



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

LEONARDO NASCIMENTO SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Trichuris trichiura* COM
PROPRIEDADES IMUNOREGULATÓRIAS E SEUS
RESPECTIVOS GENES CODIFICADORES ATRAVÉS DE UMA
ABORDAGEM PROTEÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA**

Salvador, BA
2015

LEONARDO NASCIMENTO SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Trichuris trichiura* COM
PROPRIEDADES IMUNOREGULATÓRIAS E SEUS
RESPECTIVOS GENES CODIFICADORES ATRAVÉS DE UMA
ABORDAGEM PROTEÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Imunologia, da Universidade Federal da Bahia, como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor em
Imunologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Neza Maria Alcântara Neves
Co-orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo Carvalho Pacheco

Salvador
2015

S237

Santos, Leonardo Nascimento

Identificação de proteínas de *Trichuris trichiura* com propriedades imunorregulatórias e seus respectivos genes codificadores através de uma abordagem proteômica e transcriptômica / Leonardo Nascimento Santos – Salvador, 2015.

120 f. : il.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Neuza Maria Alcântara Neves.

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo Carvalho Pacheco.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2015.

1. *Trichuris trichiura*. 2. Proteoma. 3. Transcriptoma. 4. Imunomodulação. 5. Alergias. 6. Doenças inflamatórias. I. Universidade Federal da Bahia.
II. Título.

CDU 576.8.097



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



TERMO DE APROVAÇÃO

“IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Trichuris trichiura* COM PROPRIEDADES IMUNOREGULATÓRIAS E SEUS RESPECTIVOS GENES CODIFICADORES ATRAVÉS DE UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA”

Doutorando – Leonardo Nascimento Santos
Orientadora- Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves

Trabalho de Defesa de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito necessário para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Neuza Maria Alcântara Neves – orientadora
PPGIm/ICS/UFBA

Professor Doutor Jair Pereira da Cunha Junior
Instituto de Ciências Biomédicas- Laboratório de Imunologia
Universidade Federal de Uberlândia

Professor Doutor Leonardo Paiva Farias
FIOCRUZ-UFBA

Professor Doutor Marcelo Santos Castilho

Faculdade de Farmácia - UFBA

Professor Doutor Nicolaus Albert Borges Schriefer
PPGIm/ICS/UFBA - Serviço de Imunologia-HUPES

Salvador, 25 de setembro de 2015

Profa. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
ICS-UFBA

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e pelas oportunidades que tem me concedido.

À minha família, pelo apoio absoluto às minhas escolhas e por ter sido o alicerce para que eu chegasse até aqui.

À Prof^a Neuza, pela orientação integral e efetiva, confiança depositada em mim desde a iniciação científica e por todo o suporte necessário ao desenvolvimento do projeto de tese e da minha formação.

Ao Prof. Luís, por ter abraçado o projeto e se empenhado no desenvolvimento do trabalho de modo que me manteve empolgado com a realização do mesmo.

À Camila, junto ao Laboratório de Imunofarmacologia, que foi importante para o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Alergia e Acarologia, sempre muito solícitos e úteis na realização dos experimentos, por terem feito desta jornada um caminho muito bom de ter sido percorrido, do qual levarei lembranças por toda a vida.

Ao Prof. Lain, junto ao Laboratório de Patologia e Biointervenção – CPqGM – Fiocruz, que foi essencial para a realização da primeira etapa deste trabalho.

À plataforma de Espectrometria de Massas – CPqGM – Fiocruz, em nome da Dr^a Margareth B. C. Gallo, pela colaboração na realização do trabalho proteômico.

Ao Dr Artur Silva e sua equipe da Universidade Federal do Pará, pela colaboração na análise do transcriptoma de *T. trichiura*.

À *Fundación Ecuatoriana para Investigaciones em Salud*, em nome do Dr. Philip Cooper, por todo apoio logístico para obtenção dos parasitos usados nos experimentos.

Ao PPGIm, em nome da coordenadora Silvia, dos professores e dos funcionários que foram fundamentais para que minha formação fosse completa em todos os aspectos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia e à Fundação Wellcome pelo suporte financeiro que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Helmintos modulam a resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, protegem contra doenças inflamatórias. Diferentes classes de proteínas recombinantes derivadas destes parasitos, produzidas em sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos, têm sido capazes de inibir respostas inflamatórias em modelos experimentais de doenças imunomediadas. A identificação do conteúdo proteico de frações do extrato somático de *Trichuris trichiura* com efeitos imunomodulatórios foi alcançada através de análises em sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em uma abordagem proteômica que indicou proteínas candidatas a serem responsáveis por esta atividade biológica. Os resultados desta abordagem foram confirmados e expandidos pela análise transcriptômica do estágio adulto de *T. trichiura* usando tecnologia de sequenciamento de nova geração e uma estratégia de montagem *de novo*, onde vinte transcritos que codificam para as proteínas previamente detectadas foram identificados, sendo que cinco desses estão entre as sequências codificadoras de proteínas mais expressas no verme adulto. Estas análises contribuirão para a anotação funcional da sequência genômica de *T. trichiura* recém disponibilizada e viabilizarão a produção de proteínas recombinantes codificadas por estes transcritos que poderão levar ao desenvolvimento de novos medicamentos para a terapia de doenças alérgicas e autoimunes.

Palavras – chave: *Trichuris trichiura*; Proteoma; Transcriptoma; Imunomodulação; Alergias; Doenças inflamatórias.

ABSTRACT

Helminths modulate the host immune response and, consequently, protect it against inflammatory diseases. Different classes of recombinant proteins derived from these parasites, produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems, were able to inhibit inflammatory responses in experimental models of immune mediated diseases. The identification of the protein content of *Trichuris trichiura* somatic extract fractions with immunomodulatory effects was achieved by liquid chromatography coupled to mass spectrometry in a proteomics approach that indicated candidate proteins to be responsible for this biological activity. The results of this approach were confirmed and expanded by transcriptomic analysis of *T. trichiura* adult worm using next-generation sequencing technology and a *de novo* assembly strategy, where twenty transcripts that code for previously detected proteins were identified, and five of whom were among the most expressed protein-encoding sequences in the adult worm. These analyses will contribute to the functional annotation of the recently released draft genomic sequence of this nematode and will enable the production of recombinant proteins, encoded by these transcripts, that may lead to the development of new drugs for the treatment of allergy, autoimmune and other inflammatory diseases.

Key words: *Trichuris trichiura*; Proteome; Transcriptome; Immunomodulation; Allergy; Inflammatory diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1. Uma abordagem geral para identificação de proteínas de helmintos com atividade imunoregulatória em potencial.

Quadro 1. Bases de dados relacionadas a helmintos.

Manuscrito 1. Uma Abordagem Proteômica para Identificar Proteínas do Extrato de *Trichuris trichiura* com Efeitos Imunomodulatórios.

Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato somático de *T. trichiura* obtido através de fracionamento por troca iônica.

Material suplementar do manuscrito 1

Figura S1. Indução da produção de IL-10 pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis.

Figura S2. Inibição da produção de TNF- α pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis.

Figura S3. Inibição da produção de IL-12 p40 pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis.

Figura S4. Inibição da produção de IL-5 pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis.

Figura S5. Inibição da produção de IL-13 pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis.

Manuscrito 2. Montagem e caracterização *de novo* do transcriptoma do verme adulto de *Trichuris trichiura* usando sequenciamento por Ion Torrent.

Fig. 1. Anotação funcional de proteínas de *T. trichiura* previstas do sequenciamento do seu transcriptoma.

Fig. 2. Domínios de proteínas, famílias e sítios funcionais identificados em 607 proteínas previstas ainda não caracterizadas do transcriptoma de *T. trichiura*.

Fig. 3. A atividade transcricional total no transcriptoma do verme adulto de *T. trichiura*, conforme avaliada pela abundância transcricional normalizada (valores RPKM).

Fig. 4. Anotação funcional dos 200 transcritos codificadores de proteínas mais expressos, usando classificações GO.

