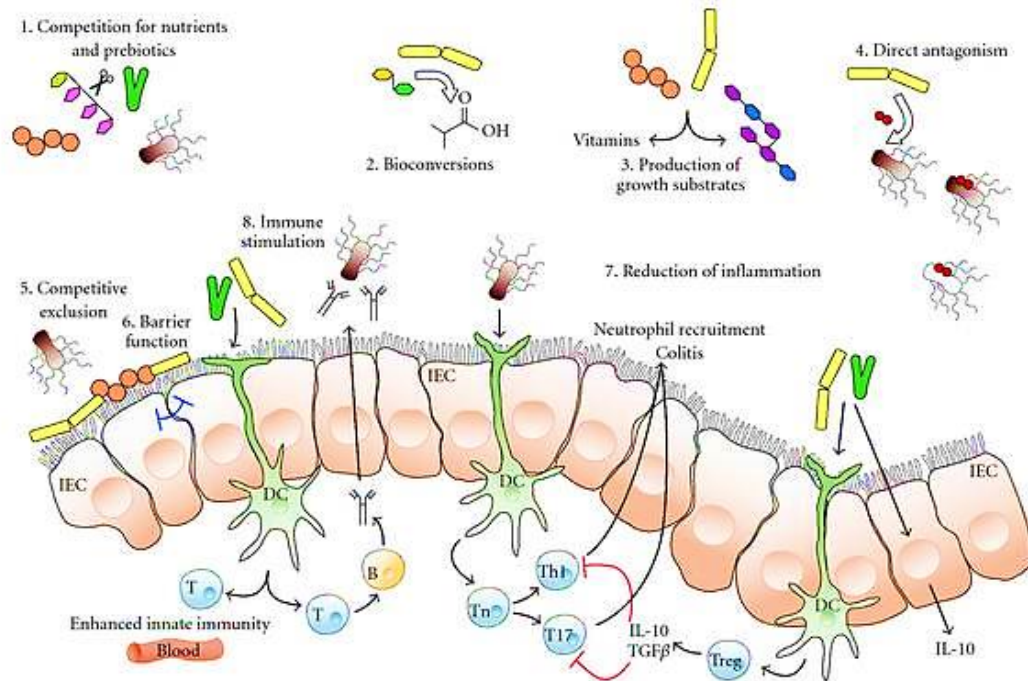
Considerando a importância da microbiota intestinal para um estado homeostático, alterar sua composição pode ser uma alternativa útil na prevenção e

tratamento de diversas enfermidades intestinais e extraintestinais, como também aquelas causadas por parasitas (KÖNIG & BRUMMER, 2014; VITETTA et al. 2016; TAYLOR, 2019). Uma das formas de alteração da microbiota consiste no uso de probióticos, microrganismos que quando administrados em concentrações recomendadas são capazes de trazer benefícios à saúde (HILL et al. 2015).

Para determinado microrganismo ser considerado como probiótico, critérios de biossegurança e evidências científicas quanto ao seu benefício biológico, devem ser levados em consideração (HARZALLAH & BELHADJ, 2013). Comumente espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são utilizadas como probióticos, porém, leveduras, certas cepas de *Escherichia coli* e espécies de *Bacillus*, também são utilizadas como microrganismos probióticos (FIJAN, 2014).

Os probióticos exercem seus benefícios por diversos mecanismos de ação, dos quais podemos citar: 1) manutenção e reparo da barreira intestinal (HSIEH et al. 2015; RESTA-LENERT et al. 2003); 2) modulação da microbiota via competição por sítios de adesão, nutrientes e produção de compostos antimicrobianos (MUSIKASANG et al. 2012); 3) aumento da absorção e metabolização de nutrientes; 4) modulação do metabolismo microbiano (ALMEIDA et al. 2012; DUBEY & PATEL, 2018; IRVINE et al. 2011; LEBLANC et al. 2017); 5) estimulação do sistema imune do hospedeiro a partir do aumento da frequência de linfócitos B e IgA, aumento ou diminuição da atividade de macrófagos e células dendríticas, e estimulação de células Th e Treg (Figura 5) (DRAKES et al. 2004; FOLIGNE et al. 2007; KIM et al. 2014; KONIECZNA et al. 2012; O'MAHONY et al. 2008).

Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de ação exercidos pelos probióticos.



Fonte: O'Toole & Cooney, (2008)

Inúmeros efeitos biológicos são atribuídos ao uso dos probióticos, como combate a infecção por *Helicobacter pylori*, redução de diarreias agudas e dos sintomas relacionados a alergias e doenças inflamatórias intestinais, aumento da absorção de nutrientes e eliminação de patógenos nasais (REID et al. 2003; GOLDIN & GORBACH, 2008). Com relação ao uso no controle de infecções parasitárias, estudos clínicos e experimentais destacam ação de probióticos na redução do crescimento, aderência dos trofozoítos e excreção de cistos de *Giardia lamblia* (VENTURA et al. 2017), redução na viabilidade, infectividade de oocistos e tempo de infecção por *Cryptosporidium* spp. (FOSTER et al. 2003; GLASS et al. 2004; PICKERD & TUTHILL, 2004), redução do crescimento e aumento da liberação de cistos de *Entamoeba histolytica* (RIGOTHIER et al. 1994; MANSOUR-GHANAEL et al. 2003; DINLEYICI et al. 2009; MOHAMED et al. 2015), redução na viabilidade de larvas de *Toxocara canis* (CHIODO et al. 2010; DE AVILA et al. 2016) e redução da carga parasitária em camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*.

(OLIVERIA-SEQUEIRA et al. 2014) e *Trichinella spiralis* (BAUTISTA-GARFIAS et al. 2001, DVOROZNAKOVA et al. 2016).

Frente ao *S. mansoni*, Santos et al. (2004), demonstraram que cultura da bactéria *Zymomonas mobilis*, não classificada como probiótico, administrada em camundongos C57Bl/10 em esquemas terapêutico profilático (7 dias antes da infecção) e curativo (7 dias após infecção) foi capaz de reduzir 24 e 61% a carga de vermes, respectivamente. Ghanem et al. (2005) em seu estudo, demonstraram em camundongos Swiss Webster infectados com *S. mansoni*, que a suplementação com iogurte contendo quatro espécies probióticas (*L. casei* B-444, *L. plantarum* B-531, *L. reuteri* B-14141 e *L. acidophilus*), reduziu o peso do fígado e baço e a atividade das enzimas AST, LDH e γ GT (marcadores de dano hepático) próximo aos níveis encontrados no grupo não infectado. Além disso, verificaram que esses probióticos induziram efeitos imunomoduladores ao estimular aumento da resposta de IgM contra o SWAP (Soluble Adult Worm Antigen Preparation), antes e após a infecção. Zowail et al. (2012), demonstraram o potencial do *L. sporogenes* 415722 em camundongos CD-1 machos albinos infectados com *S. mansoni*, de reduzir aberrações cromossômicas como deleção de cromátides, fragmentação do anel cromossômico e fusão cêntrica, causadas pela infecção ou pelo tratamento com PZQ. Mohamed et al. (2016), utilizaram o mesmo probiótico e modelo experimental, demonstraram que a combinação entre PZQ e *L. sporogenes* 415722 reduz a carga parasitária e modifica o padrão de ovoposição com aumento da quantidade de ovos mortos na parede do intestino. Além disso, os resultados das análises histológicas mostraram redução significativa dos valores médios dos diâmetros de granuloma no fígado e intestino em camundongos infectados tratados com PZQ e/ou *L. sporogenes* 415722. Quando analisado os danos moleculares, também foi visto que a administração do *L. sporogenes* 415722 em camundongos infectados, reduziu o dano no DNA (quebra de fitas simples e apoptose durante o ciclo celular) provocado pela infecção, em comparação com aqueles infectados não tratados e infectados tratados apenas com PZQ. Mais recentemente El-Khadragy et al. (2019), ao avaliarem a administração de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20080 em camundongos CD-1 infectados com *S. mansoni*, demonstram redução da carga parasitária e de ovos retidos no tecido hepático, como também redução na densidade e volume do granuloma hepático e modificação no padrão de ovoposição.

Ademais, foi visto redução de apoptose no tecido hepático, redução nos níveis de marcadores de estresse oxidativo (peroxidação lipídica, nitratos e nitritos) e aumento nos níveis de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase) e glutathione reduzida.

2.4.3 *Bacillus clausii*

Bactérias probióticas do gênero *Bacillus* possuem diversos benefícios a saúde humana (CUTTING, 2011; ELSHAGHABEE et al. 2017). Dentro desse gênero destaca-se o *Bacillus clausii* bastonete gram-positivo, aeróbio, móvel e formador de esporos comumente encontrado associado a microbiota do solo. Comercialmente o *Bacillus clausii* é conhecido como Enterogermina® (Sanofi-Aventis SpA), formulação constituída por esporos de quatro cepas de *Bacillus clausii*: O/C, N/R, T e SIN, assim denominadas devido aos seus distintos perfis de resistência a antibióticos: O/C resistente ao cloranfenicol, N/R resistente a novobiocina e rifampicina, T resistente a tetraciclina e SIN resistente a neomicina e estreptomicina (LOPETUSO et al. 2016).

Os esporos de *B. clausii* sobrevivem ao pH da barreira gastrointestinal humana e chegam viáveis ao intestino, onde em cerca de 6 horas após a administração, são capazes de sofrer germinação, crescimento e multiplicação como forma vegetativas, podendo ser ainda encontrados em quantidade considerável nas fezes por até 12 dias (GHELARDI et al. 2015). Demonstrou-se em estudos clínicos que a rápida colonização do *B. clausii*, é fundamental para sua eficácia no tratamento da diarreia aguda em crianças (IANIRO et al. 2018) e na redução dos efeitos colaterais gastrointestinais secundários a antibioticoterapia contra *Helicobacter pylori* (NISTA et al. 2004).

Em estudo experimental realizado por Pradhan et al. (2018), o *B. clausii* reduziu a inflamação e melhorou a disbiose (desequilíbrio das comunidades bacterianas comensais por fatores exógenos ou endógenos) em camundongos BALB/c infectados com *Salmonella typhimurium*, através do aumento da diversidade microbiana intestinal.

A análise do secretoma das quatro cepas do *B. clausii* (O/C, N/R, T e SIN), demonstrou alto grau de concordância, apesar de algumas proteínas exibirem variações consideráveis em seu nível de expressão entre as cepas, mesmo levando

em consideração a similaridade genotípica existente entre as linhagens. Todavia, os efeitos clínicos globais da administração do Enterogermina®, são atribuídos a soma dos metabólitos produzidos por todas as linhagens presentes na formulação. Dentre os metabólitos produzidos destaca-se a proteína estrutural flagelina, uma proteína estrutural dos flagelos com potencial de indução de resposta imune pró-inflamatória através da indução da secreção de IL-8 e β -defensina humana (LIPPOLIS et al. 2013). Outra importante molécula produzida pelo *B. clausii* é a Clausina, um lantibiótico tipo A (bacteriocina classe I), que exerce efeitos antimicrobianos ao interagir com intermediários lipídicos essenciais para a biossíntese de ácidos lipotécóicos, presentes na parede celular de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Clostridium difficile* (URDACI et al. 2004; BOUHSS et al. 2009).

Os benefícios obtidos com o uso do *B. clausii* são também atribuídos ao seu potencial imunomodulatório. Di Caro et al. (2005), após avaliarem o padrão de expressão genética em pacientes com esofagite, tratados com *B. clausii*, demonstraram a capacidade desse probiótico em aumentar a expressão de genes para IL-13, IL-1 β e seu receptor e reduzir a expressão de genes para a IL-6 e receptor de IL-15. Em outro estudo realizado por Ciprandi et al. (2004), o *B. clausii* reduziu os níveis de IL-4 e a frequência de eosinófilos e aumentou a produção de IFN- γ , IL-12, IL-10 e TGF- β em crianças com rinite alérgica. Foi visto também em camundongos BALB/c com osteoporose pós-menopausa, que o tratamento com *B. clausii* aumentou a produção de IL-10 e frequência de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺), ao passo que inibiu simultaneamente a ativação de células Th17 (CD4⁺RoryT) e secreção de citocinas IL-6, IL-17 e TNF- α (DAR et al. 2018).

3 PERGUNTA CONDUTORA

O sobrenadante livre de células (SLC) da cultura de *Bacillus clausii* é capaz de causar mortalidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni in vitro* e a administração oral de esporos de *B. clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN) é capaz de modificar os aspectos parasitológicos (carga parasitária, padrão de ovoposição, ovos retidos no fígado e intestino e ovos secretados nas fezes) bem como a frequência de células T regulatórias (CD4+Foxp3+) e Th17 (CD4+IL17+) e a concentração de citocinas dos perfis Th1 (IL-6, IFN, TNF), Th2 (IL-4, IL-10) e Th17 (IL-17A) em camundongos submetidos a infecção experimental por *S. mansoni* cepa BH?

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o potencial esquistossomicida do sobrenadante livres de células da cultura de *B. clausii in vitro* e imunorregulador de esporos de *Bacillus clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN) em camundongos submetidos a infecção experimental por *Schistosoma mansoni* cepa BH.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

Em cultura de *Schistosoma mansoni in vitro*, objetiva-se:

- Avaliar o potencial esquistossomicida do sobrenadante livres de células (SLC) da cultura de *B. clausii*, obtido de diferentes tempos de incubação, contra casais de *S. mansoni*.

Em camundongos fêmeas não infectados ou infectados por *Schistosoma mansoni* cepa BH, submetidos ao tratamento com *B. clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN), em diferentes esquemas terapêuticos, objetiva-se:

- Avaliar a carga parasitária, padrão de ovoposição, quantidade de ovos liberados nas fezes e quantidade de ovos presos no fígado e intestino;
- Analisar a frequência de células T regulatórias (CD4⁺Foxp3⁺) e CD4⁺IL17⁺ em cultura de células esplênicas;
- Analisar a concentração de citocinas Th1 (IL-6, IFN- γ , TNF), Th2 (IL-4, IL-10) e Th17 (IL-17A) em cultura de células esplênicas.

5 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

5.1 ISOLAMENTO DE ESPOROS E OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE *BACILLUS CLAUSII*

Sobrenadante e esporos de *B. clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN), foram obtidos do medicamento Enterogermina® (Sanofi-Aventis SpA, Milão, Itália). Resumidamente, a solução de uma ampola de Enterogermina® (5mL/10⁹ esporos) foi adicionada à 450 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB – Hemocult I) e em seguida incubada em agitador automático (150 IPM) a 35°C.

Os sobrenadantes empregados para a análise esquistossomícida *in vitro* foram obtidos a partir da cultura de 24, 48 e 72h do *B. clausii* em meio TSB. Para cada tempo de incubação, 20 mL do sobrenadante da cultura foi centrifugado (4000g por 30 min), filtrado (membrana 0.22µm, MF-Millipore, GSWP) e concentrado por evaporação em *Speed Vacuum* (Eppendorf™ Concentrator Plus) a 30°C durante 5 h, em condições estéreis, obtendo volume final de 4 mL. O tempo de incubação e a obtenção dos sobrenadantes finais empregados foram adaptados dos estudos de Urdaci et al. (2004), Perrucci et al. (2019) e Lim et al. (2018).

Os esporos empregados para análise esquistossomícida *in vivo* foram obtidos a partir da cultura de 72h. Resumidamente, a cultura foi centrifugada (4000g por 30 min) e os esporos ressuspensos em solução salina estéril e plaqueados em ágar nutritivo para padronização das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), de forma a obter concentração final de 10⁹ esporos/mL. As soluções de esporos foram mantidas em frascos individuais de 5 mL hermeticamente fechados, em temperatura ambiente até administração.

5.2 ANIMAIS, INFECÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI* E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Camundongos fêmeas, *Swiss Webster*, 30 dias de idade, pesando entre 28-30g, foram obtidas e mantidas no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami em condições padrões de criação (25°C e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) com acesso a ração (Labina®/Purina, São Paulo) e água *ad libitum*. Camundongos foram infectados percutâneamente com *Schistosoma mansoni* cepa BH (Belo Horizonte - MG, Brasil). Essa cepa é mantida no setor de Imunoregulação das Doenças Infecto-parasitárias e dos Fármacos Antiparasitários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, através de passagens sucessivas em *Biomphalaria glabrata* e camundongos *Swiss Webster*. Para a análise *in vitro* 10 camundongos foram infectados com 120 cercárias. Para a análise *in vivo* 30 camundongos foram infectados com 50 cercárias e outros 20 camundongos foram mantidos livres da exposição cercariana. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (CEE/UFPE) sob processo de nº 23076.016405/2016-57.