Fig. 5. Alinhamentos das estruturas tridimensionais das proteínas imunomodulatórias de helmintos com seus respectivos ortólogos preditos do transcriptoma de *T. trichiura*.

Material suplementar do manuscrito 2

Fig. S1. Verificação da qualidade do sequenciamento do transcriptoma de *T. trichiura* no Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM).

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1. Proteínas recombinantes de helmintos com propriedades imunoregulatórias.

Manuscrito 1. Uma Abordagem Proteômica para Identificar Proteínas do Extrato de *Trichuris trichiura* com Efeitos Imunomodulatórios.

Tabela 1. Resumo da produção de citocinas por CMSPs estimuladas com extrato somático de *Trichuris trichiura* (TtE), suas frações (TtEFs) e respectivas proteínas identificadas por espectrometria de massas através de comparação por homologia com os parasitos da ordem Trichocephalida.

Material suplementar do manuscrito 1

Tabela S1. Proteínas identificadas e validadas nas frações mais ativas do extrato somático de *Trichuris trichiura* (TtEF-6 e TtEF-8 a TtEF-12) obtidas por cromatografia de troca iônica.

Manuscrito 2. Montagem e caracterização do transcriptoma do verme adulto de *Trichuris trichiura* usando sequenciamento por Ion Torrent.

Tabela 1. Resumo dos resultados de sequenciamento e montagem do transcriptoma do adulto de *T. trichiura*.

Tabela 2. As 40 sequências que codificam proteínas mais altamente transcritas identificadas no transcriptoma do verme adulto de *T. trichiura*.

Tabela 3. Análise da expressão de transcritos que codificam proteínas de *T. trichiura* com atividades imunorregulatórias.

Material suplementar do manuscrito 2

Tabela S1. Mapeamento de vias biológicas de proteínas preditas de *T. trichiura* contra ortólogos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AcCystatin	Cistatina derivada de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
AF	Ácido Fórmico
Ala	Alanina
As	<i>Anisax simplex</i>
Asuu	<i>Ascaris suum</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bm-33	Homólogo de Inibidor de Pepsina de <i>Brugia malayi</i>
BmAsnRS	Asparaginil-tRNA-sintetase de <i>Brugia malayi</i>
ACN	Acetonitrila
CD	Cluster de diferenciação
DNAc	DNA complementar
ODN	Oligodesoxinucleotídeos
CsANXB30	Anexina B30 de <i>Clonorchis sinensis</i>
Cs-Stefin	Cistatina tipo I de <i>Clonorchis sinensis</i>
CLAED	Cromatografia líquida de alta eficiência desnaturante
DiAg	Antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i>
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinases</i>
IES	Ionização por eletrospray
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FBPA	Frutose bisfosfato aldolase
FheCL1	Catepsina L 1 de <i>Fasciola hepática</i>
FhGST-si	Glutationa transferase classe sigma de <i>Fasciola hepática</i>
FhHDM-1	Molécula de defesa de helminto 1 de <i>Fasciola hepática</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
HCl	Ácido clorídrico
Hco-gal-f	Galectina da fêmea de <i>Haemonchus contortus</i>
Hco-gal-m	Galectina do macho de <i>Haemonchus contortus</i>
Hp-CPI	Inibidor de cisteína protease de <i>Heligmosomoides polygyrus</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IAD	Índice de atividade da doença
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
CL	Cromatografia líquida

Leu	Leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitor fator</i>
MIFH	<i>Macrophage migration inhibitor fator homolog</i>
EM	Espectrometria de massas
MUSTANG	<i>Multiple structural alignment algorithm</i>
PM	Peso molecular
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NR	Não-redundante
OMS	Organização mundial da saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OvALT-2	Transcrito 2 abundante da larva de <i>Onchocerca volvulus</i>
OvNLT-1	Novo transcrito 1 da larva de <i>Onchocerca volvulus</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAR	<i>Protease activated receptor</i>
CMSF	Células mononucleares do sangue periférico
FC	Fosforilcolina
PCR	<i>Polymerase chain raction</i>
FEPCQ	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGM	<i>Personal genome machine</i>
PHA	<i>Phytohaemagglutinin</i>
PIT	Proteômica informada por transcriptômica
PLGS	<i>Protein lynx global server</i>
PUP	<i>Putative uncharacterized protein</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribossômico
RPKM	<i>Reads per kilobase per million mapped reads</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
DSS	Dodecil Sulfato de Sódio
ShTSP2	Tetraspanin de <i>Schistosoma haematobium</i>
Sj16	Proteína de <i>Schistosoma japonicum</i> de 16 kDa
SjCystatin	Cistatina de <i>Schistosoma japonicum</i>
Sm16	Proteína de <i>Schistosoma mansoni</i> de 16 kDa
Sm22.6	Antígeno Sm22.6 de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm29	Antígeno Sm29 de <i>Schistosoma mansoni</i>
SmB1	Antígeno SmB1 de <i>Schistosoma mansoni</i>
SmSLP	Proteína Stathmin-like de <i>Schistosoma mansoni</i>
SMW	<i>Semantic MediaWiki</i>
SPT	<i>Skin prick test</i>
Sra	<i>Strongyloides ratti</i>
T reg	T regulatórias
TGF	<i>Tumoral growth factor</i>
Th	<i>T help</i>

TI-gal	Homólogo de galectina-9 recombinante
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMAP	<i>Ion Torrent mapper</i>
TNBS	2, 4, 6 - Ácido Trinitrobenzeno Sulfônico
TNF	<i>Tumoral necrosis factor</i>
TOF	<i>Time of fly</i>
TRAPID	<i>Rapid analysis of transcriptome data</i>
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TRISP	<i>Trichinella spiralis</i>
TRITR	<i>Trichuris trichiura</i>
TRSIP	<i>Trichinella pseudospiralis</i>
TsP-53	Ts-specific 53-kDa
Tsui	<i>Trichuris suis</i>
TtE	Extrato de <i>Trichuris trichiura</i>
TtEF	Fração do Extrato de <i>Trichuris trichiura</i>
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REVISÃO DE LITERATURA	16
Proteínas Recombinantes de Helmintos com Propriedades Imunomodulatórias: Estratégias para Produção e Investigação de seu Potencial Terapêutico.	
OBJETIVOS	53
Objetivo Geral	53
Objetivos Específicos	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
Manuscrito 1. Identificação de Proteínas do Extrato de <i>Trichuris trichiura</i> com Efeitos Imunomodulatórios por meio de uma Abordagem Proteômica.	54
Manuscrito 2. Montagem e Caracterização <i>de novo</i> do Transcriptoma do Verme Adulto de <i>Trichuris trichiura</i> usando Sequenciamento por <i>Ion Torrent</i> .	75
CONCLUSÃO GERAL	102
REFERÊNCIAS	103
ANEXOS	119
Anexo A – Manuscrito 1 publicado: <i>A Proteomic Approach to Identify Proteins from Trichuris trichiura Extract with Immunomodulatory Effects</i>	119
Anexo B – Comprovante de submissão do Manuscrito 2: <i>De novo Assembly and Characterization of the Trichuris trichiura Adult Worm Transcriptome using Ion Torrent sequencing</i>	120

INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da prevalência de doenças inflamatórias tem sido bem evidenciado nos países desenvolvidos e, mais recentemente, também nos países em desenvolvimento, causando grande impacto na qualidade de vida e produtividade dos indivíduos acometidos, assim como nos custos para o sistema de saúde pública (Jacobs, Bissonnette e Guenther, 2011; To *et al.*, 2012). No entanto, até o momento, nenhum tratamento curativo ou profilático foi desenvolvido para essas doenças do sistema imunológico. Este fenômeno tem sido atribuído ao estilo de vida moderno, especialmente, à falta de exposição a agentes infecciosos como micro-organismos e helmintos, a chamada hipótese da higiene (Strachan, 1989; Parker e Ollerton, 2013). Neste cenário, tem-se buscado compreender mais profundamente os mecanismos e moléculas envolvidas na imunoregulação por helmintos, visando o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas para patologias inflamatórias (Harnett e Harnett, 2010).

Helmintos têm sido usados experimentalmente para tratar distúrbios inflamatórios com resultados encorajadores. Por exemplo, tricurídeos regulam o sistema imune em modelos experimentais (Khan *et al.*, 2002; Gruden-Movsesijan *et al.*, 2010; Hübner *et al.*, 2012) e em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais (Summers *et al.*, 2005b; Summers *et al.*, 2005a). No caso particular de *Trichuris trichiura*, estudos epidemiológicos têm demonstrado associação inversa entre a infecção e atopia ou asma atópica, com evidências de maior proteção associada à carga parasitária mais alta (Rodrigues *et al.*, 2008; Moncayo *et al.*, 2010). Ao passo que em cultura de sangue total de crianças com infecção por *T. trichiura*, foi observada produção espontânea de IL-10 (Figueiredo *et al.*, 2009).

O *T. trichiura* é um helminto de grande importância para a saúde pública, cuja infecção atinge mais de 700 milhões de pessoas no mundo, principalmente crianças com idade entre 5 e 15 anos (Galvani, 2005; Bethony *et al.*, 2006). A infecção ocorre pela ingestão de ovos embrionados que, após eclosão e desenvolvimento das larvas, tornam-se adultos que se estabelecem no ceco e colón do hospedeiro humano, onde reproduzem-se sexuadamente e a fêmea põe ovos que são excretados junto às fezes (Bradley e Jackson, 2004; Brooker, Clements e Bundy, 2006).

Morfologicamente, o adulto de *T. trichiura* tem sua parte posterior alargada que fica livre no lúmen do intestino e a parte anterior afilada que fica imersa na mucosa intestinal do hospedeiro. Nesta extremidade, os tricurídeos têm estruturas especializadas chamadas de esticosoma e banda bacilar, as quais têm íntimo contato com as células epiteliais do intestino e parece ter papel fundamental na relação parasito-hospedeiro, inclusive na imunomodulação (Tilney *et al.*, 2005; Foth *et al.*, 2014; Jex *et al.*, 2014).

As infecções por *T. trichiura* e por outros helmintos transmitidos pelo solo causam doenças debilitantes que afetam mais de dois bilhões de pessoas no mundo (WHO, 2005) e efeitos secundários dessas infecções incluem danos físicos e cognitivos, além de redução na efetividade de vacinas (Bethony *et al.*, 2006; Van Riet *et al.*, 2007). Portanto, o uso de infecções helmínticas em terapia não é viável, porém os produtos parasitários biologicamente ativos podem ser uma alternativa promissora para se beneficiar da atividade imunomodulatória e não se submeter aos efeitos patogênicos das infecções.

Desse modo, o uso de proteínas de helmintos produzidas pela tecnologia do ADN recombinante em sistemas de expressão adequados é uma opção viável clínica e economicamente para obtenção de ferramentas terapêuticas para doenças alérgicas e autoimunes. Para isto, o primeiro passo é identificar e avaliar, sob diferentes protocolos experimentais, as moléculas responsáveis pela imunoregulação, o que já vem sendo feito por vários grupos de pesquisa e tem se ampliado com o desenvolvimento de métodos genômicos, transcriptômicos e proteômicos (Hartmann *et al.*, 2013. He *et al.*, 2014. Sun *et al.*, 2013).

Contudo, o objetivo deste conjunto de trabalhos foi identificar proteínas de *Trichuris trichiura* com propriedades anti-inflamatórias e seus respectivos genes codificadores, através de abordagem proteômica e transcriptômica, de modo a compreender a regulação imunológica provocada por este nematódeo e viabilizar a produção dessas proteínas através da tecnologia do ADN recombinante, vislumbrando o desenvolvimento futuro de ferramentas terapêuticas para doenças alérgicas, autoimunes e inflamatórias.

Revisão de Literatura: Proteínas Recombinantes de Helmintos com Propriedades Imunomodulatórias: Estratégias para Produção e Investigação de seu Potencial Terapêutico

Autores: Leonardo N. Santos; Luis G. C. Pacheco; Carina S. Pinheiro; Neuza M. Alcantara-Neves

Periódico a ser submetido: International Reviews of Immunology

Fator de Impacto: 4,103

Revisão de Literatura

Proteínas Recombinantes de Helminhos com Propriedades Imunomodulatórias: Estratégias para Produção e Investigação de seu Potencial Terapêutico

*Leonardo N. Santos^a; Luis G. C. Pacheco^a; Carina S. Pinheiro^a; Neuza M. Alcantara-Neves^a, **

^aInstituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil;

* Autor para correspondência:

NMAN: Laboratório de Alergia e Acarologia;

Instituto de Ciências da Saúde;

Universidade Federal da Bahia;

Av. Reitor Miguel Calmon, S / N, Canela;

CEP 41100.100, Salvador, Bahia, Brasil.

E-mail: neuzalcantara@gmail.com

Outros emails de autores:

LNS: nsleo.1@gmail.com,

LGCP: lgcpacheco@gmail.com

CSP: carinaspinheiro@yahoo.com.br

RESUMO

A relação inversa entre infecções por helmintos e o desenvolvimento de doenças imunomediadas é um dos pilares da Hipótese da Higiene, que tem sido usada para explicar o aumento da incidência de doenças inflamatórias crônicas humanas, tais como alergias e doenças auto-imunes, em países industrializados em todo o mundo. De fato, estudos recentes, em humanos e modelos animais, vêm tentando elucidar os mecanismos subjacentes através dos quais moléculas derivadas de helmintos podem modular a resposta imune do hospedeiro e então causar supressão de distúrbios imunológicos. Estes estudos têm fomentado a idéia de que os vermes poderiam ser utilizados como uma alternativa terapêutica promissora para a prevenção e tratamento de doenças mediadas pelo sistema imunológico; no entanto, a administração de helmintos vivos representa um risco para a saúde humana, enquanto a utilização de proteínas nativas parasitárias não representa uma estratégia custo-efetiva. Neste contexto, diferentes estratégias têm sido buscadas para a identificação e produção de proteínas recombinantes de helmintos com atividades imunomodulatória em potencial. O recente *boom* em genômica parasitária contribuiu enormemente para a identificação e estudo de proteomas de helmintos, assim proteínas de diferentes classes funcionais, incluindo proteases e homólogos de citocinas, já foram propostas e avaliadas como imunomoduladores. Nesta revisão, discutimos as abordagens atuais para identificação de proteínas de helmintos com propriedades imunomodulatórias em potencial, incluindo as estratégias baseadas em tecnologias “ômicas” de alto rendimento. Nós também exploramos as abordagens metodológicas e sistemas de expressão que têm sido utilizados para a produção das formas recombinantes de mais de vinte proteínas imunomodulatórias de helmintos e discutimos as suas atividades quando avaliadas como moléculas imunoterapêuticas para tratar diferentes doenças imunomediadas, incluindo asma, outras alergias, artrite reumatóide e doenças inflamatórias do intestino. Finalmente, discutimos as perspectivas do uso dessas moléculas recombinantes derivadas de parasitas para futuras terapias e prevenção de doenças inflamatórias humanas.

Palavras-chave: Helmintos, Imunomodulação, Proteínas recombinantes, Sistemas de expressão, Doenças inflamatórias.

1. Introdução

Helmintos, pela co-evolução com mamíferos por milênios, desenvolveram mecanismos para sobreviver por longos períodos através da regulação do sistema imune do hospedeiro. Conseqüentemente, estes parasitos causam um impacto sobre o desenvolvimento e manifestação de doenças inflamatórias crônicas humanas, como aquelas relacionados à autoimunidade e alergia (Maizels, Mcsorley e Smyth, 2014; Mishra *et al.*, 2014; Bashi *et al.*, 2015).