5.3 EXPOSIÇÃO *IN VITRO* DO *S. MANSONI* FRENTE AO SOBRENADANTE DA CULTURA DO *B. CLAUSII*

Após 45 dias de infecção, vermes adultos foram recuperados assepticamente através da perfusão do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos com salina estéril (NaCl a 0,9% w/v). Imediatamente, casais de vermes foram transferidos para meio RPMI 1640 e em seguida lavados duas vezes com este meio.

Os vermes foram em seguida distribuídos em placas de cultura com 24 poços (dois vermes por poço) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 20 mM HEPES, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal, e incubados a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Duas horas após incubação, para permitir a adaptação dos casais de vermes ao meio de cultura; 300, 200, 100 ou 50 µL do sobrenadante da cultura de *B. clausii* obtidos dos diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h) foram adicionados para um volume final de 2 mL.

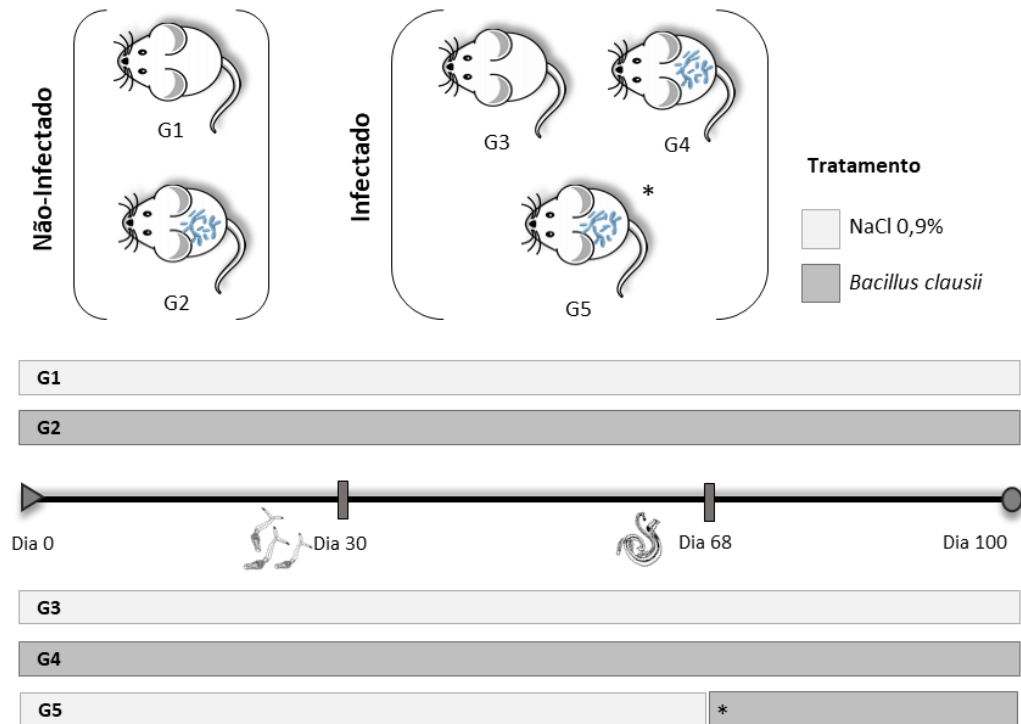
Como grupos controles negativos casais de vermes foram incubados apenas em meio RPMI 1640 suplementado ou em uma solução de 300 μ L de TSB concentrado adicionado ao RPMI 1640 suplementado. O grupo controle positivo foi formado por casais de vermes incubados em 10 μ M de PZQ. Os vermes foram monitorados a cada 24 h durante 5 dias consecutivos para avaliação da taxa de mortalidade e das alterações de motilidade. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos em dois experimentos independentes. A avaliação esquistosomicida foi classificada de acordo com os critérios de Araújo et al. (2019). O tratamento foi considerado letal quando os vermes não exibiram nenhum movimento após observação de 2 minutos.

5.4 ANÁLISE *IN VIVO*

5.4.1 Formação dos grupos experimentais

O ensaio foi realizado durante 100 dias, sendo a exposição dos camundongos as cercárias de *S. mansoni* realizada no 30º dia de experimentação. Camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (G1-G5) com 10 animais cada, como se segue abaixo (Figura 6):

Figura 6 - Formação dos grupos experimentais e esquema de tratamento



Grupos não infectados:

- G1 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1º ao 100º dia.
- G2 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1º ao 100º dia.

Grupos infectados:

- G3 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1º ao 100º dia.
- G4 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1º ao 100º dia.
- G5 – Camundongos que receberam solução salina do 1º até 67º dia, em seguida passaram a serem tratados com esporos de *B. clausii* do 68º dia (38º dia de infecção, início da ovoposição pelo *S. mansoni*) até o 100º dia.

B. clausii foi administrado diariamente por gavagem em dose única de 10^9 UFC/mL em 300 µL. Esta dose foi determinada com base na concentração da formulação Enterogermina®. A intervenção com solução salina foi por gavagem em volume de 300 µL.

5.4.2 Avaliação dos aspectos parasitológicos

Para determinação da carga parasitária, vermes adultos foram recuperados através da perfusão do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos com salina estéril (NaCl a 0,9% w/v). Em seguida, os vermes foram contados e classificados de acordo com o sexo. A percentagem de redução do número de vermes após o tratamento foi calculada como segue:

$$\% \text{ de redução} = (C-V/C) \times 100$$

Onde: C = o número médio de parasitas obtidos a partir de animais infectados não tratados. V = número médio de parasitas obtidos a partir de animais tratados.

Para determinação da carga de ovos nas fezes, no 100º dia de experimento foram coletados individualmente fezes dos camundongos que em seguida foram processados segundo método de Kato-Katz, sendo o número de ovos determinado por grama de fezes (KATZ et al. 1972).

Para determinação da carga de ovos no fígado e no intestino, amostras foram removidas da parte central do lóbulo direito do fígado ou da região média do íleo e processados segundo a técnica de digestão em hidróxido de potássio a 5% (KOH 5%).

Para determinação do padrão de ovoposição, três fragmentos (1cm cada) do intestino delgado foram removidos e processados de acordo com a técnica de oograma (PELLEGRINO et al. 1962). Os ovos foram contados e classificados segundo os seguintes estádios de desenvolvimento: imaturos (ovos em 1º, 2º, 3º e 4º estádios), maduros ou mortos.

5.5 CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS PARA ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Após 100 dias, os baços foram excisados em condições estéreis e macerados individualmente com auxílio de um êmbolo em placas de vidro contendo 2 mL de meio de lavagem (meio RPMI 1640) para obtenção da suspensão de células esplênicas. As

suspensões de células esplênicas, foram lavadas em meio RPMI 1640 e centrifugadas a 400 g por 10 min e 4°C. Hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado, por 20 segundos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF) acrescido de 1% de penicilina e estreptomicina, 0,5mM de L-glutamina (1%). A contagem de células e o teste de viabilidade celular foram determinados com auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10%.

Os esplenócitos, foram então cultivados em tubos de polipropileno na concentração final de 5×10^6 células/mL e incubados em estufa por 48h a 37°C com CO₂ a 5%. As culturas foram mantidas sob ausência de estímulos mitogênicos, estimuladas com Concanavalina A (5 µg/mL) ou com *Bacillus clausii* (5×10^6 esporos/mL). Após 48h as células foram recuperadas para detecção da população de linfócitos T e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C para dosagem dos níveis de citocinas.

5.6 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE LINFÓCITOS T

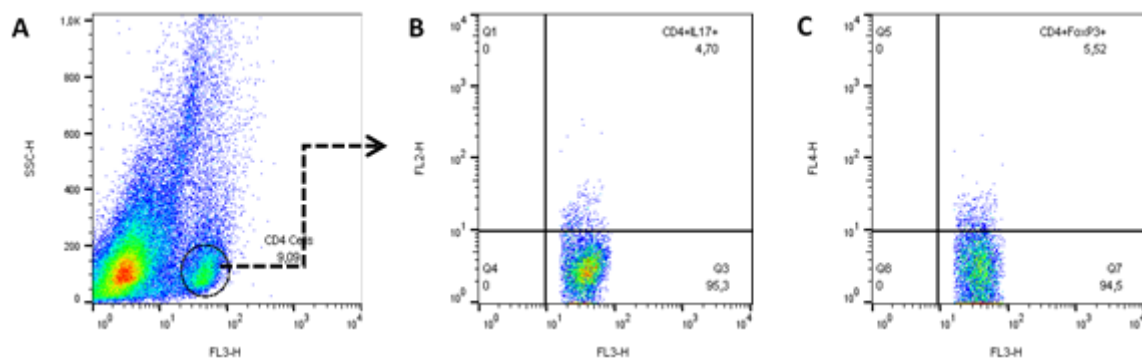
Após 48 horas de cultivo foram adicionados a cada tubo, contendo as suspensões de células esplênicas, 0.5 µL de Golgi Stop (para cada 5×10^6 células). Em seguida as culturas foram agitadas em vórtex e devolvidas a estufa por um intervalo de quatro horas. Passado este período de incubação, as células foram lavadas com 6,0 mL de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado, em seguida foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 400 g por 10 minutos sob a temperatura de 4°C.

A marcação das células Treg/Th17 foi realizada de acordo com as especificações do fabricante para o kit Mouse Th17/Treg Phenotyping Kit BD Pharmingen, USA. A marcação dos linfócitos T foi realizada com anticorpos monoclonais de camundongos conjugados a fluorocromos, sendo eles: CD4 PerCP-Cy5.5 (clone: RM4-5), IL-17A PE (clone: TC11-18H10.1) e Foxp3 Alexa Fluor® 647 (clone: MF23).

As células foram analisadas em um citômetro de fluxo (Citômetro BD FACSCalibur), onde 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. O Software BD

CellQuest™ foi utilizado para aquisição das amostras e as análises foram realizadas através do Software FlowJo™ v10.6.1 (Becton Dickson). A Figura 7 ilustra a estratégia de obtenção dos linfócitos T para determinação da frequência de linfócitos. Linfócitos T CD4+ foram adquiridos utilizando o dot plot SSC *versus* FL3 (CD4 PerCP-Cy5.5) (Figura 7A). Após a aquisição de linfócitos T CD4+ as subpopulações de linfócitos T CD4+IL-17A+ foram adquiridas utilizando o dot plot FL2 (IL-17A PE) *versus* FL3 (Figura 7B), enquanto que as subpopulações de linfócitos T CD4+Foxp3+ foram adquiridas utilizando o dot plot FL4 (Foxp3 Alexa Fluor® 647) *versus* FL3 (Figura 7C).

Figura 7 - Aquisição e análise de Linfócitos T CD4+ (A), CD4+IL17+ (B) e CD4+FoxP3+ (C).



5.7 DOSAGEM DE CITOCINAS

Para determinação da concentração das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , e IL-17A, os sobrenadantes das diferentes culturas foram submetidos a dosagem por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur. O procedimento para dosagem das citocinas, foi realizado de acordo com as especificações do fabricante para o kit BD CBA mouse Th1/Th2/Th17. O Software BD CellQuest™ foi utilizado para aquisição das amostras e as análises foram realizadas através do Software FlowJo™ v10.6.1 (Becton Dickson).

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados numéricos foram analisados com o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla - CA, EUA) e foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). As diferenças estatísticas foram determinadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) em conjunto com o teste de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do *Bacillus clausii* sobre *Schistosoma mansoni*

Resumo

Na ausência de vacina biossegura, o praziquantel (PZQ) é único fármaco empregado no tratamento e controle da esquistossomose, porém, apesar de seguro apresenta limitações como não possuir efeito profilático nem ação contra vermes jovens. Sendo assim, faz-se necessário a busca por novas alternativas para controle e terapia dessa infecção. Nesse contexto, estudos experimentais e clínicos tem demonstrado que probióticos apresentam potencial para prevenção e tratamento de parasitoses. Nossos resultados *in vitro* demonstraram que diferentes volumes (300, 200, 100 ou 50 µL) do sobrenadante livre de células (SLC) obtidos de diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72h) da cultura de *B. clausii* não causou mortalidade nem alterou a motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Quanto aos resultados *in vivo*, a administração oral de esporos de *B. clausii* nos esquemas terapêuticos empregados nos grupos G4 e G5, foi capaz de reduzir a carga de vermes total em 41.5 e 30.1% e de vermes fêmeas em 43.1 e 39.1%, respectivamente. Adicionalmente, o tratamento com *B. clausii* reduziu em 68.7% e 44.3% o número de ovos liberados juntos com as fezes e 34.4 e 50.4% e 21.0 e 3.2% a carga de ovos depositados nos tecidos hepático e intestinal, nos grupos G4 e G5, respectivamente. No entanto, não foi capaz de alterar o padrão de ovoposição. Os presentes achados demonstram que administração de *B. clausii* pode ser eficaz no tratamento e redução da morbidade da esquistossomose mansoni.

Palavra-chave: *Bacillus clausii*, esquistossomose, *Schistosoma mansoni*

1. Introdução

A esquistossomose, infecção causada por trematódeos sanguíneos do gênero *Schistosoma* spp., é endêmica em 78 países e territórios de regiões tropicais e subtropicais, onde cerca de 219.9 milhões de pessoas estão infectadas e outras 779 milhões vivem em áreas de risco constante para infecção. (WHO, 2018). Há quatro espécies de *Schistosoma* com importância na medicina humana, são elas: *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, sendo essa última espécie a mais prevalente no continente africano e a única encontrada na América Central e do Sul, incluindo o Brasil. A patogenia da esquistossomose mansoni, resulta da inflamação granulomatosa decorrente da resposta imune frente aos antígenos dos ovos do parasita retidos na microvasculatura tecidual dos sistemas hepatoesplênico e gastrointestinal (Hams et al., 2013).

Uma vez que ainda não existe a disponibilidade de vacina, o tratamento com praziquantel (PZQ) é o único fármaco empregado no tratamento e controle da esquistossomose. Apesar de ser de baixo custo e biosseguro, apresentar ação contra todas as espécies de *Schistosoma* de importância médica humana e possuir alta taxa de cura parasitológica, o PZQ não possui efeito profilático e nas doses recomendada não possui ação contra vermes jovens. Ademais, é preocupante a existência de um único fármaco para o controle de uma infecção em expansão, além dos relatos de desenvolvimento de cepas de *Schistosoma* resistentes e/ou tolerantes ao PZQ (Aires et al., 2014; Araújo et al. 2019). Este cenário encoraja nosso grupo na busca por novas alternativas no controle e terapia da esquistossomose, com o objetivo de preservar o uso do PZQ ou de fármacos coadjuvante ao PZQ.

Os probióticos, microrganismos que quando administrados em concentrações recomendadas trazem benefícios a saúde (Hill et al., 2014), exercem seus efeitos através da modulação da microbiota intestinal, manutenção e reparo da barreira intestinal e das junções intracelulares, aumento da absorção e metabolização de nutrientes e estimulação do sistema imune (Plaza-diaz et al. 2019). Bactérias próbióticas formadoras de esporos do gênero *Bacillus* possuem inúmeros benefícios para saúde humana, atribuídos a rápida germinação no intestino e resistência ao pH gástrico (Cutting, 2011; Elshaghabee et al. 2017). Dentro desse gênero destaca-se o *Bacillus clausii*, bactéria probiótica, gram-positiva, em forma de bastão, móvel e formadora de esporos, comercializada principalmente na formulação Enterogermina®,

que consiste em um conjugado de quatro cepas de *B. clausii*: O/C, N/R, T e SIN. Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que *B. clausii* é eficaz e seguro na prevenção da diarreia associada ao uso de antibióticos (Nista et al. 2004) e na melhora da disbiose (Pradhan et al. 2019). Além disso, *B. clausii* possui atividades antimicrobiana e imunomodulatória (Urdaci et al. 2004; Dar et al. 2018) e aumenta a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório, permeabilidade intestinal e diferenciação celular (Di Caro et al. 2005).