O aumento da prevalência de doenças inflamatórias tem sido atribuído ao estilo de vida moderno nos países industrializados, especialmente, à falta de exposição aos agentes infecciosos como micro-organismos e helmintos (Strachan, 1989; Parker e Ollerton, 2013). Doenças inflamatórias imunomediadas incluindo asma, rinite, doenças inflamatórias intestinais, diabetes mellitus e diversas outras constituem um fardo considerável para os pacientes, suas famílias e sociedade, contribuindo enormemente para o aumento dos custos com o sistema de saúde pública em todo o mundo. No entanto, até agora, nenhum tratamento curativo ou profilático foi desenvolvido para elas e os corticosteróides, fármacos mais eficazes para estas doenças, causam efeitos colaterais graves (Jacobs, Bissonnette e Guenther, 2011).

De fato, helmintos têm sido usados experimentalmente para tratar distúrbios inflamatórios com resultados encorajadores (Harnett, 2014). Por exemplo, infecção por *Trichinella spiralis* imunoregula diabetes tipo 1, colite ulcerativa e encefalomielite autoimune experimental em modelos experimentais com o envolvimento de células T regulatórias (Treg) e citocinas (Khan *et al.*, 2002; Gruden-Movsesijan *et al.*, 2010; Hübner *et al.*, 2012; Sofronic-Milosavljevic *et al.*, 2013); *Schistosoma mansoni* e *Caenorhabditis elegans* também foram capazes de causar supressão da inflamação das vias aéreas por meio de células T reg e de desvio da resposta imune de células T auxiliares (Th) 2 para uma resposta Th1 (Pacífico *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012).

Da mesma forma, ovos de *Trichuris suis* e larvas infectantes de *Necator americanus* têm sido utilizados para o tratamento de doença inflamatória intestinal e rinite alérgica em seres humanos (Summers *et al.*, 2005b; Summers *et al.*, 2005a; Croese *et al.*, 2006). No entanto, quando essas terapias foram avaliadas por estudos de meta-análise mais confiáveis, concluiu-se que não havia evidências suficientes para garantir a eficácia e a segurança destas terapias (Croft, Bager e Kumar, 2012; Garg, Croft e Bager, 2014).

Assim, antes de considerar o tratamento clínico com produtos biológicos, dos helmintos ou de seus produtos, estes precisam ser cuidadosamente selecionados e os mecanismos envolvidos nessa imunomodulação precisam ser profundamente entendidos.

Importantes avanços têm ocorrido no sentido de elucidar a relação parasito-hospedeiro e alguns mecanismos moleculares e celulares já estão bem definidos, tais como a indução da produção de citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β) (Shiny *et al.*, 2011), recrutamento de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (células Treg) (Layland *et al.*, 2013); ativação alternativa de macrófagos que induzem um fenótipo anti-inflamatório destas células (Du *et al.*, 2014) e desvio da resposta imune (Hübner *et al.*, 2012). No entanto, estes mecanismos variam a depender das espécies de parasitos ou seus produtos, modelo experimental, protocolo de tratamento, entre outros (Bashi *et al.*, 2015).

Proteínas nativas de helmintos têm sido descritas como potentes imunomoduladores. Por exemplo, ES-62 uma glicoproteína do nematódeo filarídeo de roedor *Acanthocheilonema viteae* interage com diversas células e moléculas do sistema imune diminuindo a resposta inflamatória (Harnett e Harnett, 2009) como em artrite (Pineda *et al.*, 2012) e em choque séptico (Puneet *et al.*, 2011). Sua ação imunomodulatória tem sido atribuída à porção fosforilcolina (PC) (Harnett *et al.*, 2008), derivada de modificação pós-traducional que também é observada em outros produtos de nematódeos com função imunomodulatória (Deehan *et al.*, 2002).

Idealmente, proteínas isoladas dos parasitos seriam purificadas e avaliadas quanto ao seu potencial terapêutico, porém o processo para obter a molécula nativa é, em muitos casos, trabalhoso, demorado e não efetivo para a produção com o padrão de qualidade requerido, reprodutibilidade e em escala suficiente para caracterização biofísica e bioquímica e para uso clínico (Fernández-Robledo e Vasta, 2010; Vedadi *et al.*, 2010).

Essas proteínas podem ser produzidas pela tecnologia do ADN recombinante em diferentes sistemas de expressão, tais como bactérias, leveduras, protozoários, células de insetos, helmintos e células de mamíferos (Frenzel, Hust e Schirrmann, 2013). Alguns parâmetros como características de crescimento, conformação, purificação e modificações pós-traducionais, particularmente glicosilação, são fundamentais para escolha do sistema de expressão (Pfeifer e Khosla, 2001; Arico, Bonnet e Javaud, 2013)

e tem impacto sobre atividade biológica, estabilidade e farmacocinética (Karnaukhova *et al.*, 2007; Fujihara *et al.*, 2008).

Apesar do alto custo, a maioria das proteínas recombinantes para uso farmacêutico é produzida em linhagens de células de mamíferos, por que a conformação, secreção e modificações pós-traducionais são mais similares aquelas de proteínas humanas nativas, um requerimento particularmente importante para proteínas, cuja glicosilação adequada é essencial para sua atividade biológica (Wasley *et al.*, 1991; Frenzel, Hust e Schirrmann, 2013).

Por outro lado, sistemas de expressão em *E. coli* tem sido os mais usados para produzir proteínas recombinantes de helmintos para imunomodulação com alguns resultados encorajadores *in vitro* e em modelos experimentais. A propensão para usar procariotos pode ser atribuída a vantagens como baixo custo, facilidade de manipulação e alto rendimento (Assenberg *et al.*, 2013). No entanto, existem sistemas de expressão, por exemplo em *Caenorhabditis elegans*, helminto de vida livre, que podem ser até mesmo mais adequados para a produção dessas moléculas, haja vista que possui uma maquinaria celular similar àquela dos parasitos helmintos, para a produção de suas proteínas nativas (Zhou *et al.*, 2014).

1.1 Estratégias racionais para obtenção de proteínas recombinantes de helmintos com a proposta de terapia e / ou imunoprofilaxia

Atualmente, abordagens multitecnológicas envolvendo parasitologia e métodos genômicos, proteômicos e transcriptômicos, associadas com estratégias de bioinformática, tem contribuído enormemente para a identificação de proteínas de helmintos com propriedades imunomodulatórias potenciais (Du *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013; He *et al.*, 2014), especialmente com o desenvolvimento de bases de dados relacionadas a helmintos (vide Quadro 1).

Técnicas *in vivo* utilizando modelos experimentais estabelecidos para a asma (Baqueiro *et al.*, 2010), colite (Brenna *et al.*, 2013) e diabetes autoimune (Viehmann Milam *et al.*, 2014) são atualmente disponíveis para testar estas moléculas para o uso como agente imunoterapêutico contra doenças inflamatórias humanas, quando seus mecanismos de ação e segurança tiverem sido bem reconhecidos.

Sequências genômicas de helmintos, considerados moduladores do sistema imunológico do hospedeiro mamífero, foram recentemente disponibilizadas publicamente; entre elas destacam-se os genomas de *Ascaris suum* (Jex *et al.*, 2011), *Brugia malayi* (Ghedin *et al.*, 2007), *Fasciola hepatica* (Cwiklinski *et al.*, 2015), *Necator americanus* (Tang *et al.*, 2014), *Schistosoma mansoni* (Berriman *et al.*, 2009), *Toxocara canis* (Zhu *et al.*, 2015), *Trichinella spiralis* (Mitreva *et al.*, 2011), *Trichuris suis* (Jex *et al.*, 2014), e *Trichuris trichiura* (Foth *et al.*, 2014). Um grande número de proteínas já foi predito por meio de análise *in silico* destes genomas e podem ser consideradas como moléculas imunomodulatórias potenciais para avaliação adicional (Ghedin, 2014).