Com relação ao uso de probióticos no controle de infecções parasitárias, estudos clínicos e experimentais destacam ação contra protozoários como *Giardia lamblia* (Besirbellioglu et al. 2006; Perez et al. 2001; Perrucci et al. 2019), *Cryptosporidium* (Foster et al., 2003; Glass et al., 2004), *Entamoeba histolytica* (Rigothier et al. 1994; Dinleyici et al., 2009; Mohamed et al. 2015) e contra helmintos como *Toxocaras canis* (Chiodo et al., 2010; De Avila et al. 2016) *Strongyloides venezuelensis* (Oliveria-Sequeira et al., 2014) e *Trichinella spiralis* (Bautista-Garfias et al., 2001). Frente ao *S. mansoni*, estudos experimentais têm demonstrado que probióticos atuam na redução da carga de vermes, alteração no padrão de oviposição, redução fragmentação do DNA causado pela infecção e na redução dos danos histológicos causados pelas lesões granulomatosas (Kirte et al., 1996; Santos et al., 2004; Ghanem et al., 2005, Mohamed et al., 2016, Zowail et al., 2012).

Com base no potencial antiparasitário que probióticos apresentam, e na ausência de estudos que explorem o *B. clausii* como candidato esquistossomicida, o presente estudo objetiva investigar a atividade esquistossomicida do conjugado de quatro cepas (O/C, N/R, T e SIN) de *B. clausii*, comercializado como Enterogermina®, sobre o *S. mansoni* através das análises *in vitro*, por meio das alterações de motilidade e da mortalidade, e *in vivo*, através da carga parasitária (total e fêmea), ovos depositados nos tecidos intestinal e hepático, número de ovos nas fezes e padrão de oviposição.

2. Materiais e métodos

2.1 Isolamento de esporos e obtenção do sobrenadante de *Bacillus clausii*

Sobrenadante e esporos de *B. clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN), foram obtidos do medicamento Enterogermina® (Sanofi-Aventis SpA, Milão, Itália). Resumidamente, a solução de uma ampola de Enterogermina® (5mL/10⁹ esporos) foi adicionada à 450 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB – Hemocult I) e em seguida incubada em agitador automático (150 IPM) a 35°C.

Os sobrenadantes empregados para a análise esquistosomocida *in vitro* foram obtidos a partir da cultura de 24, 48 e 72h do *B. clausii* em meio TSB. Para cada tempo de incubação, 20 mL do sobrenadante da cultura foi centrifugado (4000g por 30 min), filtrado (membrana 0.22µm, MF-Millipore, GSWP) e concentrado por evaporação em *Speed Vacuum* (Eppendorf™ Concentrator Plus) a 30°C durante 5 h, em condições estéreis, obtendo volume final de 4 mL. O tempo de incubação e a obtenção dos sobrenadantes finais empregados foram adaptados dos estudos de Urdaci et al. (2004), Perrucci et al. (2019) e Lim et al. (2018).

Os esporos empregados para o tratamento *in vivo* foram obtidos a partir da cultura de 72h. Resumidamente, a cultura foi centrifugada (4000g por 30 min) e os esporos ressuspensos em solução salina estéril e plaqueados em ágar nutritivo para padronização das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), de forma a obter concentração final de 10⁹ esporos/mL. As soluções de esporos foram mantidas em frascos individuais de 5 mL hermeticamente fechados, em temperatura ambiente até administração.

2.2 Animais, infecção pelo *Schistosoma mansoni* e considerações éticas

Camundongos fêmeas, *Swiss Webster*, 30 dias de idade, pesando entre 28-30g, foram obtidas e mantidas no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami em condições padrões de criação (25°C e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) com acesso a ração (Labina®/Purina, São Paulo) e água *ad libitum*. Camundongos foram infectados percutâneamente com *Schistosoma mansoni* cepa BH (Belo Horizonte - MG, Brasil). Essa cepa é mantida no setor de Imunoregulação das Doenças Infecto-parasitárias e dos Fármacos Antiparasitários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, através de passagens sucessivas em

Biomphalaria glabrata e camundongos *Swiss Webster*. Para a análise *in vitro* 10 camundongos foram infectados com 120 cercárias. Para a análise *in vivo* 30 camundongos foram infectados com 50 cercárias e outros 20 camundongos foram mantidos livres da exposição cercariana. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (CEE/UFPE) sob processo de nº 23076.016405/2016-57.

2.3 Exposição *in vitro* do *S. mansoni* frente ao sobrenadante da cultura do *B. clausii*

Após 45 dias de infecção, vermes adultos foram recuperados assepticamente através da perfusão do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos com salina estéril (NaCl a 0,9% w/v). Imediatamente, casais de vermes foram transferidos para meio RPMI 1640 e em seguida lavados duas vezes com este meio. Os vermes foram em seguida distribuídos em placas de cultura com 24 poços (dois vermes por poço) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 20 mM HEPES, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal, e incubados a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Duas horas após incubação, para permitir a adaptação dos casais de vermes ao meio de cultura; 300, 200, 100 ou 50 µL do sobrenadante da cultura de *B. clausii* obtidos dos diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h) foram adicionados para um volume final de 2 mL.

Como grupos controles negativos casais de vermes foram incubados apenas em meio RPMI 1640 suplementado ou em uma solução de 300 µL de TSB concentrado adicionado ao RPMI 1640 suplementado. O grupo controle positivo foi formado por casais de vermes incubados em 10 µM de PZQ.

Os vermes foram monitorados a cada 24 h durante 5 dias consecutivos para avaliação da taxa de mortalidade e das alterações de motilidade. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos em dois experimentos independentes. A avaliação esquistossomicida foi classificada de acordo com os

critérios de Araújo et al. (2019). O tratamento foi considerado letal quando os vermes não exibiram nenhum movimento após observação de 2 minutos.

2.4 Análise *in vivo*

2.4.1 Formação dos grupos experimentais

O ensaio foi realizado durante 100 dias, sendo a exposição dos camundongos as cercárias de *S. mansoni* realizada no 30º dia de experimentação. Camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (G1-G5) com 10 animais cada, como se segue abaixo:

Grupos não infectados:

G1 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1º ao 100º dia.

G2 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1º ao 100º dia.

Grupos infectados:

G3 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1º ao 100º dia.

G4 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1º ao 100º dia.

G5 – Camundongos que receberam solução salina do 1º até 67º dia, em seguida passaram a serem tratados com esporos de *B. clausii* do 68º dia (38º dia de infecção, início da ovoposição pelo *S. mansoni*) até o 100º dia.

B. clausii foi administrado diariamente por gavagem em dose única de 10⁹ UFC/mL em 300 µL. Esta dose foi determinada com base na concentração da formulação Enterogermina®. A intervenção com solução salina foi por gavagem em volume de 300 µL.

2.4.2 Avaliação dos aspectos parasitológicos

Para determinação da carga parasitária, vermes adultos foram recuperados através da perfusão do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos com salina estéril (NaCl a 0,9% w/v). Em seguida, os vermes foram contados e classificados de acordo com o sexo. A percentagem de redução do número de vermes após o tratamento foi calculada como segue:

$$\% \text{ de redução} = (C-V/C) \times 100$$

Onde: C = o número médio de parasitas obtidos a partir de animais infectados não tratados. V = número médio de parasitas obtidos a partir de animais tratados.

Para determinação da carga de ovos nas fezes, no 100º dia de experimento foram coletados individualmente fezes dos camundongos que em seguida foram processados segundo método de Kato-Katz, sendo o número de ovos determinado por grama de fezes (KATZ et al. 1972).

Para determinação da carga de ovos no fígado e no intestino, amostras foram removidas da parte central do lóbulo direito do fígado ou da região média do íleo e processados segundo a técnica de digestão em hidróxido de potássio a 5% (KOH 5%).

Para determinação do padrão de ovoposição, três fragmentos (1cm cada) do intestino delgado foram removidos e processados de acordo com a técnica de oograma (PELLEGRINO et al. 1962). Os ovos foram contados e classificados segundo os seguintes estádios de desenvolvimento: imaturos (ovos em 1º, 2º, 3º e 4º estádios), maduros ou mortos.

2.5 Análises estatísticas

Os dados numéricos foram analisados com o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA) e foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). As diferenças estatísticas foram determinadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) em conjunto com o teste de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$.

3. Resultados

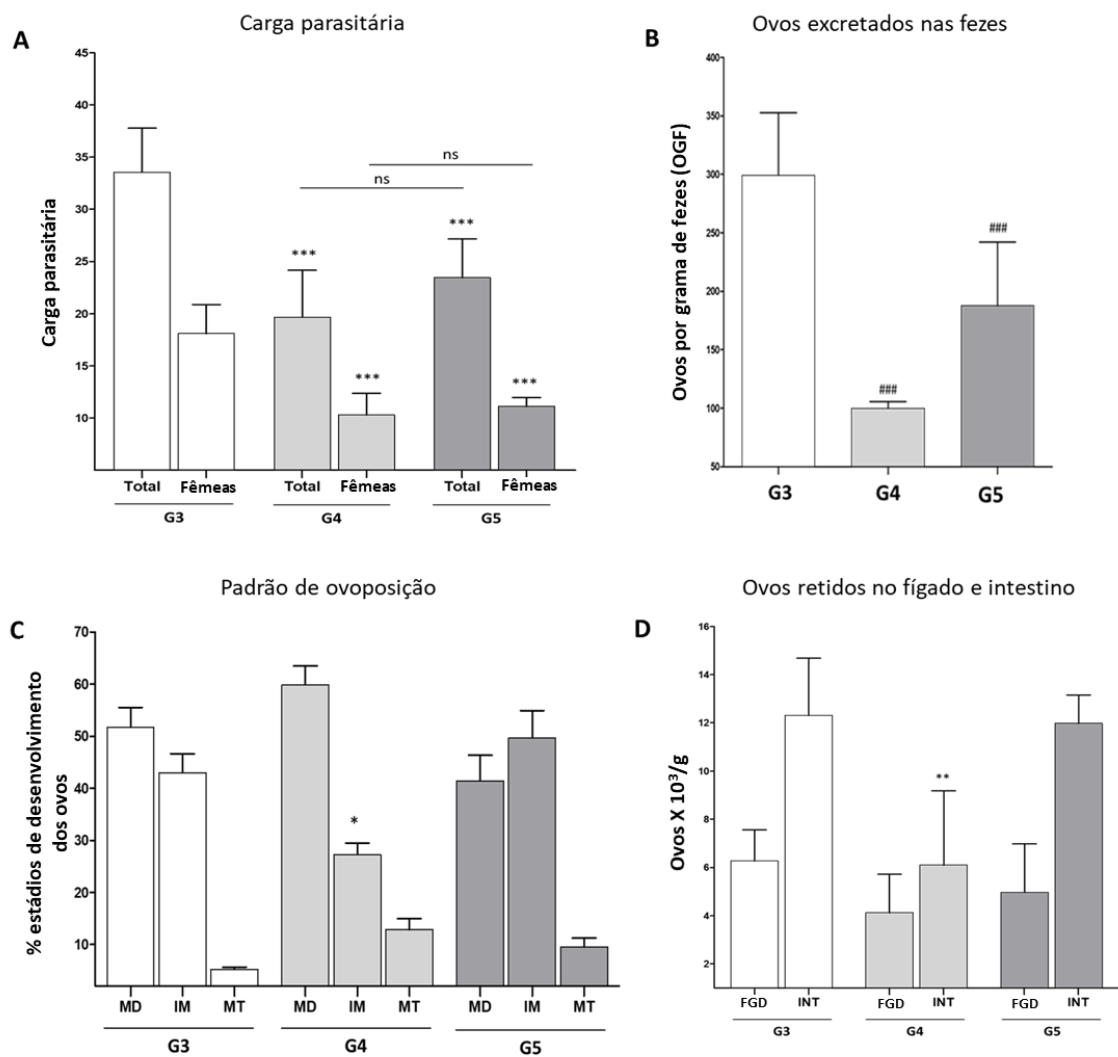
3.1 *In vitro*, o sobrenadante livre de células (SLC) da cultura de *B. clausii*, não causa mortalidade nem altera movimento de vermes adultos de *S. mansoni*

Em todos os intervalos de observação (24, 48, 72, 96 e 120h), casais de vermes adultos de *S. mansoni* incubados nos diferentes volumes de sobrenadantes coletados em diferentes intervalos de incubação (24, 48 e 72h) exibiram superfície e topografia corporal sem alterações, movimentos típicos, peristaltismo dos órgãos internos e ventosas em movimento; aspectos semelhantes aos vermes dos controles RPMI suplementado e RPMI+TSB. PZQ causou ausência de movimentos dos casais de vermes após 24 h de incubação.

3.2 Esporos de *B. clausii*, reduzem a carga parasitária, o número de ovos eliminados nas fezes e depositados nos tecidos hepático e intestinal, porém, não é capaz de modificar o padrão de ovoposição

B. clausii nos esquemas terapêuticos empregados nos grupos G4 e G5 reduziu a carga de vermes total em 41.5 e 30.1% e de vermes fêmeas em 43.1 e 39.1%, respectivamente (Figura 1A). Adicionalmente, o tratamento com *B. clausii* reduziu 68.7% e 44.3% o número de ovos liberados juntos com as fezes nos grupos no grupo G4 e G5, respectivamente (Figura 2B). No entanto, a intervenção terapêutica com *B. clausii* não alterou o padrão de ovoposição, uma vez que nos grupos G4 e G5 todos os estádios de ovos (maduro, imaturos [I, II, III, e IV] e mortos) foram visualizados no tecido intestinal, similarmente ao grupo controle positivo. Porém, nos grupos tratados com *B. clausii* observamos aumento percentual de ovos mortos (Figura 1C). Ademais, os grupos G4 e G5 exibiram redução da carga de ovos depositados nos tecidos hepático e intestinal em 34.4 e 50.4% e 21.0 e 3.2%, respectivamente (Figura 1D).

Figura 1 - Efeito do tratamento com *Bacillus clausii* (10^9 UFC/ml) em diferentes esquemas terapêuticos (G4 e G5) sobre a carga parasitária (A), número de ovos excretados nas fezes (B), padrão de ovoposição (C) e número de ovos retidos no fígado e intestino (D) de camundongos infectados com *S. mansoni*. ns resultado não significativo. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, ## $p < 0.002$, ### $p < 0.0002$, quando comparado com o grupo G3. MD = ovos maduros, IM = ovos imaturos, MT = ovos mortos. FDG = Fígado, INT = Intestino.



4. Discussão

Esse é o primeiro estudo, *in vitro* e *in vivo*, que explora a formulação comercial Enterogermina® constituída de esporos de *B. clausii* cepas O/C, N/R, T e SIN como nova alternativa contra *S. mansoni*. Uma das principais características dos probióticos,

incluindo do gênero *Bacillus*, é a síntese de metabólitos que apresentam atividades anti-inflamatória (Matsumoto & Benno, 2006), antioxidante (De Marco, et al. 2018) e principalmente antimicrobiana (Lim et al., 2018; Abdelhamid et al. 2018, Prabhurajeshwar & Chandrakanth, 2019). Lippolis et al. (2013), ao analisarem os secretomas das cepas O/C, N/R, T e SIN do *B. clausii*, obtidas do Enterogermina®, demonstraram variações na expressão das proteínas secretadas, no entanto os autores sugerem que apesar da diferença no perfil dos metabolitos produzidos, os efeitos farmacológicos e biológicos são atribuídos ao conjunto dos metabólitos produzidos pelas cepas do *B. clausii*.

Nosso estudo *in vitro*, destaca que o SLC de *B. clausii* não causou mortalidade nem alterações na motilidade de casais de vermes adultos de *S. mansoni*, os vermes mostravam scores de motilidade semelhante aos casais de vermes do grupo controle negativo do estudo de Araújo et al. (2019). Por outro lado, estudos *in vitro* empregando outros modelos experimentais reportaram atividade do SLC produzidos por diferentes probióticos, na redução do crescimento e aderência de trofozoítos de *Giardia* spp. (Perez et al. 2001; Perrucci et al. 2019), redução na viabilidade e infectividade de oocistos de *Cryptosporidium* spp., (Foster et al., 2003; Glass et al., 2004), redução do crescimento de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (Rigothier et al. 1994; Mohamed et al., 2015) e na redução da viabilidade de larvas de *Toxocara canis* (Chiodo et al., 2010; De Avila et al. 2016).

Uma vez que *in vitro* o SLC de *B. clausii* não apresentou ação direta contra vermes adultos de *S. mansoni*, hipotetizamos que esporos de *B. clausii* administrados por via oral em camundongos albergando diferentes fases de desenvolvimento do *S. mansoni*, 30 dias antes da infecção (G4, efeito protetor antes da exposição cercariana) e 38º dia após infecção (G5, início da oviposição), poderia atuar de forma indireta sobre os parâmetros parasitários. Ainda não se sabe quais são os possíveis mecanismos de ação que *B. clausii* apresenta contra *S. mansoni*. Entretanto, acreditamos que a resposta imune inespecífica induzida por *B. clausii* seja uma possibilidade. Essa hipótese é corroborada com estudos que reportam que probióticos possuem capacidade de induzir respostas imunes protetivas inespecífica (Isolauri et al. 2001). Com relação a atividade antihelmintica, Dvornoznakova et al. (2016), demonstraram que probióticos *Enterococcus faecium* AL41/CCM8558, *Enterococcus durans* ED26E/7, *Lactobacillus plantarum* 17L/1 e *Lactobacillus fermentum*

AD1/CCM7421 reduziram a carga parasitária de camundongos infectados com *Trichinella spiralis*, esses autores sugerem que a ação contra *T. spiralis* foi através do aumento do estresse oxidativo e da fagocitose por polimorfonucleares sanguíneos. Já o aumento da expressão de genes da IL-12 e IFN- γ foi o mecanismo de ação sugerido por De Avila et al. (2016), para a redução do número de larvas de *Toxocaras canis* em camundongos tratados com probiótico *Saccharomyces boulardii*.

O *B. clausii* no esquema terapêutico adotado nos grupos G4 e G5 reduziu a carga total de vermes em 41,5 e 30,1% e as fêmeas em 43,1 e 39,1%, respectivamente. Teixeira et al. (1996) em modelo murino, demonstraram que o imunopotenciador não-específico *Corynebacterium parvum*, reduziu em 44 e 21% a carga parasitária de vermes adultos de *S. mansoni* quando a intervenção terapêutica foi realizada em esquema profilático (30 dias antes da infecção) e curativo (30 dias após infecção), respectivamente, e a redução da carga de vermes foi atribuída ao aumento da atividade de polimorfonucleares. Santos et al. (2004), demonstraram que o probiótico *Zymomonas mobilis* administrado em esquemas terapêutico profilático (7 dias antes da infecção) e curativo (7 dias após infecção) foi capaz de reduzir 24 e 61% a carga de vermes de *S. mansoni*, respectivamente. Mohamed et al. (2016), demonstraram que o tratamento semanal pós-infecção com *S. mansoni* durante 8 semanas com *Lactobacillus sporogenes* 415722, reduziu em 53.1% a carga de vermes. Recentemente, El-Khadragy et al. (2019) ao avaliarem *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20080 em esquema terapêutico profilático (7 dias antes da infecção) demonstraram uma redução de 72.4% da carga parasitária de camundongos infectados com *S. mansoni*.

Nossos resultados mostraram aumento de ovos mortos no tecido intestinal e redução no número de ovos liberados junto com as fezes e retidos no tecido hepático e intestinal. Esses achados corroboram com outros estudos onde camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com probióticos exibiram redução na quantidade de ovos retidos nos tecidos hepático e intestinal e modificação no padrão de ovoposição através da redução de ovos imaturos e aumento de ovos mortos no tecido intestinal (El-Khadragy et al. 2019; Mohamed et al. 2016). Sabe-se que além da redução da carga parasitária, é desejado que novas alternativas esquistossomicidas levem a redução de ovos eliminados junto as fezes, fazendo assim com que o ciclo biológico do *S. mansoni* seja interrompido, além da redução de ovos retidos nos

tecidos hepático e intestinal, visto que os antígenos secretados pelos ovos são responsáveis por induzir inflamação granulomatosa e consequentemente redução da morbidade esquistossomose.

5. Conclusão

Nossos resultados demonstram que o *B. clausii*, *in vitro*, não possui ação direta contra o *S. mansoni* e que o tratamento com esporos de *B. clausii* modulou favoravelmente os aspectos parasitológicos na infecção experimental por *S. mansoni*. No entanto, estudos adicionais serão fundamentais para a elucidação do exato mecanismo de ação do *Bacillus clausii* sobre o *Schistosoma mansoni*.

6. Referências

Abdelhamid, A. G.; Esaam, A.; hazaa, M. M. 2018. Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant *E. coli*. Saudi Pharmaceutical Journal 26, 603–607. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.03.004>.

Aires, A.L.; Ximenes, E.C.P.A.; Silva, R.A.R.; Barbosa, V.X.; Goes, A.J.S.; Peixoto, C.A.; Souza, V.M.O.; Albuquerque, M.C.P.A. 2014. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. Experimental Parasitology 142, 83-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.010>.

Akpom, C. A.; Warren, K. Calorie and protein malnutrition in chronic murine schistosomiasis mansoni: effect on the parasite and the host. 1975. The Journal of Infectious Diseases 132, 6-14. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/132.1.6>.

Isolauri, E.; Sutas, Y.; Kankaanpää, P.; Arvilommi, H.; Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. American Journal Clinical Nutrition 73, 444–450. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.444s>.

Araújo, H.D.A.; Aires, A.L.; Soares, C.L.R.; Brito, T.G.S.; Nascimento, W.M.; Martins, M.C.B.; Silva, T.G.; Brayner, F.A.; Alves, L.C.; Silva, N.H.; Albuquerque, M.C.P.A.;

Lima, V.L.M. 2019. Usnic acid potassium salt from *Cladonia substellata* (Lichen): Synthesis, cytotoxicity and in vitro anthelmintic activity and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 192, 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.024>.

Bautista-Garfias, C.R.; Ixta-Rodrigues, O.; Martinez-Gomez, F.; Lopez, M. G.; Aguilar-Figueroa, B. R. 2001. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite* 8, 226-228. DOI: <https://doi.org/10.1051/parasite/200108s2226>.

Besirbellioglu, B. A.; Ulcay, A.; Can, M.; Erdem, H.; Tanyuksel, M.; Avci, I. Y.; Araz, E.; Pahsa, A. 2006. *Saccharomyces boulardii* and infection due to *Giardia lamblia*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 38, 479-481. DOI: <https://doi.org/10.1080/00365540600561769>.

Chiodo, P.G.; Sparo, M.D.; Pezzani, B.C.; Minvielle, M.C.; Basualdo, J.A. 2010. *In vitro* and *in vivo* effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121 on *Toxocara canis*. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 105, 615-620. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000500003>.

Cutting, S. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 28, 214-220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>.

Dar, H.Y.; Pal, S.; Shukla, P. Mishra, P.K.; Tomar, G.B.; Chattopadhyay, N.; Srivastava, R.K. 2018. *Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice. *Nutrition* 54, 118-128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.02.013>.

De Avila, L.F.D.C.; De Leon, P.M.M.; De Moura, M.Q.; Berne, M.E.A.; Scaini, C.J.; Leivas-Leite, F.P. 2016. Modulation of IL-12 and IFN- γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunology* 38, 326–330. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12314>.

De Marco, S.; Sichiatti, M.; Muradyan, D.; Piccioni, M.; Traina, G.; Pagiotti, R.; Pietrlla, D. 2018. Probiotic cell-free supernatants exhibited anti-Inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1756308>.

Di Caro, S.; Tao, H.; Grillo, A.; Franceschi, F.; Chiara, E.; Zocco, M.A.; Gasbarrini, G.; Sepulveda, A.R.; Gasbarrini, A. 2005. *Bacillus clausii* effect on gene expression

pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17, 951-960. DOI: <https://doi.org/10.1097/00042737-200509000-0001>.

Dinleyici, E. C.; Eren, M.; Yargic, Z. A.; Dogan, N.; Vandenplas, Y. 2009. Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* and metronidazole compared to metronidazole alone in children with acute bloody diarrhea caused by amebiasis: a prospective, randomized, open label study. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 80, 953-955. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.953>.

Dvoroznakova, E.; Buckova, B.; Hurnikova, Z.; Revajova, V.; Laukova, A. 2016. Effect of probiotic bacteria on phagocytosis and respiratory burst activity of blood polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology* 15, 69-76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.004>.

El-Khadragy, M.F.; Al-Olayan, E.M.; Elmallah, M.I.Y.; Alharbi, A.M.; Yehia, H.M.; Moneim, A.E.A. 2019. Probiotics and yogurt modulate oxidative stress and fibrosis in livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19, 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2406-3>.

Elshaghabee, F.M.F.; Rokana, N.; Gulhane, R.; Sharma, C.; Panwar, H. 2017. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* 8, p. 1-15. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>.

Foster, J.C.; Glass, M.D.; Courtney, P.D.; Ward, L.A. 2003. Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Food Microbiology* 20, 351–357. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00120-X).

Ghanem, K.Z.; Abdel-Salam, A.M.; Magharby, A.S. 2005. Immunoprophylactic effect of probiotic yoghurt feeding on *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 14, 123–126.

Glass, M.D.; Courtney, P.D.; Lejeune, J.T.; Ward, L.A. 2004. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatants on *Cryptosporidium* viability and infectivity *in vitro*. *Food Microbiology* 21, 423–429. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.001>.

Hams, E.; Aviello, G. Fallon, P.G. 2013. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Frontiers in Immunology* 4, 1-8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00089>.

Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; Calder, P.C.; Sanders, M.E. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature* 11, 506–514. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

Katz, N.; Chaves, A.; Pellegrino, P. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *schistosomiasis mansoni*. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 14, 397-400.

Kirte, M.T.; Coutinho, E.M.; Abath, F.G.C.; Montenegro, S.M.L. 1996. Effects of non-specific immunopotentiators in experimental *S. mansoni* infection. II. *Corynebacterium parvum*. *Revista Instituto Medicina Tropical* 38, 359-364. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651996000500007>.

Knauf, R.F.; Warren, K. S. 1969. The effect of calorie and protein malnutrition on both the parasite and the host in acute murine *schistosomiasis mansoni*. *The Journal of Infectious Diseases* 120, 560-575. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/120.5.560>.

Lim, H.S.; Yeu, J.E.; Hong, S.P.; Kang, M.S. 2018. Characterization of antibacterial cell-free Supernatant from oral care probiotic *Weissella cibaria*, CMU. *Molecules* 23, 1-13. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23081984>.

Lippolis, R.; Siciliano, R.A.; Mazzeo, M.F.; Abbrescia, A.; Gnoni, A.; Sardanelli, A.M.; Papa, S. 2013. Comparative secretome analysis of four isogenic *Bacillus clausii* probiotic strains. *Proteome Science* 11, 1-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1477-5956-11-28>.

Matsumoto, M.; Benno, Y. 2006. Anti-inflammatory metabolite production in the gut from the consumption of probiotic yogurt containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 70, 1287–1292. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.50464>.

Mohamed, A.H.; Osman, G.Y.; Zowail, M.E.; El-Esawy, H.M. 2016. Effect of *Lactobacillus sporogenes* (probiotic) on certain parasitological and molecular aspects in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Journal of Parasitic Diseases* 40, 823–832. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0586-4>.

Mohamed, S.T.; Khalaf, K.J.; Sulaiman, N.M. 2015. *Lactobacillus salivarius* bacteriocin and supernatant activity against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Biology, Health and Medical Science Research* 3, 19-28.

Nista, E.C.; Candelli, M.; Cremonini, F.; Cazzato, I.A.; Zocco, M.A.; Franceschi, F.; Cammarota, G.; Gasbarrini, G.; Gasbarrini, A. 2004. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 20, 1181-1188. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02274.x>.

Oliveira-Sequeira, T.C.G.; David, E.B.; Ribeiro, C.; Guimaraes, S.; Masseno, A. P.B.; Katagiri, S.; Sequeira, J.L. 2014. Effect of *Bifidobacterium animalis* on mice infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Revista Instituto Medicina Tropical* 56, 105-109. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000200003>.

Pellegrino, J.; Katz, N. 1974. Estudo de alguns aspetos da esquistossomose mansoni em macacos cibus pelo método do oograma quantitativo. *Revista Instituto Medicina Tropical* 16, 245-258.

Perez, P.F.; Minnaard, J.; Rouvet, M.; Knabenhans, C.; Brassart, D.; De Antoni, G.; Schiffrin, E. 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from Lactobacilli: an *in vitro* study. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5037–5042. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.11.5037-5042.2001>.

Perrucci, S.; Fichi, G.; Ricci, E.; Galosi, L.; Lalle, M.; Rossi, G. 2019. *In vitro* and ex vivo evaluation of the anti-*Giardia duodenalis* activity of the supernatant of Slab51 (SivoMixx). *PlosOne* 14, 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213385>.

Plaza-Diaz, J.; Ruiz-Ojeda, F.; Gil-Campos, M.; Gil, A. 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition* 10, 49–66. DOI: <https://doi.org/10.1159/000342079>.

Prabhurajeshwar, C.; Chandrakanth, K. 2019. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria *in vitro* by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental* 23, 97-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.10.001>.

Pradhan, B.; Guha, D.; Naik, A.K.; Banerjee, A. Tambat, S.; Chawla, S.; Senapati, S.; Aich, P. Probiotics *L. acidophilus* and *B. clausii* modulate gut microbiota in Th1- and Th2-biased mice to ameliorate *Salmonella typhimurium*-induced diarrhea. *Probiotics and Antimicrobial proteins* 11, 887-904. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9436-5>.

Rigothier, M.C.; Maccario, J.; Gayral, P. 1994. Inhibitory activity of *Saccharomyces* yeasts on the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes *in vitro*. *Parasitol Res* 80, 10-15. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00932617>.

Santos, J.F.M.; Vasconcelos, J.; Souza, J.R.; Coutinho, E.M.; Montenegro, S.M.L.; Azevedo-Ximenes, E. 2004. The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822004000600015>.

Sheridan, P.O.; Bindels, L.B.; Sauinier, D.M.; Reid, G.; Nova, E.; Holmgren, K.; O'toole, P.W.; Brunn, J.; Delzenne, N.; Scott, K.P. 2014. Can prebiotics and probiotics improve therapeutic outcomes for undernourished individuals? *Gut Microbes* 5, 74–82. DOI: <https://doi.org/10.4161/gmic.27252>.

Texeira, K.M.; Coutinho, E.M.; Abath, F.G.C.; Montenegro, S.M.L. 1996. Effects of non-specific immunopotentiators in experimental *Schistosoma mansoni* infection. II. *Corynebacterium parvum*. *Revista do Instituto Medicina Tropical* 38, 359-363. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822004000600015>.

Urdaci, M.C.; Bressolier, P. Pinchuk, I. 2004. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol* 38, 86-90. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000128925.06662.69>.

WHO - World Health Organization, 2018. Weekly Epidemiological Record. Schistosomiasis and Soil-transmitted Helminthiasis: Number of People Treated in 2017. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/276933/WER9350.pdf?ua=1> (Accessed 15 October 2019).

Zowail, M.E.M.; Osman, G.Y.; Zowail, M.E.; El-Esawy, H.M. 2012. Protective role of *Lactobacillus sporogenes* (probiotic) on chromosomal aberrations and DNA fragmentation in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Parasitology* 8, 121–130.