Através de transcriptomas, utilizando tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, é possível estudar todos os transcritos codificadores de proteínas produzidos por tecidos específicos de helmintos e durante os diferentes estágios de desenvolvimento destes parasitos (Choi *et al.*, 2011), e também durante o contato com o hospedeiro (Foth *et al.*, 2014), permitindo a avaliação de genes realmente envolvidos em diferentes funções e mecanismos celulares, tais como imunomodulação (Gasser, 2013). A integração de todas essas informações recolhidas a partir de estudos transcriptômicos com os dados obtidos ao nível proteômico não só contribuirá para melhorar a nossa compreensão da biologia parasitária e da interação parasito-hospedeiro, mas também pode ajudar na identificação de novas moléculas imunoterapêuticas de helmintos (Cantacessi *et al.*, 2012).

A figura 1 apresenta um diagrama descrevendo as etapas de uma abordagem geral para identificação de moléculas de helmintos para imunoterapia e imunoprevenção de doenças inflamatórias, desde a obtenção do extrato do verme e testes *in vitro* até o uso de diferentes ferramentas de bioinformática para exploração mais aprofundada dos bancos de dados públicos relacionados a helmintos, disponíveis atualmente, para a identificação de genes alvo.

Em análises comparativas *in silico* de transcriptomas, por exemplo, pode-se selecionar sequências de proteínas com maior potencial imunorregulatório, cuja produção por tecnologia do DNA recombinante permitiria a sua utilização experimental e clínica. Inclusive, é crescente o número de proteínas recombinantes de helmintos descritos na literatura que apresentam alguma atividade imunorregulatória e em teste para inibição de distúrbios de natureza imunológica. Deste modo, o objetivo deste estudo foi fazer um

levantamento das estratégias atualmente usadas para obter proteínas recombinantes de helmintos e avaliar suas atividades sobre modelos experimentais de doenças inflamatórias e *in vitro*.

2. Diferentes Classes de Proteínas de Helmintos com Efeitos Imunoregulatórios e Estratégias para a sua Produção na Forma Recombinante

2.1 Inibidores de protease

Muitas proteases são produzidas durante o processo de invasão do hospedeiro e desempenham um papel importante no processo inflamatório. Recentemente, o envolvimento de receptores ativados por proteases (PAR) tem sido estudado em doenças inflamatórias, uma vez que estão presentes em vários tipos de células estruturais e do sistema imunológico (Zhang, Zeng e He, 2014). Evidências de suas participações têm sido levantadas em modelo de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina (Schmidlin *et al.*, 2002) e em pacientes com rinite alérgica (Lee *et al.*, 2007). Na colite induzida por TNBS, um antagonista sintético de PAR2 evitou danos à mucosa, inflamação e edema, ainda mais do que o fármaco clinicamente usados, sulfasalazina (Lohman *et al.*, 2012). Os antagonistas de PAR ou inibidores das proteases que ativam este receptor podem vir a ser terapias valiosas para as doenças inflamatórias.

De fato, inibidores de proteases de parasitos, como as cistatinas (inibidores de cisteína proteases) tem mostrado resultados promissores como ferramenta imunoregulatória. Neste sentido, uma cistatina recombinante de filarídeo (AvCystatin) exibe resposta modulatória em camundongos com alergia induzida por pólen, através da diminuição da resposta Th2 e da inflamação das vias aéreas (Daniłowicz-Luebert *et al.*, 2013). Esta proteína foi expressa em *E. coli* como uma cistatina biologicamente ativa, após sua identificação ter sido realizada por uma busca em biblioteca de expressão de ADNc obtidos a partir de ARNm de fêmeas de *Acanthocheilonema viteae*, usando soros de roedores resistentes ao desafio da infecção após a vacinação com larvas deste helminto (Hartmann *et al.*, 1997). O seu ortólogo de *Schistosoma japonicum*, uma cistatina tipo II (SjCystatin), foi identificado pelo uso de ferramentas de bases de dados on-line e, a partir disso, a *open reading frame* (ORF) foi clonada no vetor pET-32a e transformado em *E. coli* Origami 2 (DE3), produzida majoritariamente na forma solúvel. Esta proteína é

funcional e capaz de inibir a produção de TNF- α , IL-6 e óxido nítrico, enquanto que induziu a produção de IL-10 (Yang *et al.*, 2014).

Para identificar um gene que codifica um inibidor de cisteína protease de *Heligmosomoides polygyrus* foi adotada uma outra estratégia; amplificou-se por ADN polimerase, a partir de biblioteca de ADNc, utilizando *primers* baseados em sequências conservadas de cistatinas anteriormente descritas para helmintos no banco de dados GenBank. A proteína recombinante, produzida em *E. coli* da cepa Origami, foi funcional e capaz de suprimir a ativação de células dendríticas, mesmo quando estimuladas por LPS e ODN (Sun *et al.*, 2013).

Também aproveitando a similaridade com uma cistatina já conhecida de helminto, uma sequência gênica que codifica a cistatina do trematódeo *Clonorchis sinensis* (CsStefin-1) foi identificada por análise de uma biblioteca de ADNc de vermes adultos e por padrões de similaridade. Após a amplificação gênica e clonagem, o plasmídeo construído foi ligado ao vetor de expressão pQE-30 e transformado em *E. coli* M15, resultando em expressão da proteína funcional, relacionada com a família 1 de estefinas quando analisada filogeneticamente, e teve similaridade estrutural com a estefina B de humanos (Kang *et al.*, 2011). Esta CsStefin-1 recombinante reduziu colite murina induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) através do aumento da produção de IL-10 por macrófagos (Jang *et al.*, 2011).

2.2 *Proteases*

Embora causadora de efeitos contrários aos inibidores de proteases, as proteases também podem desempenhar atividades imunorregulatórias. As cisteína proteases mais comuns de parasitos são aquelas da família das catepsinas B e L, das quais muitas são secretadas, enquanto as de mamíferos localizam-se em lisossomos. Estas proteases têm funções essenciais no parasitismo, incluindo imunomodulação (Smooker *et al.*, 2010).

As catepsinas secretadas são produzidas como propeptídeos, que se transformam em suas formas ativas após clivagem, auto-catalisadas ou não. Contudo, esta etapa não prejudica a síntese da forma ativa por tecnologia recombinante. As catepsinas L1 de *Fasciola hepatica* e B1 de *S. mansoni* foram produzidas em suas formas ativas, a partir de ADNc da pró-proteína, por células de *Pichia pastoris* GSII5, utilizando o plasmídeo pPIC9K como vetor de expressão (Collins *et al.*, 2004; Stack *et al.*, 2005; Donnelly *et al.*,

2010). Além disso, a catepsina L1 de *F. hepatica* produzida por *P. pastoris* é muito mais estável em pH 7,0 e a 37°C do que a catepsina L humana (Collins *et al.*, 2004); vale mencionar que a estabilidade é uma característica importante de um produto para uso clínico.

Em um modelo murino de sepse, a administração de catepsina L1 de *F. hepatica* (FhCL1) protegeu camundongos da morte por meio da supressão da inflamação, diminuindo os níveis de IL-12, TNF- α e IFN- γ , além de IL-6. Esta supressão foi identificada como sendo causada por degradação direta de TLR3 e a inibição da ativação de macrófagos através da via de sinalização dependente de TRIF e independente de Myd-88. Da mesma forma, a Catepsina B1 de *S. mansoni* teve efeito semelhante (Donnelly *et al.*, 2010).

2.3 Homólogos de citocinas

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina humana envolvida na imunidade inata e estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios (Roger *et al.*, 2003). Enquanto isso, homólogos de MIF tipo-1 e tipo-2 são produzidos por vários helmintos e, pelo menos alguns deles, contribuem para a evasão do sistema imune do hospedeiro causando imunomodulação (Vermeire *et al.*, 2008).

Uma molécula homóloga do MIF tipo-2, derivada da larva de terceiro estágio (L3) de *Anisakis simplex*, foi expressa por *E. coli* e capaz de inibir a produção de citocinas Th1 e Th2 em inflamação intestinal e das vias aéreas, possivelmente pelo recrutamento de células Treg e indução de IL-10 através de TLR-2 (Park *et al.*, 2009; Cho, Lee e Yu, 2011). O gene que codifica o MIF de *A. simplex* (As-MIF) foi isolado a partir de uma biblioteca de ADNc da larva L3 de *A. simplex* em estudo de *tags* de sequências expressas (ESTs) e transformado na cepa de *E. coli* BL21. Na proteína purificada, o sítio ativo da atividade enzimática de tautomerase parece estar localizado em torno do resíduo Pro2 como um resíduo catalítico (Park *et al.*, 2009), sendo comum caracteriza-la funcionalmente com referência à sua atividade de tautomerase e oxidoreductase (Sharma *et al.*, 2012).

O gene que codifica MIF de *S. ratti* (Sra-MIF) também foi identificado por análise de ESTs e o produto de PCR foi clonado no vetor pGEM-T Easy, depois ligado ao vetor de expressão PJC45 e transformado em *E. coli* BL21. A análise filogenética utilizando a

sequência da proteína mostrou que Sra-MIF está relacionada ao MIF tipo-2. Sra-MIF recombinante inibe a resposta imune por induzir a produção de IL-10 por monócitos humanos (Younis, Soblik, *et al.*, 2011).

2.4 Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico (HSPs) são proteínas altamente conservadas evolutivamente e expressas por organismos procariotos e eucariotos, incluindo mamíferos. Sra-HSP-17, por exemplo, é uma proteína imunoregulatória de *S. ratti* mais expressa em fêmeas adultas do parasito do que em larvas infecciosas de terceiro estágio. Peptídeos caracterizados por *tag* de sequências expressas (EST) relacionadas com HSPs são encontrados em abundância nos produtos excretórios / secretórios da fêmea do parasito, incluindo HSP 17s. Para produzir a sua forma recombinante, o RNA foi extraído a partir da fêmea do verme e utilizado para sintetizar a primeira fita de cDNA; o produto de PCR foi clonado em vetor pGEM-T Easy para amplificação e ligado no vetor PJC45 para expressão, o qual foi transformado em *E. coli* Star BL21 DE3 (Younis, Geisinger, *et al.*, 2011).

A Sra-HSP17 recombinante produzida em *E. coli* induziu a produção de IL-10 sem causar qualquer mudança na produção de TNF- α , adicionalmente os anticorpos IgG de ratos imunizados com a proteína recombinante reconheceram Sra-HSP-17 nativa, bem como a própria proteína recombinante (Younis, Geisinger, *et al.*, 2011), o que demonstra a conservação de epítopos na forma recombinante, que podem ser essenciais para desempenhar a sua atividade sobre o sistema imunológico.

Da mesma forma, a HSP60 recombinante de Wolbachia, uma bactéria endossimbionte presente em nematódeos filarídeos, foi produzida em *E. coli* BL21 DE3. Antes, o gene tinha sido amplificado a partir de DNA genômico de *B. malayi* por PCR e clonado no vetor de expressão pRSET-A para transformar em *E. coli* BL21 DE3. Assim, rHSP60 foi capaz de suprimir a proliferação de linfócitos em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com filariose, assim como o extrato do adulto de *B. malayi*, sugerindo que a proteína bacteriana pode contribuir para a imunorregulação do hospedeiro promovida por parasitos filarídeos (Shiny *et al.*, 2011).

2.5 Lectinas

As lectinas são proteínas que se ligam a estruturas de carboidratos específicos e, assim, podem reconhecer glicoconjugados; galectinas são lectinas tipo S com afinidade para β -galactosídeo. ADNc do gene que codifica uma galectina foi identificado por *immunoscreening* de uma biblioteca de ADNc de *Haemonchus contortus* com anti-soro de carneiros vacinados com um complexo de proteína de membrana, o qual foi clonado no vetor pBV220 para expressão (Newlands *et al.*, 1999). Apesar da vacinação com galectina recombinante purificada por afinidade não ter conferido proteção contra infecção a carneiros, esta induziu proteção parcial a caprinos (Newlands *et al.*, 1999; Yanming *et al.*, 2007). Além disso, verificou-se que as galectinas recombinantes de macho e fêmea de *H. contortus* (rHco-gal-m e rHco-gal-f), produzidas pelo sistema de expressão descrito acima, foram capazes de causar inibição de vias de sinalização celulares, migração celular e produção de citocinas em culturas de CMSP de cabra (Wang *et al.*, 2014).

Uma molécula homóloga de galectina-9 recombinante (rTl-gal), derivada de *Toxascaris leonina*, foi obtida a partir do ADNc da fêmea adulta do verme, cujo gene foi amplificado por PCR, extraiu-se para ligação ao vetor de expressão pET28a e os plasmídeos recombinantes foram transformados na linhagem de *E. coli* BL21. Quando testada num modelo murino de colite induzida por dextran sulfato de sódio, promoveu a inibição da inflamação intestinal, por meio de aumento da produção de IL-10 e TGF- β . A sua sequência de aminoácidos evidenciou mais de 80% de identidade com galectinas de nematódeos filarídeos e 35% de identidade com galectinas humanas (Kim *et al.*, 2010).

2.6 Outras proteínas

rOvALT e rOvNLT, proteínas recombinantes derivadas de produtos excretórios / secretórios de *Onchocerca volvulus*, suprimiram a proliferação de células T antígeno-específicas e diminuíram a secreção de IL-2 e de IFN- γ por estas células, mesmo após a inativação pelo calor e digestão por protease. Este resultado indica que a supressão foi promovida por fragmentos destas proteínas, já que o efeito de LPS ou contaminantes de baixo peso molecular foi excluído (Hartmann *et al.*, 2013). A síntese da primeira fita de ADNc foi realizada usando ARN total do verme, em seguida os produtos de PCR e o vetor de expressão foram usados para transformar em *E. coli* Rossetta gami DE3 para

produzir rOvNLT-1 ou em *E. coli* Star BL21 DE3 para produzir rOvALT-2 (Hartmann *et al.*, 2013).

Outro produto excretório / secretório, a poliproteína (DiAg) do filarídeo de canino *Dirofilaria immitis*, teve o seu gene clonado no vetor pET3a e transformado na linhagem *E. coli* HMS174 DE3 (Tezuka *et al.*, 2003). O recombinante (rDiAg) foi capaz de inibir a perda de gravidez por resposta imune em um modelo murino, com a diminuição das concentrações de IL-4, IL-23 e TNF- α no soro de camundongos tratados (Komine-Aizawa *et al.*, 2011). Asparaginil-tRNA-sintetase (BmAsnRS) é uma proteína excretória / secretória de *Brugia malayi* que induz a expressão do receptor de IL-10 e tem efeito sobre expressão gênica humana distinto de IL-8, apesar de ser estruturalmente relacionado a esta quimiocina, supondo um potencial efeito anti-inflamatório talvez por dessensibilização do receptor (Kron *et al.*, 2013). Constructos de ADNc derivados da sequência de aminoácidos de AsnRS de *B. malayi* foram desenhados para expressão no sistema pET28a, resultando em uma proteína solúvel e enzimaticamente ativa (Kron *et al.*, 2013).

A glicoproteína Ts-específica de 53-kDa (TsP53) é um antígeno excretório / secretório de larvas de *Trichinella spiralis*. O produto de PCR derivado de seu ADNc, o qual foi gerado a partir do ARN total, foi inserido no vetor de expressão pET28a e o plasmídeo construído foi transformado em *E. coli* BL21 (Du *et al.*, 2011). A proteína recombinante foi capaz de melhorar colite induzida por 2, 4, 6 - ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), uma vez que as lesões mais evidentes na colite, tais como danos do epitélio e mucosa foram menos evidentes no grupo tratado. Quanto à resposta imune humoral, o grupo tratado com TsP53 recombinante produziu IgG1 específica (relacionada com a resposta Th2), mas não IgG2a (relacionada com a resposta Th1); corroborando com a indução do perfil Th2, os níveis de IL-4 e IL-13 no soro foram elevados, enquanto os níveis de TNF- α e IFN- γ foram diminuídos (Du *et al.*, 2011).