6.2 ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO PARA A REVISTA *BENEFICIAL MICROBES*

Bacillus clausii modula a produção de citocinas Th1/Th2/Th17 e frequência células T CD4⁺Foxp3⁺ e T CD4⁺IL17⁺ durante a esquistossomose mansoni experimental

Resumo

O efeito imunomodulador do *Bacillus clausii* foi observado apenas em estudos experimentais e clínicos de doenças inflamatórias e alérgicas, não havendo relatos na literatura do uso desse probiótico sobre a imunopatologia da esquistossomose. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial dos esporos de *Bacillus clausii* (cepas O/C, N/R T e SIN) em modular a resposta imune durante a infecção experimental por *S. mansoni*. Camundongos foram distribuídos em cinco grupos experimentais, separados de acordo com exposição cercariana e esquema terapêutico adotado (não infectados: G1 e G2, infectados: G3, G4 e G5). O tratamento com *B. clausii* diminuiu os níveis de IL-4 no grupo G4 e aumentou no grupo G5. Em relação a IL-10, foi visto que grupos G4 e G5 apresentaram níveis mais elevados dessa citocina. *B. clausii* reduziu níveis de IFN- γ e de TNF nos grupos G4 e G5. Os níveis de IL-17 foram significativamente maiores no grupo G4 e G5. Tratamento com *B. clausii* reduziu os níveis de IL-6 nos grupos G4 e G5. O tratamento com *B. clausii* aumentou a frequência de células CD4+Foxp3+ nos animais dos grupos G2 e G4, quando comparado com os grupos G1 e G3. Quanto a frequência de células CD4+IL17+, foi visto que o tratamento com *B. clausii* induziu aumento na frequência dessas células nos animais dos grupos G2, G4 e G5. *B. clausii* é capaz de modular em diferentes momentos da infecção produção de citocinas Th1/ThTh17 assim como a frequência de células T CD4+Foxp3+ na dependência de infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

Palavras chaves: probióticos; *Bacillus clausii*; *Schistosoma mansoni*; imunomodulação

1. Introdução

A microbiota intestinal tem um efeito contínuo e dinâmico no sistema imunológico do hospedeiro. As bactérias são fundamentais no desenvolvimento de respostas inatas e adaptativas protetoras contra patógenos e manutenção das vias regulatórias da mucosa (Belkaid & Harrison, 2017). Evidências crescentes destacam

a importância da microbiota intestinal na patogênese da esquistossomose mansoni. Holzschneider et al. (2013) demonstraram que a administração de antibióticos e antimicóticos de amplo espectro em camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni*, resultou em redução substancial da inflamação intestinal e do desenvolvimento do granuloma. Além disso, os autores relataram que respostas imunes específicas contra o *Schistosoma* foram alteradas quando avaliaram a produção de citocinas dos camundongos infectados com depleção da microbiota ao estimular *in vitro* com SEA ou α CD3 linfócitos dos linfonodos mesentéricos. Demonstrou-se redução dos níveis de IFN- γ e IL-10 e apesar de não significativo aumento de IL-13.

Considerando a importância da microbiota intestinal para homeostasia do indivíduo, alterar sua composição pode ser uma alternativa útil na prevenção e tratamento de diversas enfermidades intestinais e extraintestinais, como também aquelas causadas por parasitas (König & Brummer, 2014; Vitetta et al. 2016; Taylor, 2019). Uma das formas de alteração da microbiota consiste no uso de probióticos, microrganismos que quando administrados em concentrações recomendadas são capazes de trazer benefícios à saúde (HILL et al. 2015).

Os probióticos exercem seus benefícios por diversos mecanismos de ação, como: 1) manutenção e reparo da barreira intestinal e junções intracelulares (Hsieh et al. 2015; Resta-Lenert et al. 2003); 2) modulação da microbiota via competição por sítios de adesão, nutrientes e produção de compostos antimicrobianos (Musikasang et al. 2012); 3) aumento da absorção e metabolização de nutrientes; 4) modulação do metabolismo microbiano (Almeida et al. 2012; Dubey & Patel, 2018; Irvine et al. 2011; Leblanc et al. 2017); 5) estimulação do sistema imune do hospedeiro a partir do aumento da frequência de linfócitos B e IgA, aumento ou diminuição da atividade de macrófagos e células dendríticas, e estimulação de células Th e Treg (Drakes et al. 2004; Foligne et al. 2007; Kim et al. 2014; Konieczna et al. 2012; O'Mahony et al. 2008)

Bactérias probióticas do gênero *Bacillus* possuem diversos benefícios à saúde humana (Cutting, 2011; Elshaghabe et al. 2017). Dentro desse gênero destaca-se o *Bacillus clausii* bastonete gram-positivo, aeróbio, móvel e formador de esporos comumente encontrado associado à microbiota do solo. Comercialmente o *Bacillus clausii* é conhecido como Enterogermina® (Sanofi-Aventis SpA), formulação

constituída por esporos de quatro cepas de *Bacillus clausii*: O/C, N/R, T e SIN (Lopetuso et al. 2016).

Os benefícios obtidos com o uso do *B. clausii* são atribuídos a sua atividade antimicrobiana (Urdaci et al. 2004), prevenção da diarreia associada ao uso de antibióticos (Nista et al. 2004), melhora da disbiose intestinal (Pradhan et al. 2019) e produção de metabolitos, com destaque para a flagelina, proteína estrutural dos flagelos com potencial de induzir respostas imunes pró-inflamatória através da indução da secreção de IL-8 e β -defensina humana (Lippolis et al. 2013). O *B. clausii* também exerce seus benefícios através de seu potencial imunomodulatório. Pacientes com esofagite tratados com *B. clausii* demonstraram aumento na expressão dos genes para IL-13, IL-1 β e seu receptor e redução da expressão de genes para a IL-6 e receptor de IL-15 (Di Caro et al. 2005). Em outro estudo o *B. clausii* reduziu os níveis de IL-4 e a frequência de eosinófilos e aumentou a produção de IFN- γ , IL-12, IL-10 e TGF- β em crianças com rinite alérgica (Ciprandi et al. 2004). Foi visto também em camundongos BALB/c com osteoporose pós-menopausa, que o tratamento com *B. clausii* aumentou a produção de IL-10 e frequência de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺), ao passo que inibiu simultaneamente a ativação de células Th17 (CD4⁺RoryT) e secreção de citocinas IL-6, IL-17 e TNF- α (Dar et al. 2018).

Com base no potencial imunomodulatório do *B. clausii*, o presente estudo avaliou o conjugado de quatro cepas (O/C, N/R, T e SIN) do *B. clausii* comercializado como Enterogermina[®] quanto a sua capacidade de modular a resposta imune frente a infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolamento de esporos e obtenção do sobrenadante de *Bacillus clausii*

Esporos de *B. clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN), foram obtidos do Enterogermina[®] (Sanofi-Aventis SpA, Milão, Itália). Resumidamente, a solução de uma ampola de Enterogermina[®] (5mL/10⁹ esporos) foi adicionada à 450 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB – Hemocult I) e incubada em agitador automático (150 IPM) a 35°C por 72h. Em seguida a cultura foi centrifugada (4000g por 30 min) e os esporos

ressuspendidos em solução salina estéril e plaqueados em ágar nutritivo para padronização das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), de forma a obter concentração final de 10^9 esporos/mL. As soluções de esporos foram mantidas em frascos individuais de 5 mL hermeticamente fechados, em temperatura ambiente até administração.

2.2 Animais, infecção pelo *Schistosoma mansoni* e considerações éticas

Camundongos fêmeas, *Swiss Webster*, 30 dias de idade, pesando entre 28-30g, foram obtidas e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami em condições padrões de criação (25°C e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) com acesso a ração (Labina®/Purina, São Paulo) e água *ad libitum*. Camundongos foram infectados percutâneamente com *Schistosoma mansoni* cepa BH (Belo Horizonte - MG, Brasil). Essa cepa é mantida no setor de Imunoregulação das Doenças Infecto-parasitárias e dos Fármacos Antiparasitários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, através de passagens sucessivas em *Biomphalaria glabrata* e camundongos *Swiss Webster*. Para a análise, 30 camundongos foram infectados com 50 cercárias e outros 20 camundongos foram mantidos livres da exposição cercariana. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (CEE/UFPE) sob processo de nº 23076.016405/2016-57.

2.3 Formação dos grupos experimentais

O ensaio foi realizado durante 100 dias, sendo a exposição dos camundongos as cercárias de *S. mansoni* realizada no 30º dia de experimentação. Camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (G1-G5) com 10 animais cada, como se segue abaixo:

Grupos não infectados:

- G1 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1º ao 100º dia.

- G2 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1º ao 100º dia.

Grupos infectados:

- G3 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1º ao 100º dia.
- G4 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1º ao 100º dia.
- G5 – Camundongos que receberam solução salina do 1º até 67º dia, em seguida passaram a serem tratados com esporos de *B. clausii* do 68º dia (38º dia de infecção, início da ovoposição pelo *S. mansoni*) até o 100º dia.

B. clausii foi administrado diariamente por gavagem em dose única de 10^9 UFC/mL em 300 µL. Esta dose foi determinada com base na concentração da formulação Enterogermina®. A intervenção com solução salina foi por gavagem em volume de 300 µL.

2.3 Cultura de células esplênicas para ensaios de citometria de fluxo

Após 100 dias, os baços foram excisados em condições estéreis e macerados individualmente com auxílio de um êmbolo em placas de vidro contendo 2 mL de meio de lavagem (meio RPMI 1640) para obtenção da suspensão de células esplênicas. As suspensões de células esplênicas, foram lavadas em meio RPMI 1640 e centrifugadas a 400 g por 10 min e 4°C. Hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado, por 20 segundos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF) acrescido de 1% de penicilina e estreptomicina, 0,5mM de L-glutamina (1%) e soro bovino fetal 10%. A contagem de células e o teste de viabilidade celular foram determinados com auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10%.

Os esplenócitos, foram então cultivados em tubos de polipropileno na concentração final de 5×10^6 células/mL e incubados em estufa por 48h a 37°C com CO₂ a 5%. As culturas foram mantidas sob ausência de estímulos mitogênicos, estimuladas com Concanavalina A (5 µg/mL) ou com *Bacillus clausii* (5×10^6 esporos/mL). Após 48h as células foram recuperadas para detecção da população de

linfócitos T e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C para dosagem dos níveis de citocinas.

2.4 Aquisição e análise de linfócitos T

Após 48 horas de cultivo foram adicionados a cada tubo, contendo as suspensões de células esplênicas, 0.5 µL de Golgi Stop. Em seguida as culturas foram agitadas em vórtex e devolvidas a estufa por um intervalo de quatro horas. Passado este período de incubação, as células foram lavadas com 6,0 mL de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado, em seguida foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 400 g por 10 minutos sob a temperatura de 4°C.

A marcação das células Treg/Th17 foi realizada de acordo com as especificações do fabricante para o kit Mouse Th17/Treg Phenotyping Kit BD Pharmingen, USA. A marcação dos linfócitos T foi realizada com anticorpos monoclonais de camundongos conjugados a fluorocromos, sendo eles: CD4 PerCP-Cy5.5 (clone: RM4-5), IL-17A PE (clone: TC11-18H10.1) e Foxp3 Alexa Fluor® 647 (clone: MF23).

As células foram analisadas em um citômetro de fluxo (Citômetro BD FACSCalibur), onde 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. O Software BD CellQuest™ foi utilizado para aquisição das amostras e as análises foram realizadas através do Software FlowJo™ v10.6.1 (Becton Dickson).

2.5 Dosagem de citocinas

Para determinação da concentração das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, e IL-17A, os sobrenadantes das diferentes culturas foram submetidos a dosagem por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur. O procedimento para dosagem das citocinas, foi realizado de acordo com as especificações do fabricante para o kit BD CBA mouse Th1/Th2/Th17. O Software BD CellQuest™ foi utilizado para aquisição das amostras e as análises foram realizadas através do Software Software FlowJo™ v10.6.1 (Becton Dickson).

2.6 Análises estatísticas

Os dados numéricos foram analisados com o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla - CA, EUA) e foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). As diferenças estatísticas foram determinadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) em conjunto com o teste de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células esplênicas

Nas culturas estimuladas com ConA, foi visto que os animais dos grupos infectados (G3, G4 e G5) apresentaram níveis mais elevados de IL-4 e IL-10 que os animais dos grupos não infectados G1 e G2. Ademias o tratamento com *B. clausii*, não modificou os níveis de ambas citocinas no grupo G2, quando comparado com o grupo G1 (Figura 1A, 1B). Quanto aos grupos de animais infectados, o G4 apresentou menor nível de IL-4 quando comparado com o grupo G3, porém esse valor não foi estatisticamente significativo, entretanto o grupo G5 apresentou níveis significativamente mais elevados de IL-4 quando comparado com os grupos G3 e G4 ($p < 0.005$) (Figura 1A). Em relação a IL-10, foi visto que os grupos G4 e G5 apresentaram níveis mais elevados dessa citocina que o grupo G3, porém os valores não foram significativos (Figura 1B). Os animais infectados dos grupos G3, G4 e G5, apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ e TNF que os animais não infectados dos grupos G1 e G2. Foi visto que o tratamento com *B. clausii* no grupo G2 aumentou os níveis de IFN- γ e diminuiu os níveis de TNF, porém os valores não foram significativos. Já entre os animais infectados, o *B. clausii* levou a uma redução nos níveis de IFN- γ e de TNF nos grupos G4 e G5, comparando com o grupo G3. Porém, novamente, os resultados dos níveis de ambas citocinas não demonstraram significância estatística. Os níveis de IL-17 foram significativamente maiores no grupo G4 e G5 em comparação com o grupo G3 ($p < 0.005$). Os animais do grupo G3

produziram níveis menores de IL17 em comparação com os animais dos grupos G1 e G2, porém os valores não foram estatisticamente significantes (Figura 2C). Quanto a produção de IL-6, os grupos infectados (G3, G4, G5), demonstraram níveis mais elevados dessa citocina quando comparado com os animais não infectados (G1 e G2). Porém, O tratamento com *B. clausii* reduziu os níveis de IL-6 nos grupos G4 e G5, quando comparado com o grupo G3 (Figura 2D). Não houve diferenças significativas entre os grupos nos níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-6, nas culturas estimuladas com os esporos de *B. clausii* (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D).

3.2 Determinação da frequência de células T CD4+Foxp3+ e T CD4+IL17+ em culturas de células esplênicas

O tratamento com *B. clausii* aumentou a frequência de células CD4+Foxp3+ nos animais dos grupos G2 e G4, quando comparado com os grupos G1 e G3, respectivamente, porém os valores só foram significantes para o grupo G4 ($p < 0.005$) (Figura 3A). Quanto a frequência de células CD4+IL17+, foi visto que o tratamento com *B. clausii* induziu aumento na frequência dessas células nos animais dos grupos G2, G4 e G5 quando comparado com os animais dos grupos G1 e G3, respectivamente, porém não significativo (Figura 3B). Não houve diferenças estatisticamente significativas na frequência de ambos subtipos celulares nas culturas estimuladas com esporos de *B. clausii* (Figura 3A, 3B). Animais dos grupos G4 G5 apresentaram razão Treg/Th17 maior quando comparado com a razão do grupo G3 e G5, porém os valores não foram significativos (Figura 3 C).

Figura 1 - Níveis de citocinas IL-4 (A) e IL-10 (B) de cultura de células esplênicas estimulados com esporos de *Bacillus clausii* ou Concavalina A (ConA), de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, ns = não significativo.

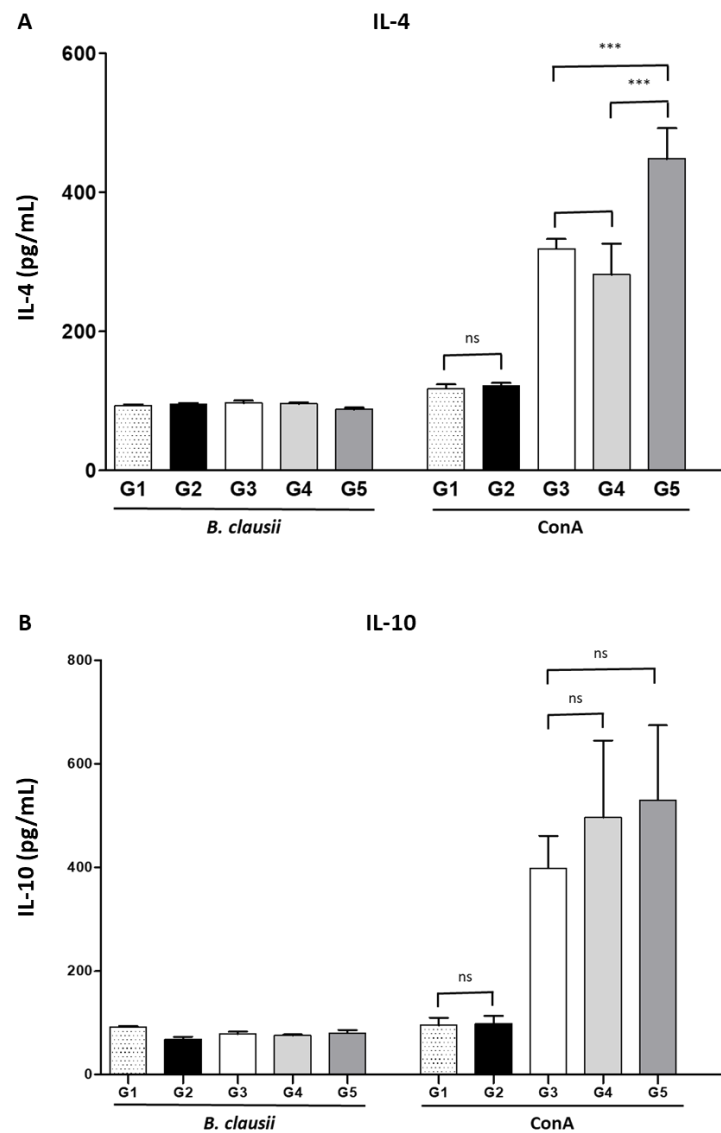


Figura 2 - Níveis de citocinas IFN- γ (A), TNF (B), IL-17 (C) e IL-6 (D) de cultura de células esplênicas, estimulados com esporos de *Bacillus clausii* ou Conavalina A (ConA), de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, ns = não significativo.

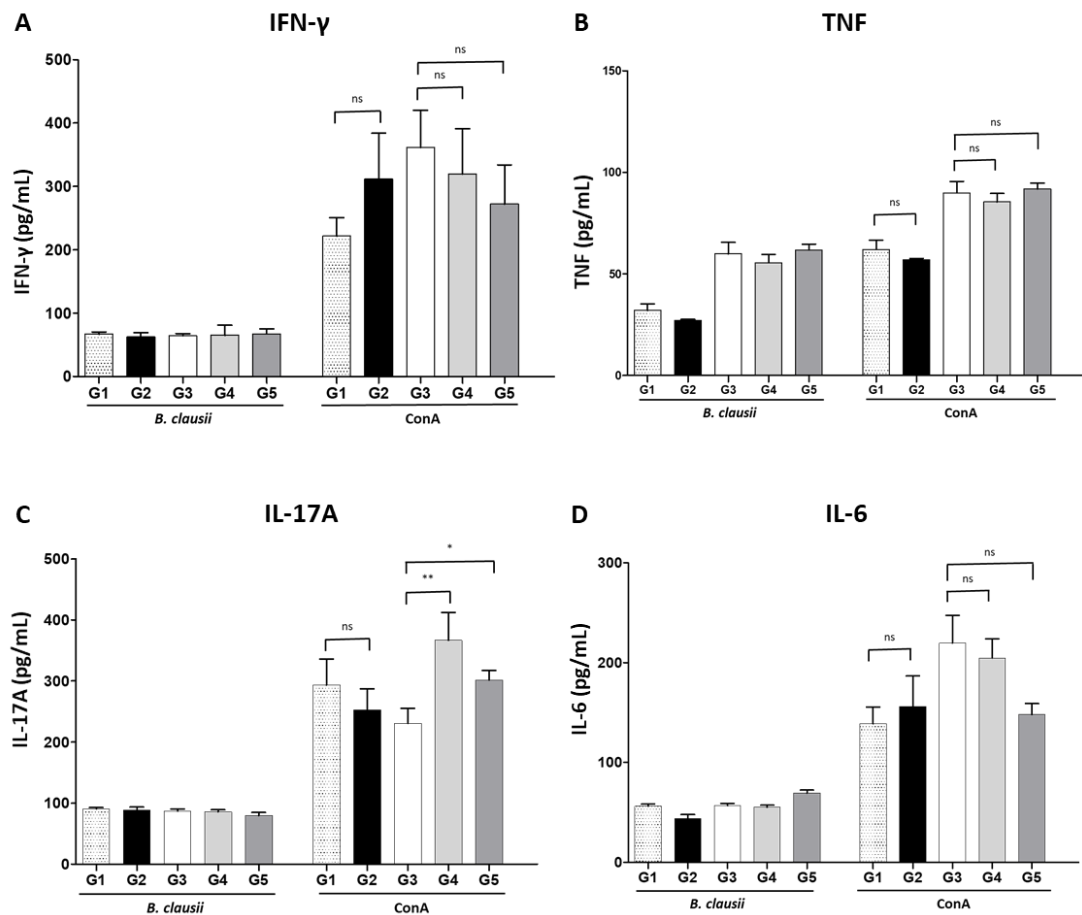
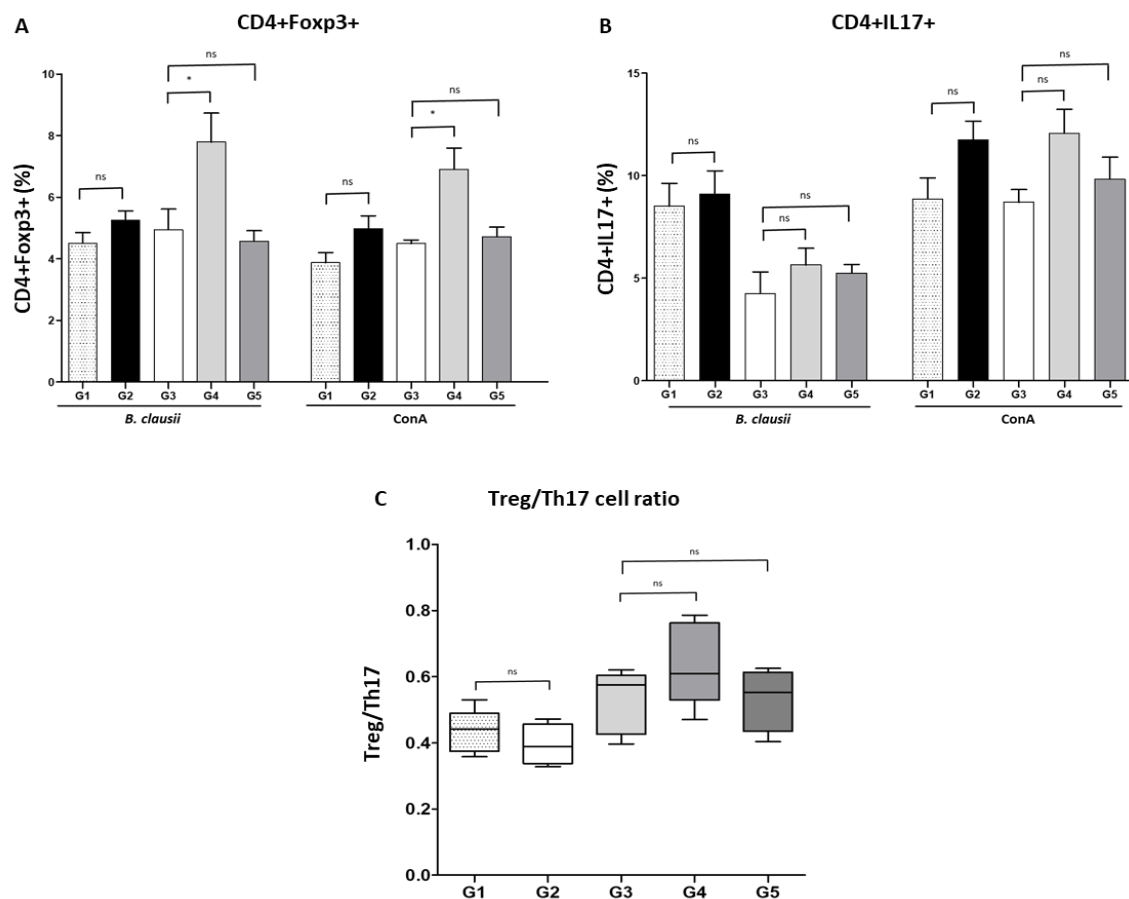


Figura 3 - Frequência de células CD4+Foxp3+ (A) e células CD4+IL17+ (B) em cultura de células esplênicas, estimulados com esporos de *Bacillus clausii* ou Concavalina A (ConA), e razão entre células Treg/Th17 (C) de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. Valores considerados significativos quando. * $p < 0.05$, ns = não significativo.



4. Discussão

A esquistossomose é uma importante doença tropical caracterizada por uma resposta granulomatosa inflamatória contra ovos retidos principalmente no intestino e

fígado. Vários estudos tem proposto a utilização de probióticos no tratamento de distúrbios gastrointestinais e extra-intestinais (Mazza, 1994; Shornikova et al. 1997; König & Brummer, 2014). Estudos demonstraram a capacidade de probióticos do gênero *Bacillus* de induzir resposta imune celular (Cutting, 2011). Dentre esses probióticos destaca-se o *Bacillus clausii*, comercialmente comercializado como Enterogermina®, uma formulação que possui quatro cepas de *Bacillus clausii*, O/C, N/R, T e SIN, notavelmente eficiente no tratamento de diarreias associadas ao uso de antibiótico (Nista et al. 2004).

Não encontramos diferenças significativas entre animais sem infecção tratados ou não com *B. clausii* (G1 e G2) quanto a produção de citocinas IL-4, IL-10, IL-6, IL-17, IFN γ , TNF. No entanto, o *B. clausii* demonstrou ter potencial de modular a resposta imune quando utilizado durante a infecção pelo *S. mansoni*. Em nosso estudo, o tratamento com *B. clausii* aumentou os níveis de IL-4 no grupo G5 e reduziu no grupo G4, quando comparado com o grupo G3 (controle não infectado). No estudo realizado por Ciprandi et al. (2004), demonstrou-se que crianças com alergia respiratória tiveram redução nos níveis de IL-4. Ainda nesse estudo, foi visto que o *B. clausii* aumentou a produção de IFN γ , diferente do nosso estudo onde ocorreu redução dos níveis dessa citocina nos grupos G4 e G5 em comparação com o grupo G3. Os níveis de TNF encontravam-se menores nos grupos G4 e G5 quando comparado com o grupo G3. No estudo de Urdaci et al. (2004), foi visto que em células T CD4⁺ isoladas de baço de camundongos C57Bl/6 as cepas de *B. clausii* isoladas do Enterogermina® induziram resposta T proliferativa e aumento da produção de IFN γ e expressão de NOS II com consequente aumento de produção de nitritos

Estudos sobre o mecanismo de modulação da IL-10 durante a esquistossomose, demonstraram que essa citocina é importante para prevenir o surgimento de patologias Th1 ou Th2 pois exerce ação supressiva sobre ambos os perfis. Nossos resultados demonstraram que camundongos dos grupos G4 e G5 apresentavam níveis mais elevados de IL-10 que o grupo controle infectado (G3). Corroborando com os estudos de Dar et al. (2018) que demonstraram que camundongos BALB/c com osteoporose pós-menopausa, após tratamento com *B. clausii* apresentavam maior produção de IL-10.

As células Th17 e Treg são frequentemente encontradas em superfícies de barreira, particularmente na mucosa intestinal, onde desempenham papel de proteção do hospedeiro contra microrganismos patogênicos e manutenção da tolerância imunológica e controle de respostas imunes. Ambos os perfis são regulados na maior parte pelos microrganismos entéricos (Ometti & Pizarro, 2015). Durante a esquistossomose as células Th17 e Treg possuem papéis fundamentais na indução de patologias severas (Larkin et al. 2012, Rutitzky et al. 2005, 2008; Rutitzky & Stadecker 2011; Shainheit et al. 2011) e controle da formação do granuloma (Baumgart et al. 2006; Taylor et al. 2006; Singh et al. 2004), respectivamente. Além disso foi visto que a infecção por *Schistosoma* pode comprometer o balanço Treg/Th17 (Chen et al., 2017).

O grupo G4 também induziu maior produção de IL-17 e células T CD4+IL17+ em comparação com os animais infectados e não tratados (G3). Nossos resultados também demonstraram que o grupo tratado com *B. clausii* antes da infecção (G4) apresentou maior frequência de CD4+Foxp3+. No estudo de Dar et al. (2018), demonstrou-se que em camundongos BALB/c com osteoporose pós-menopausa, o tratamento com *B. clausii* aumentou frequência de células Treg (CD4+Foxp3+), ao passo que inibiu simultaneamente a ativação de células Th17 (CD4+Ror γ T) e secreção de citocinas IL-6, IL-17 e TNF- α . Nossos resultados demonstram que existe diferença nos mecanismos envolvidos na regulação da imunidade pelo *B. clausii* quando utilizado antes da infecção ou durante o início da ovoposição (infecção estabelecida), sendo possível que existam balanços na resposta imune Th1/Th2/Th17 que não leva a uma polarização de resposta e nem a exacerbação da patologia. A razão Treg/Th17 foi maior no grupo G4 quando comparado com os grupos G3 e G5 demonstrando um perfil mais antiinflamatório que regulatório, neste grupo, porém sem polarização de resposta.

5. Conclusão

Nossos resultados demonstram que o *B. clausii* é capaz de modular a produção de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 assim como a frequência de células T CD4+Foxp3+ e células T CD4+IL17+ na dependência de infecção pelo *Schistosoma*

mansoni. Ademais, essa imunomodulação é diferente quando o tratamento com esporos de *B. clausii* é realizado antes da infecção durante o início da ovoposição (infecção estabelecida). Estudos futuros serão necessários para esta resposta em outros sítios importantes, como o intestino e o fígado.

6. Referências

- Almeida, C. C.; Lorena, S. L. S.; Pavan, C. R.; Akasada, H. M. I.; Mesquista, M. A. Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. *Clinical Research*, v. 27, n 2, p. 247-251, 2012.
- Belkaid, Y.; Harrison, O. J. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*, v. 46, n 4, p. 562-576, 2017.
- Chen, S.; Gao, Y.; Liang, Y.; Hu, L.; Liu, J.; Peng, L.; Feng, A.; Xiao, J. Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg promoting schistosome egg granuloma formation. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 10, n 10, p. 1-11, 2017.
- Ciprandi, G.; Tosca, M.A.; Milanese, M.; Caligo, G.; Ricca, V. Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after *Bacillus clausii* administration: a pilot study. *Pediatric Allergy Immunology*, v. 15, p. 148–151, 2004.
- Cutting, S. M. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, v. 28, p. 214-220, 2011.
- Dar, H. Y.; PaL, S.; Shukla, P. Mishra, P. K.; Tomar, G. B.; Chattopadhyay, N.; Srivastava, R. K. *Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice. *Nutrition*, v. 54, p. 118-128, 2018.
- Di Caro, S.; Tao, H.; Grillo, A.; Franceschi, F.; Chiara, E.; Zocco, M. A.; Gasbarrini, G.; Sepulveda, A. R.; Gasbarrini, A. *Bacillus clausii* effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 17, p. 951-960, 2005.
- Drakes, M.; Blanchard, T.; Czinn, S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infection and Immunity*, v. 72, n 6, p. 3299–3309, 2004.
- Dubey, M. R.; Patel, V. P. Probiotics: a promising tool for calcium absorption. *The Open Nutrition Journal*, v. 12, p. 59-69, 2018.
- Elshaghabe, F. M. F.; Rokana, N.; Gulhane, R. D.; Sharma, C.; Panwar, H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n 1490, 2017.
- Foligne, B.; Zoumpopoulou, G.; Dewulf, J.; Younes, A. B.; Chareyne, F.; Sirand, J. C.; Pot, B.; Grangette, C. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PlosOne*, v. 3, p. 1-12, 2007.
- Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; Calder, P.C.; Sanders, M.E. The

International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature*, v. 11, p. 506–514, 2014.

Holzschneider, M.; Layland, L. E.; Loffredo-Verde, E.; Mair, K.; Vogelmann, R.; Langer, R.; Wagner, H.; Prazeres Da Costa, C. Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 175, p. 246–257, 2013.

Hsieh, C. Y.; Osaka, T.; Moriyama, E.; Date, Y.; Kikuchi, J.; Tsuneda, S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiological Reports*, v. 3, n 3, 2015.

Irvine, S. L.; Hummelen, R.; Hekmat, S. Probiotic yogurt consumption may improve gastrointestinal symptoms, productivity, and nutritional intake of people living with human immunodeficiency virus in Mwanza, Tanzania. *Nutrition Research*, v. 31, p. 875-881, 2011.

Kim, H. J.; Kim, Y. J.; Lee, S. H.; Yu, J.; Jeong, S. K.; Hong, S. J. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4+CD25+Foxp3+ Tregs. *Clinical Immunology*, v. 153, p. 178–186, 2014.