Sm16 / SmSLP é uma proteína anti-inflamatória de *S. mansoni* de 16 kDa, cuja produção recombinante a partir do ADNc nativo tem rendimentos muito baixos quando se utiliza sistemas de bactérias, leveduras e insetos (Valle *et al.*, 1999). Uma alternativa foi construir um gene sintético que codifica a sequência dos aminoácidos 23 a 117 de Sm16 com códons otimizados para produzir a proteína modificada e solúvel para facilitar a expressão e purificação, especialmente devido à substituição de resíduos de

aminoácidos Ile-92 e Leu-93 por resíduos de Ala. Assim, a proteína modificada foi produzida com sucesso por *E. coli* e *P. pastoris* com a massa molecular deduzida de 13,6 kDa. Ela inibiu a produção de IL-6 induzida por LPS, TNF- α e IL-1 β em sangue total, bem como evitou ativação de TLR4 e TLR3 e atrasou o processamento de antígeno em macrófagos derivados da medula óssea de murino (Brännström *et al.*, 2009; Sanin e Mountford, 2015). Sm16 compartilha 99% de similaridade com o seu homólogo de *S. japonicum* (Sj16). A sequência que codifica Sj16 amplificada por PCR foi ligada ao vetor pGEX e usada para transformar *E. coli* BL21 DE3 (Hu *et al.*, 2009). A proteína Sj16 recombinante aumentou a produção de IL-10, enquanto que a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α) e a migração e atividade fagocítica de macrófagos foram inibidas. Por outro lado, o LPS é capaz de induzir a atividade fagocítica de macrófagos (Sun *et al.*, 2012), indicando que o efeito não pode ser atribuído à contaminação por LPS.

Uma visão geral sobre proteínas recombinantes de helmintos com efeitos imunoregulatórios está apresentada na Tabela 1.

3. Potencial Terapêutico das Proteínas Recombinantes de Helmintos para Doenças Inflamatórias

3.1 Inflamação alérgica das vias aéreas

O modelo experimental geralmente utilizado para estudar a asma é a inflamação alérgica das vias aéreas induzida por ovalbumina, caracterizada por uma resposta tipicamente Th2. Utilizando este modelo, Park e colaboradores mostraram que o tratamento com rAs-MIF, produzida pela linhagem de *E. coli* BL21, reduziu a hipersensibilidade das vias aéreas e a inflamação por meio da indução de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e do aumento da produção de IL-10 e TGF- β (Park *et al.*, 2009). Além disso, este grupo observou uma diminuição na produção de citocinas Th2 em CMSP de pacientes com asma atópica estimuladas por este antígeno, sugerindo um mecanismo semelhante de imunomodulação (Park *et al.*, 2012).

rAcCystatin, uma cistatina derivada de *Angiostrongylus cantonensis*, foi capaz de inibir vários parâmetros inflamatórios que caracterizam a asma, tais como a expressão de

citocinas e quimiocinas, níveis de IgE e inflamação pulmonar, em modelo murino induzido por ovalbumina / hidróxido alumínio, tanto quando utilizado para a imunização como quando utilizado para tratamento. Ambos, imunização e tratamento promoveram a inibição dos parâmetros mencionados; no entanto algumas diferenças demonstraram o impacto da diferença entre os protocolos: IgE específica para ovalbumina no soro e células inflamatórias no sangue periférico foram reduzidas apenas na imunização por rAcCystatin, enquanto o nível de IL-10 foi significativamente maior no protocolo de tratamento (Ji *et al.*, 2015).

rAvCystatin de *Acanthocheilonema vitae* expressa em *E. coli* inibiu a resposta Th2 alérgica específica ao pólen de grama e a hiperreatividade das vias aéreas em camundongos sensibilizados pelo alérgeno. Localmente, rAvCystatin suprimiu a inflamação pulmonar, diminuiu a produção de muco e infiltração celular, especialmente de eosinófilos. Além disso, também imunoregulou a resposta sistêmica, uma vez que os níveis de IgE total e específica para o alérgeno foram reduzidos, assim como a produção de citocinas Th2 por esplenócitos (Daniłowicz-Luebert *et al.*, 2013). Mais recentemente, um novo tipo de macrófago regulatório gerado pelo estímulo com esta proteína recombinante foi identificado por fenotipagem, e a transferência adotiva de tais células foi capaz de suprimir a inflamação alérgica das vias aéreas, e quando em co-cultura com células dendríticas e células T CD4+, estes macrófagos induziram a produção de IL-10 (Ziegler *et al.*, 2015).

Proteínas recombinantes do platelminto *S. mansoni* (Sm22.6 e Sm29) também expressas em *E. coli* foram capazes de suprimir a inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina, em modelo murinho. A imunomodulação ocorreu por células T CD4+ CD25+ Foxp3+ junto com produção aumentada de IL-10 por Sm22.6, enquanto não houve aumento da produção dessa citocina por Sm29 (Cardoso *et al.*, 2010). Corroborando com o observado pela injeção de ovos de *S. mansoni* também em modelo de inflamação das vias aéreas, onde apesar do aumento da expressão de IL-10, ela não foi essencial para a supressão da inflamação (Pacífico *et al.*, 2009).

3.2 Doenças inflamatórias intestinais

Os modelos experimentais mais amplamente utilizados no estudo das doenças inflamatórias do intestino são aqueles de colite induzida por substâncias irritantes à

mucosa intestinal, tais como o dextran sulfato de sódio (DSS) e 2, 4, 6- ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), cujas respostas imunológicas induzidas são de perfil tipicamente Th1 e/ou Th17, podendo haver envolvimento de autoimunidade (Cho, Lee e Yu, 2011; Du *et al.*, 2011).

Além disso, é interessante notar que a inflamação do intestino é suprimida por diferentes proteínas recombinantes derivadas de helmintos, possivelmente fazendo uso dos principais mecanismos de imunorregulação induzidas estes parasitos. A CsStefin-1 recombinante, uma cistatina de *Clonorchis sinensis* produzida funcionalmente por *E. coli*, foi capaz de melhorar a colite induzida por DSS, como concluído por observações visuais agrupadas no índice de atividade da doença (IAD), que foi menor no grupo tratado, assim como para exame histológico, enquanto a nível celular e molecular houve recrutamento de macrófagos produtores de IL-10, associados à inibição da produção de TNF- α (Jang *et al.*, 2011). Enquanto isto, a proteína recombinante de *T. spiralis* (rTsP53) foi capaz de inibir a colite induzida por TNBS, conforme constatado pelo IAD e pelo exame histológico, através do desvio da resposta imune para o perfil Th2 com indução de IL-4 e IL-13 (Du *et al.*, 2011).

A galectina-9 recombinante derivada de *Toxascaris leonina* foi usada para imunizar camundongos e avaliar o seu benefício na inflamação intestinal subsequente induzida por DSS; este protocolo experimental alcançou resultados similares aos descritos para CsStefin-1 e para a rTsP53; mas a imunorregulação foi atribuída à indução da produção de IL-10 e TGF- β associada à diminuição da produção de IL-4 e IFN- γ (Kim *et al.*, 2010).

As vias de sinalização envolvidas na regulação imunológica causada pela CsStefin-1 e rTI-GAL também foram avaliadas, mostrando que esta última ativou a via p38, enquanto que Cs-Stefin não o fez. Por outro lado, a via das quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) foram ativadas por ambos os tratamentos, inclusive com reversão dos efeitos imunomodulatórios, induzidos por CsStefin-1 em células epiteliais CT- 26, pelo inibidor de ERK (Kim *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2011).