Konieczna, P.; Groeger, D.; Ziegler, M.; Frei, R.; Ferstl, R.; Shanahan, F.; Quigley, E. M. M.; Kiely, B.; Akdis, C. A.; O'mahony, L. *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut Microbiota*, v. 61, p. 354-366, 2012.

Konig, J.; Brummer, R. J. Alteration of the intestinal microbiota as a cause of and a potential therapeutic option in irritable bowel syndrome. *Beneficial Microbes*, v. 5, n 3, 247-261, 2014.

Larkin, B. M.; Smith, P. M.; Ponichtera, H. E.; Shainheit, M. G.; Rutitzky, L. I.; Stadecker, M. J. Induction and regulation of pathogenic Th17 cell responses in schistosomiasis. *Seminars Immunopathology*, v. 34, n 6, p. 873–888, 2012.

Leblanc, J. G.; Chain, F.; Martin, R.; Humaran, L. G.; Courau, S.; Langella, P. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial Cell Factories*, v. 16, n 79, 2017.

Lippolis, R.; Siciliano, R. A.; Mazzeo, M. F.; Abbrescia, A.; Gnoni, A.; Sardanelli, A. M.; Papa, S. Comparative secretome analysis of four isogenic *Bacillus clausii* probiotic strains. *Proteome Science*, v. 11, n 28, p 1-14, 2013.

Lopetuso, L. R.; Scaldaferri, F.; Franceschi, F.; Gasbarrini, A. *Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 10, n 8, p. 943-948, 2016.

Mazza P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. *Boll Chim Farmaceutico*, v. 133, p. 3–18, 1994.

Musikasang, H.; Sohsomboon, N.; Tani, A.; Maneerat, S. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probiotic potential from Thai indigenous chickens. *Czech Journal. Animal Science*, v. 57, n 3, p. 137–149, 2012.

Nista, E. C.; Candelli, M.; Cremonini, F.; Cazzato, I. A.; Zocco, M. A.; Franceschi, F.; Cammarota, G.; Gasbarrini, G.; Gasbarrini, A. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 20, p. 1181-11-88, 2004.

O'mahony, C.; Scully, P.; O'mahony, D.; Murphy, S.; O'brien, F.; Lyons, A.; Sherlock, G.; Macsharry, J.; Kiely, B.; Shanahan, F.; O'mahony, L. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kb activation. *Plos Pathogens*, v. 4, n 8, 2018.

Omenetti, S.; Pizarro, T.T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Frontier in Immunology*, v. 6, p. 1–8, 2015.

Pradhan, B.; Guha, D.; Naik, A. K.; Banerjee, A. Tambat, S.; Chawla, S.; Senapati, S.; Aich, P. Probiotics *L. acidophilus* and *B. clausii* modulate gut microbiota in Th1- and Th2-biased mice to ameliorate *Salmonella typhimurium*-induced diarrhea. *Probiotics and Antimicrobial proteins*, v. 11, n 3, p. 887-904, 2019.

Resta-Lenart, S.; Barrett, K. E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, v. 52, p. 988-997, 2003.

Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G. A. D.; Gasbarrini, A.; Mele, M. C. What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, v. 7, n 1, 2019.

Rutitzky, L. I.; Bazzone, L.; Shainheit, M. G.; Joyce-Shaikh, B.; Cua, D. J. Stadecker, M. J. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. *Journal Immunology*, v. 180, p. 2486-2495, 2008.

Rutitzky, L. I.; Rosa, J. R. L.; Stadecker, M. J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *Journal Immunology*, v. 175, p. 3920-3926, 2005.

Rutitzky, L. I.; Stadecker, M. J. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN. *European Journal of Immunology*, v. 41, p. 2677–2687, 2011.

Shornikova Av, Casas Ia, Isolauri E, Et Al. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v. 24, p. 399–404, 1997.

Singh, K. P.; Gerard, H. C.; Hudson, A. P.; Reddy, T. R.; Boros, D. L. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology*, v. 114, p. 410–417, 2005.

Taylor, J. J.; Mohrs, M.; Pearce, E. J. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *Journal Immunology*, v. 176, p. 5839-5847, 2006.

Taylor, J. J.; Mohrs, M.; Pearce, E. J. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the th effector population. *Journal Immunology*, v. 176, p. 5839-5847, 2006.

Taylor, V. H. The microbiome and mental health: Hope or hype? *Journal Psychiatry Neuroscience*, v. 44, n 4, p. 219–222, 2019.

Urdaci, M. C.; Bressolier, P. Pinchuk, I. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol*, v. 38, p. 86-90, 2004.

Vitetta, L.; Saltzman, E. T.; Nikov, T.; Ibrahim, I.; Hall, S. Modulating the gut micro-environment in the treatment of intestinal parasites. *Journal Clinic Medicine*, v. 5, n 102, p. 1-11, 2016.

Zowail, M. E. M.; Osman, G.Y.; Zowail, M.E.; El-Esawy, H.M. Protective role of *Lactobacillus sporogenes* (probiotic) on chromosomal aberrations and DNA fragmentation in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Parasitology*, v. 8, n 1, p. 121–130, 2012.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que o sobrenadante livre de células de *B. clausii* *in vitro* não demonstra ação contra vermes adultos de *S. mansoni*. O tratamento com esporos de *B. clausii* em camundongos infectados com *S. mansoni*, diminuiu favoravelmente os parâmetros parasitológicos e a produção de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 assim como a frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺IL17⁺ na dependência de infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Ademais, essa imunomodulação é diferente quando o tratamento com esporos de *B. clausii* é realizado antes da infecção durante o início da ovoposição (infecção estabelecida). Estudos futuros serão necessários para esta resposta em outros sítios importantes, como o intestino e o fígado.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Hipersensibilidade imediata. Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Trad. Claudia Reali e outros. Rio de Janeiro: Elsevier, p.441-461, 2017.

LE CHATELIER, E.; NIELSEN, T.; QIN, J.; PRIFTI, E.; HILDEBRAND, F.; FALONY, G.; ALMEIDA, M.; ARUMUGAM, M.; BATTO, J.M.; KENNEDY, S.; LEONARD, P.; LI, J.; BURGDORF, K.; GRARUP, N.; JØRGENSEN, T.; BRANDSLUND, I.; NIELSEN, H.B.; JUNCKER, A.S.; BERTALAN, M.; LEVENEZ, F.; et al. **Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers**. Nature, v. 500, n. 7464, p. 541-546.

ADEEGBE, D. O.; NISHIKAWA, H. **Natural and induced T regulatory cells**. Frontiers in Immunology, v. 4, n 190, p 1-14, 2013.

ALMEIDA, C. C.; LORENA, S. L. S.; PAVAN, C. R.; AKASADA, H. M. I.; MESQUISTA, M. A. **Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients**. Clinical Research, v. 27, n 2, p. 247-251, 2012.

AMU, S.; SAUNDERS, S. P.; KRONENBERG, M.; MANGAM, N. E.; ATZBERGER, A.; FALLON, P. G. **Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model**. Journal Allergy and Clinic Immunology, v. 125, n 5, p. 1114-1124, 2010.

ARAÚJO, H. D. A.; AIRES, A. SOARES, L.; C. L. R.; BRITO, T. G. S.; NASCIMENTO, W. M.; MARTINS, M. C. B.; SILVA, T. G.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; SILVA, N. H.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; LIMA, V. L. M. **Usnic acid potassium salt from *Cladonia substellata* (Lichen): Synthesis, cytotoxicity and in vitro anthelmintic activity and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni***. Acta Tropica, v. 192, p. 1-19, 2019.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D. YAMADA, T.; et al. **Enterotypes of the human gut microbiome**. Nature, v. 473, n 12, p. 174-180, 2011.

BAUMGART, M.; TOMPKINS, F.; LENG, J.; HESSE, M. **Naturally occurring CD4+FOXP3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the**

immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. Journal Immunology, v. 176, p. 5374-5387, 2006.

BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; IXTA-RODRIGUES, O.; MARTINEZ-GOMEZ, F.; LOPEZ, M. G.; AGUILAR-FIGUEROA, B. R. **Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *trichinella spiralis* infection.** Parasite, v. 8, p. 226-228, 2001.

BELKAID, Y.; HARRISON, O. J. **Homeostatic immunity and the microbiota.** Immunity, v. 46, n 4, p. 562-576, 2017.

BERGSTROM, A.; SKOV, T. H.; BAHL, M. I.; ROAGER, H. M.; CHRISTENSEN, L. B.; EJLERSKOV, K. T.; MOLGAARD, C.; MICHAELSEN, K. F.; LICHT, T. R. **Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of danish infants.** Applied and Environmental Microbiology, v. 80, n 9, p. 2889-2900, 2014.

BOUHSS, A.; AL-DABBAGH, B.; VINCENT, M.; ODAERT, B.; AUMONT-NICAISE, M.; BRESSOLIER, P.; DESMADRILL, M.; et al. **Specific interactions of Clausin, a new lantibiotic, with lipid precursors of the bacterial cell wall.** Biophysical Journal, v. 97, p. 1390–1397, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016.** Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, 2018.

BRUNET, L. R.; FINKELMAN, F. D.; CHEEVER, A. W.; KOPF, M. A.; PEARCE, E. J. **IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis.** Journal Immunology, v. 159, p.777-785, 1997.

BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J. **The social context of schistosomiasis and its control.** WHO Library Cataloguing, v. 3, p. 1-67, 2008.

CARDOSO, L. S.; OLIVEIRA, S. C.; GOES, A. M.; OLIVEIRA, R. R.; PACIFICO, L. G.; MARINHO, F. V.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C., CARVALHO, E. M.; ARAUJO, M. I. ***Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation.** Clinical and Experimental Immunology, v. 160, p. 266–274, 2010.

CHIODO, P. G.; SPARO, M. D.; PEZZANI, B. C.; MINVIELLE, M. C.; BASUALDO, J. A. ***In vitro and in vivo effects of Enterococcus faecalis CECT7121 on Toxocara canis***. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, n. 5, p. 615-620, 2010.

CIPRANDI, G.; TOSCA, M.A.; MILANESE, M.; CALIGO, G.; RICCA, V. **Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after *Bacillus clausii* administration: a pilot study**. Pediatric Allergy Immunology, v. 15, p. 148–151, 2004.

COLLADO, M. C.; RAUTAVA, S. AAKKO, J.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. **Human gut colonization may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid**. Scientific Reports, v. 6, p. 1-13, 2016.

CUTTING, S. M. **Bacillus probiotics**. Food Microbiology, v. 28, p. 214-220, 2011.

DAR, H. Y.; PAL, S.; SHUKLA, P. MISHRA, P. K.; TOMAR, G. B.; CHATTOPADHYAY, N.; SRIVASTAVA, R. K. ***Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice**. Nutrition, v. 54, p. 118-128, 2018.

DE AVILA, L. F. D. C.; DE LEON, P. M. M.; DE MOURA, M. Q.; BERNE, M. E. A.; SCAINI, C. J.; LEIVAS LEITE, F. P. **Modulation of IL-12 and IFN- γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice**. Parasite Immunology, v. 38, p. 326–330, 2016.

DI CARO, S.; TAO, H.; GRILLO, A.; FRANCESCHI, F.; CHIARA, E.; ZOCCO, M. A.; GASBARRINI, G.; SEPULVEDA, A. R.; GASBARRINI, A. ***Bacillus clausii* effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis**. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, v. 17, p. 951-960, 2005.

DINLEYICI, E. C.; EREN, M.; YARGIC, Z. A.; DOGAN, N.; VANDENPLAS, Y. **Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* and metronidazole compared to metronidazole alone in children with acute bloody diarrhea caused by amebiasis: a prospective, randomized, open label study**. American Journal Tropical Medicine Hygiene, v. 80, n. 6, p. 953-955, 2009.

DRAKES, M.; BLANCHARD, T.; CZINN, S. **Bacterial probiotic modulation of dendritic cells**. Infection and Immunity, v. 72, n 6, p. 3299–3309, 2004.

DUBEY, M. R.; PATEL, V. P. **Probiotics: a promising tool for calcium absorption**. The Open Nutrition Journal, v. 12, p. 59-69, 2018.

DVOROZNAKOVA, E.; BUCKOVA, B.; HURNIKOVA, Z.; REVAJOVA, V.; LAUKOVA, A. **Effect of probiotic bacteria on phagocytosis and respiratory burst activity of blood polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in mice infected with *Trichinella spiralis***. Veterinary Parasitology, v. 15, n 231, p. 69-76, 2016.

EL-KHADRAGY, M. F.; AL-OLAYAN, E. M.; ELMALLAH, M. I. Y.; ALHARBI, A. M.; YEHA, H. M.; MONEIM, A. E. A. **Probiotics and yogurt modulate oxidative stress and fibrosis in livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice**. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 19, n 3, p. 1-19, 2019.

ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. ***Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives**. Frontiers in Microbiology, v. 8, n 1490, 2017.

EZZ, A.; GMAIL, I. S.; SALEM, F. E. H.; SALAMA, R.; NADY, S. **Anti-IL-17 markedly inhibited the *in vitro* granuloma induced by *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen**. International Journal of Medicine in Developing Countries, v. 2, n 1, p. 38-46, 2018.

FALLON, P. G.; RICHARDSON, E. J.; MCKENZIE, G.; MCKENZIE, A. N. J. **Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent**. The Journal of Immunology, v. 164, p. 2585–2591, 2000.

FIJAN, S. **Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature**. International Journal Environmental Research Public Health, v. 11, n 5, p. 4745-4767, 2014.

FLORES-VILLANUEVA, P. O.; CHIKUNGUWO, S. M.; HARRIS, T. S.; STADECKER, M. J. **Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo***. Journal Immunology, v. 151, n 6, p. 3192-3198.

FLOUDAS, A.; AVIELLO, G.; SCHWARTZ, C.; JEFFERY, I. B.; O'TOOLE, P. W.; FALLON, P. G. ***Schistosoma mansoni* worm infection regulates the intestinal microbiota and susceptibility to colitis**. Infection and Immunity, v. 87, n 8, p. 1-11, 2019.

FOLIGNE, B.; ZOUMPOPOULOU, G.; DEWULF, J.; YOUNES, A. B.; CHAREYNE, F.; SIRAND, J. C.; POT, B.; GRANGETTE, C. **A key role of dendritic cells in probiotic functionality.** PlosOne, v. 3, p. 1-12, 2007.

FOSTER, J. C.; GLASS, M. D.; COURTNEY, P. D.; WARD, L. A. **Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability.** Food Microbiology, v. 20, p. 351–357, 2003.

GHANEM, K. Z.; ABDEL-SALAM, A. M.; MAGHARBY, A. S. **Immunoprophylactic effect of probiotic yoghurt feeding on *Schistosoma mansoni*-infected mice.** Polish journal of food and nutrition sciences, v. 14, n. 2, p. 123–126, 2005.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SAVETTI, S.; GUEYE, S. A.; LUPETTI, A.; SENESI, S. **Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation.** Journal Applied Microbiology, v. 119, n 2, p. 552-559, 2015.

GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. **Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome.** Science, v. 312, n 2, p. 1355–1359, 2006.

GLASS, M. D.; COURTNEY, P. D.; LEJEUNE, J. T.; WARD, L. A. **Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatants on *Cryptosporidium* viability and infectivity *in vitro*.** Food Microbiology, v. 21, p. 423–429, 2004.

GODIN, B. R.; GORBACH, S. L. **Clinical indications for probiotics: an overview.** Clinical Infectious Diseases, v. 46, p. 96–100, 2008.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. **Human schistosomiasis.** Lancet, v. 368, p. 1106–1118, 2006.

HARZALLAH, D.; BELHADJ, H. **Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GU mucosal barrier.** Intech, p. 198-213, 2013.

HESSE, M.; PICCIRILLO, C. A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A. W.; SHEVACH, E. M.; WYNN, T. A. **The pathogenesis**

of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *Journal Immunology*, v. 172, p. 3157-3166, 2004.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. **The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.** *Nature*, v. 11, p. 506–514, 2014.

HOFFMANN, K.F.; CHEEVER, A.W.; WYNN, T. A. **IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis.** *Journal Immunology*, v. 164, n 12, p. 6406-6416, 2000.

HOLZSCHEITER, M.; LAYLAND, L. E.; LOFFREDO-VERDE, E.; MAIR, K.; VOGELMANN, R.; LANGER, R.; WAGNER, H.; PRAZERES DA COSTA, C. **Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis.** *Clinical and Experimental Immunology*, v. 175, p. 246–257, 2013.

HOOKS, K. B.; O'MALLEY, M. A. **Dysbiosis and its discontents.** *mBio*, v. 8, n 5, p. 1492-1517, 2017.

HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R. et al. **Structure, function and diversity of the healthy human microbiome.** *Nature*, v. 486, p. 207–214, 2012.

HSIEH, C. Y.; OSAKA, T.; MORIYAMA, E.; DATE, Y.; KIKUCHI, J.; TSUNEDA, S. **Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*.** *Physiological Reports*, v. 3, n 3, 2015.

IANIRO, G.; RIZZATTI, G.; PLOMER, M.; LOPETUSO, L.; SCALDAFERRI, F.; FRANCESCHI, F.; CAMMAROTA, G.; GASBARRINI, A. ***Bacillus clausii* for the treatment of acute diarrhea in children: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** *Nutrients*, v. 10, n, 1074, 2018.

IRVINE, S. L.; HUMMELEN, R.; HEKMAT, S. **Probiotic yogurt consumption may improve gastrointestinal symptoms, productivity, and nutritional intake of people living with human immunodeficiency virus in Mwanza, Tanzania.** *Nutrition Research*, v. 31, p. 875-881, 2011.

IWAKURA, Y.; NAKAE, S.; SAIJO, S.; ISHIGAME, H. **The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens.** Immunological Reviews, v. 226, p. 57–79, 2008.

JANDHYALA, S. M.; TALUKDAR, R.; SUBRAMANYAM, C.; VUYYURU, H.; SASIKALA, M.; REDDY, D. N. **Role of the normal gut microbiota.** World Journal Gastroenterology, v. 21, n 29, p. 8787-8803, 2015.

JENKINS, S. J.; HEWITSON, J. P.; JENKINS, G. R.; MOUNTFORD, A. P. **Modulation of the host's immune response by schistosome larvae.** Parasite Immunology, v. 27, n 10, p. 385–393, 2005.

JENKINS, T. P.; PEACHEY, L. E.; AJAMI, N. J. MACDONALD, A. S.; HSIEH, M. H.; BRINDLEY, P. J.; CANTACESSI, C.; RINALDI, G. ***Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota.** Scientific Reports, v. 8, n, 12072, 2018.

KALANTARI, P.; BRUNELL, S. C.; STADECKER, M. J. **The C-type lectin receptor-driven, Th17 cell-mediated severe pathology in schistosomiasis: not all immune responses to helminth parasites are Th2 dominated.** Frontiers in Immunology, v. 10, n 26, p. 1-7, 2019.

KARUNAMOORTHY, K; ALMALKI, M.J.; GHAILAN, K.Y. **Schistosomiasis: A neglected tropical disease of poverty: A call for intersectoral mitigation strategies for better health.** Journal of Health Research, v. 5, p. 1-12, 2018.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, P. **A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni.** Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 14, n 6, p. 397-400, 1972.

KIM, H. J.; KIM, Y. J.; LEE, S. H.; YU, J.; JEONG, S. K.; HONG, S. J. **Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4+CD25+Foxp3+ Tregs.** Clinical Immunology, v. 153, p. 178–186, 2014.

KONIECZNA, P.; GROEGER, D.; ZIEGLER, M.; FREI, R.; FERSTL, R.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E. M. M.; KIELY, B.; AKDIS, C. A.; O'MAHONY, L. ***Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells.** Gut Microbiota, v. 61, p. 354-366, 2012.

KONIG, J.; BRUMMER, R. J. **Alteration of the intestinal microbiota as a cause of and a potential therapeutic option in irritable bowel syndrome.** *Beneficial Microbes*, v. 5, n 3, 247-261, 2014.

LAFOREST-LAPOINTE, I.; ARRIETA, M. C. **Microbial eukaryotes: a missing link in gut microbiome studies.** *mSystems*, v. 3, n 2, p. 1-5, 2018.

LARKIN, B. M.; SMITH, P. M.; PONICHTERA, H. E.; SHAINHEIT, M. G.; RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. **Induction and regulation of pathogenic Th17 cell responses in schistosomiasis.** *Seminars Immunopathology*, v. 34, n 6, p. 873–888, 2012.

LEBLANC, J. G.; CHAIN, F.; MARTIN, R.; HUMARAN, L. G.; COURAU, S.; LANGELLA, P. **Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria.** *Microbial Cell Factories*, v. 16, n 79, 2017.

LI, Z.; LI, D.; TSUN, A., LI, B. **FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation.** *Cellular & Molecular Immunology*, v. 12, p. 558–565, 2015.

LIM, H. S.; YEU, J. E.; HONG, S. P.; KANG, M. S. **Characterization of antibacterial cell-free supernatant from oral care probiotic *Weissella cibaria*, CMU.** *Molecules*, v. 23, n 8, p. 1-13, 2018.

LIMA, M. T.; ANDRADE, A. C. S. P.; OLIVEIRA, G. P.; NICOLE, J. R.; MARTINS, F. S.; KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S. **Virus and microbiota relationships in humans and other mammals: An evolutionary view.** *Human Microbiome Journal*, v. 11, 2019.

LIPPOLIS, R.; SICILIANO, R. A.; MAZZEO, M. F.; ABBRESCIA, A.; GNONI, A.; SARDANELLI, A. M.; PAPA, S. **Comparative secretome analysis of four isogenic *Bacillus clausii* probiotic strains.** *Proteome Science*, v. 11, n 28, p 1-14, 2013.

LOPETUSO, L. R.; SCALDAFERRI, F.; FRANCESCHI, F.; GASBARRINI, A. ***Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives.** *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 10, n 8, p. 943-948, 2016.

LOURENÇO, E. V.; LA CAVA, A. **Natural regulatory T cells in autoimmunity.** Autoimmunity, v. 44, n 1, p. 33–42, 2011.

MANSOUR-GHANAIE, F. DEHBASHI, N.; YAZDANPARAST, K.; SHAFAGHI, A. **Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis.** World Journal Gastroenterology, v. 9, n. 8, p. 1832-1833, 2003.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. **Neglected Tropical Diseases: epidemiology and global burden.** Tropical Medicine and Infectious Disease, v.2, n 36, p. 1-15, 2017.

MOHAMED, A. H.; OSMAN, G.Y.; ZOWAIL, M.E.; EL-ESAWY, H.M. **Effect of *Lactobacillus sporogenes* (probiotic) on certain parasitological and molecular aspects in *Schistosoma mansoni* infected mice.** Journal of Parasitic Diseases, v. 40, n 3, p. 823–832, 2016.

MOHAMED, S. T.; KHALAF, K. J.; SULAIMAN, N. M. ***Lactobacillus salivarius* bacteriocin and supernatant activity against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo.** British Journal of Biology, Health and Medical Science Research, v. 3, n 1, p. 19-28, 2015.

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

MUSIKASANG, H.; SOHSOMBOON, N.; TANI, A.; MANEERAT, S. **Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probiotic potential from Thai indigenous chickens.** Czech Journal. Animal Science, v. 57, n 3, p. 137–149, 2012.

NASCIMENTO, G. L.; PEGADO, H. M.; DOMINGUES, A. L. C.; XIMENES, R. A. A.; ITRIA, A.; CRUZ, L. N.; OLIVEIRA, M.R.F. **The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v. 11, p1-19, 2019.

NISTA, E. C.; CANDELLI, M.; CREMONINI, F.; CAZZATO, I. A.; ZOCCO, M. A.; FRANCESCHI, F.; CAMMAROTA, G.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. ***Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial.** Aliment Pharmacol Ther, v. 20, p. 1181-11-88, 2004.

O'MAHONY, C.; SCULLY, P.; O'MAHONY, D.; MURPHY, S.; O'BRIEN, F.; LYONS, A.; SHERLOCK, G.; MACSHARRY, J.; KIELY, B.; SHANAHAN, F.; O'MAHONY, L. **Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kb activation.** Plos Pathogens, v. 4, n 8, 2018.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; DAVID, E. B.; RIBEIRO, C.; GUIMARAES, S.; MASSENO, A. P. B.; KATAGIRI, S.; SEQUEIRA, J. L. **Effect of *Bifidobacterium animalis* on mice infected with *Strongyloides venezuelensis*.** Revista Instituto Medicina Tropical, v. 56, n 2, p. 105-109, 2014.

ORIENTE, A.; FEDARKO, N. S.; PACOCHA, S. E.; HUANG, S. K.; LICHTENSTEIN, L. M.; ESSAYAN, D. M. **Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 292, n 3, 1999.

PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B. RELMAN, D. A. BROWN, P. O. **Development of the human infant intestinal microbiota.** PLoS Biology, v. 5, n 7, 2007.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nature Reviews Immunology, v. 2, p. 1-13, 2002.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. **Estudo de alguns aspetos da esquistossomose mansonii em macacos cebus pelo método do oograma quantitativo.** Revista Instituto Medicina Tropical, v. 16, n 5, p. 245-258, 1974.

PERNAMBUCO, SECRETARIA DE SAÚDE. **Boletim esquistossomose.** Diretoria Geral de Controle de Doenças e Agravos. 2018.

PERRUCCI, S.; FICHI, G.; RICCI, E.; GALOSI, L.; LALLE, M.; ROSSI, G. **In vitro and ex vivo evaluation of the anti-Giardia duodenalis activity of the supernatant of Slab51 (SivoMixx).** PloS One, v. 14, n 3, 2019.

PICKERD, N.; TUTHILL, D. **Resolution of cryptosporidiosis with probiotic treatment.** Postgrad Medical Journal, v. 80, p. 112–113, 2004.

PRADHAN, B.; GUHA, D.; NAIK, A. K.; BANERJEE, A. TAMBAT, S.; CHAWLA, S.; SENAPATI, S.; AICH, P. **Probiotics *L. acidophilus* and *B. clausii* modulate gut microbiota in Th1- and Th2-biased mice to ameliorate *Salmonella typhimurium*-induced diarrhea.** Probiotics and Antimicrobial proteins, v. 11, n 3, p. 887-904, 2019.

REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M. T.; MCCORMICK, J. K. **Potential uses of probiotics in clinical practice.** Clinical Microbiology Reviews, v. 16, n4, p. 658-672, 2003.

REY, L. **Esquistossomose mansônica: O parasito.** In: LUIS REY. (Org.). Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2011. p. 153-158.

RESTA-LENART, S.; BARRETT, K. E. **Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC).** Gut, v. 52, p. 988-997, 2003.

RIGOTHIER, M. C.; MACCARIO, J.; GAYRAL, P. **Inhibitory activity of *Saccharomyces* yeasts on the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes *in vitro*.** Parasitol Res, v. 80, p. 10-15, 1994.

RINNINELLA, E.; RAOUL, P.; CINTONI, M.; FRANCESCHI, F.; MIGGIANO, G. A. D.; GASBARRINI, A.; MELE, M. C. **What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases.** Microorganisms, v. 7, n 1, 2019.

ROWLAND, I.; GIBSON, G.; HEINKEN, A.; SCOTT, K.; SWANN, J.; THIELE, I.; TUOHY, K. **Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components.** European Journal Nutrition, v. 57, p. 1-24, 2018.

RUTITZKY, L. I.; BAZZONE, L.; SHAINHEIT, M. G.; JOYCE-SHAIKH, B.; CUA, D. J. STADECKER, M. J. **IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17.** Journal Immunology, v. 180, p. 2486-2495, 2008.

RUTITZKY, L. I.; ROSA, J. R. L.; STADECKER, M. J. **Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17.** Journal Immunology, v. 175, p. 3920-3926, 2005.

RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. **Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN.** European Journal of Immunology, v. 41, p. 2677–2687, 2011.

SANTOS, J.F.M.; VASCONCELOS, J.; SOUZA, J.R.; COUTINHO, E.M.; MONTENEGRO, S.M.L.; AZEVEDO-XIMENES, E. **The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection.** Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, v. 37, n. 6, 2004.

SCHNEEBERGER, P. H. H.; COULIBALY, J. T.; PANIC, G.; DAUBENBERGER, C.; GUEUNING, M.; FREY, J. E.; KEISER, J. **Investigations on the interplays between *Schistosoma mansoni*, praziquantel and the gut microbiome.** Parasites and Vectors, v. 11, n 168, 2018.

SCHOLTE, R. G. C.; GOSONI, L.; MALONE, J. B.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J. VOUNATSOU, P. **Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models.** Acta Tropica, v. 132, p. 57–63, 2014.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. PLoS Biology, v. 14, n 8, 2016.

SHAINHEIT, M. G.; LASOCKI, K. W.; FINGER, E.; LARKIN, B. M. SMITH, P. M.; SHARPE, A. H.; DINARELLO, C. A.; RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. **The pathogenic Th17 cell response to major schistosome egg antigen is sequentially dependent on IL-23 and IL-1b.** Journal Immunology, v. 187, p. 5328-5335, 2011.

SILVIA, M. L. M.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F. G. C.; TEIXEIRA, K. M.; COUTINHO, E. M.; BRINKMAN, J.; GONÇALVES, I.; DOMINGUES, L. A. W.; DOMINGUES, A. L. C.; SHER, A.; WYNN, T. A. **Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of Interferon-g and Interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens.** The Journal of Infectious Diseases, v. 179, p. 1502–14, 1999.

SINGH, K. P.; GERARD, H. C.; HUDSON, A. P.; REDDY, T. R.; BOROS, D. L. **Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice.** Immunology, v. 114, p. 410–417, 2005.

STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSIOTIS, G. **CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis.** Immunological Reviews, v. 211, p. 39–48, 2006.

TANAKA, M.; NAKAYAMA, J. **Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life.** Allergology International, v. 66, p. 515-522, 2017.

TAYLOR, J. J.; MOHRS, M.; PEARCE, E. J. **Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the th effector population.** Journal Immunology, v. 176, p. 5839-5847, 2006.

TAYLOR, V. H. **The microbiome and mental health: Hope or hype?** Journal Psychiatry Neuroscience, v. 44, n 4, p. 219–222, 2019.

TIBIRIÇA, S. H. C.; GUIMARÃES, F. B.; TEIXEIRA, M. T. B. **A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, n. 1, p. 1375-1381, 2011.

URDACI, M. C.; BRESSOLIER, P. PINCHUK, I. ***Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities.** J Clin Gastroenterol, v. 38, p. 86-90, 2004.

VENTURA, L. L. A.; OLIVEIRA, D. R.; GOMES, M. A.; TORRES, M. R. F. **Effect of probiotics on giardiasis. Where are we?** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 54, n 2, p. 1-7, 2018.

VITETTA, L.; SALTZMAN, E. T.; NIKOV, T.; IBRAHIM, I.; HALL, S. **Modulating the gut micro-environment in the treatment of intestinal parasites.** Journal Clinic Medicine, v. 5, n 102, p. 1-11, 2016.

WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. **Immunopathology of schistosomiasis.** Immunology Cell Biology, v. 85, n 2, p. 148–154, 2007.

World Health Organization, 2018. **Weekly Epidemiological Record. Schistosomiasis and Soil-transmitted Helminthiasis: Number of People Treated in 2017.** <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/276933/WER9350.pdf?ua=1> (Accessed 15 October 2019).

YAMASHITA, T.; BOROS, D. L. **IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni.** Journal Immunology, v. 149, p. 3659-3664, 1992.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. **CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System.** Immunity, v. 35, n 2, p. 161–168, 2011.

ZOWAIL, M. E. M.; OSMAN, G.Y.; ZOWAIL, M.E.; EL-ESAWY, H.M. **Protective role of *Lactobacillus sporogenes* (probiotic) on chromosomal aberrations and DNA fragmentation in *Schistosoma mansoni* infected mice.** Parasitology, v. 8, n 1, p. 121–130, 2012.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8353
fax: (55 81) 2126 8350
www.ecb.ufpe.br

Recife, 07 de julho de 2016.

Ofício nº 69/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque**
Departamento de Medicina Tropical
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.016405/2016-57

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos do *Bacillus clausii* sobre a esquistossomose mansoni: estudo da resposta imunológica, alterações intestinais e translocação bacteriana”, registrada com o nº 23076.016405/2016-57, sob a responsabilidade de Prof.ª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/06/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo <i>Swiss Mus musculus</i>
Nº de animais	50
Peso/Idade	28-30g / 30 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do LIKA

Atenciosamente,