Também em cultura de células epiteliais, o tratamento com o MIF recombinante derivado da larva de *A. simplex* (rAs-MIF) resultou na fosforilação de ambas as vias, ERK e p38, sendo corroborada pela inibição da expressão de IL-10 quando se usou inibidor de

ERK (Cho, Lee e Yu, 2011). rAs-MIF promoveu imunorregulação da inflamação intestinal induzida por DSS pelo mesmo mecanismo molecular que rTI-GAL, isto é, pela indução da produção de IL-10 e TGF- β , mas também agiu através do recrutamento de células Treg, resultando em redução do IAD, melhora da histopatologia e impedimento do encurtamento do cólon, que é um sinal de inflamação grave do intestino grosso (Cho, Lee e Yu, 2011).

O modelo de colite por transferência de células T é uma alternativa para avaliar o efeito nas doenças inflamatórias intestinais. Neste modelo, rBmAsnRS foi eficaz na diminuição da infiltração celular na lâmina própria, recuperando a espessura normal do órgão e a formação de criptas. Ao nível molecular, houve aumento na produção de IL-10 e IL-4 associada à diminuição dos níveis de IL-17 e IFN- γ , o que dá suporte para uma avaliação mais aprofundada desta molécula como terapia imunomodulatória (Kron *et al.*, 2013).

3.3 Artrite reumatóide

Artrite induzida por adjuvante completo de Freund (ACF) é um modelo experimental para investigar a artrite reumatóide, uma doença autoimune crônica e altamente debilitante do ser humano. Nesse modelo, Sun e colaboradores (2010) demonstraram que a proteína recombinante de *S. japonicum* (rSj16), produzida em *E. coli*, apresenta um efeito semelhante ao da dexametasona (hormônio esteróide) em ratos, haja vista que inibiu a infiltração de células inflamatórias e a formação de tecido de granulação na articulação do tornozelo ao exame histológico (Sun *et al.*, 2012). Além disso, rSj16 foi capaz de inibir TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico, ao passo que recuperou o nível de IL-10 no soro observado antes da indução da artrite (Sun *et al.*, 2012).

No espectro clínico das manifestações de artrite, os níveis de TNF- α são um marcador de morbidade. Então, terapias atuais com anticorpo monoclonal anti-TNF- α tem sido usado com resultados promissores e vem sendo estabelecido como um tratamento para a artrite psoriática, espondilite anquilosante e artrite reumatóide que não respondem à terapia convencional, apesar do alto custo do tratamento com este anticorpo monoclonal (Rossini *et al.*, 2015).

3.4 Perda de gravidez imunomediada

Durante a gravidez, o sistema imunológico da mãe deve tolerar grande número de antígenos estranhos do feto, relacionados a genes paternos. De fato, a população de células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ é aumentada durante a gravidez em comparação com mulheres não grávidas, e também aumenta com a progressão da gravidez, enquanto diminui após o parto (Somerset *et al.*, 2004). Por outro lado, em casos de aborto espontâneo foi demonstrado que a população destas células foi diminuída, especialmente na decídua (Sasaki *et al.*, 2004), confirmando a importância destas células na manutenção da gravidez. Nesta perspectiva, rDiAg produzida em linhagem de *E. coli* HMS174, derivada de uma poliproteína excretória / secretória do filarídeo canino, *Dirofilaria immitis*, foi capaz de inibir a perda imune de gravidez em um modelo murino que mimetiza a falha de gravidez humana, através da diminuição das concentrações de IL-4, IL-23 e TNF- α no soro dos camundongos tratados (Komine-Aizawa *et al.*, 2011).

Contudo, ressalta-se que apesar da imunoregulação promovida por moléculas de helmintos ocorrerem por mecanismos similares, ela pode ser específica para cada doença. Por exemplo, apesar de rTl-GAL ter apresentado bons resultados no tratamento da colite, quando usada no tratamento da encefalomielite autoimune experimental (um modelo de esclerose múltipla humana), resultou em agravamento da doença e ainda aumentou a produção de autoanticorpos (Bing *et al.*, 2015).

4. Perspectivas para o uso de moléculas recombinantes de helmintos para imunoterapia

Atualmente, as proteínas recombinantes de helmintos com potencial imunomodulatório são produzidas por sistemas de expressão em *P. pastoris* e principalmente em *E. coli* com alguns resultados promissores. No entanto, ainda há uma gama de possíveis aperfeiçoamentos nos sistemas de expressão para tornar os produtos mais semelhantes às proteínas nativas. Por exemplo, hospedeiros de expressão alternativos poderiam ser explorados para expressar proteínas heterólogas que tenham estrutura adequada (Fernández e Vega, 2013), para acentuar a imunoregulação alcançada por estas moléculas.

O desenvolvimento de novos sistemas de expressão filogeneticamente mais próximos de nemátodos parasitários, presumivelmente compartilhando a conformação correta e as modificações pós-traducionais, proporcionaria ganhos em similaridade equivalentes aos alcançados pelas linhagens celulares de mamíferos na produção de proteínas humanas. Por exemplo, o nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans* tem sido utilizado como um sistema de expressão de sucesso para a catepsina L glicosilada de *Haemonchus contortus* em sua forma ativa (Murray *et al.*, 2007).

A viabilidade de *C. elegans* como um sistema de expressão vem do conhecimento aprofundado de sua genética, considerando que este é o nematódeo mais bem caracterizado. Além disso, uma característica importante para a síntese da proteína heteróloga é a sua capacidade para realizar a adição de fosforilcolina como uma modificação pós-traducional que é um atributo comum de helmintos e está envolvida na sua capacidade de imunomodulação (Deehan *et al.*, 2002; Grabitzki *et al.*, 2008; Harnett *et al.*, 2008).

Uma alternativa para o desenvolvimento de novos sistemas de expressão é a otimização dos sistemas atualmente disponíveis, por exemplo, por engenharia do hospedeiro para possuir a maquinaria celular necessária para a produção bem-sucedida da proteína de interesse. De fato, a transferência funcional da maquinaria de glicosilação de *Campylobacter jejuni* em *E. coli* permitiu produzir proteínas glicosiladas (Schwarz *et al.*, 2010). Bactérias patogênicas tem maquinaria capaz de promover a adição de fosforilcolina como uma modificação pós-traducional (Müller *et al.*, 2014) que, no futuro, poderia ser explorada para a obtenção de proteínas com esta porção imunomodulatória.

Outra estratégia é tomar como base moléculas parasitárias para a prospecção de drogas sintéticas capazes de reproduzir seus efeitos ou acentua-los. O desenvolvimento de moléculas análogas de ES-62 baseados em sua porção de fosforilcolina têm sido utilizados com sucesso no tratamento de artrite induzida por colágeno em camundongos e de nefrite no modelo de lúpus eritematoso sistêmico, mesmo porque ES-62 nativo não é apropriada como o fármaco, devido à sua imunogenicidade (Pineda *et al.*, 2015; Rodgers *et al.*, 2015). Além disso, sua forma recombinante sem a fosforilcolina, produzida em *P. pastoris*, não tem conformação semelhante à proteína nativa e age em vias de sinalização diferentes (Goodridge *et al.*, 2007).

Portanto, os estudos com o objetivo de comparar as proteínas nativas com suas respectivas proteínas recombinantes e suas variantes seriam uma abordagem excelente para a otimização de proteínas recombinantes a fim de alcançar ou mesmo superar a atividade promovida pelas moléculas nativas.

5. Conclusão

Ferramentas de biologia molecular têm contribuído para a identificação de proteínas de helmintos responsáveis pela regulação do sistema imune do hospedeiro. As estratégias para a sua identificação e produção são diversas, desde a descoberta aleatória até a pesquisa ativa por moléculas imunorregulatórias, junto ao desenvolvimento de sistemas de expressão adequados, majoritariamente por diferentes linhagens de *E. coli*. Muitas proteínas recombinantes foram produzidas na sua forma ativa e alcançaram o efeito biológico observado na infecção, além de serem reconhecidas por anticorpos específicos para proteínas nativas.

Em modelos experimentais de doenças inflamatórias, representando diferentes respostas imunológicas, as proteínas recombinantes de helmintos têm demonstrado efeitos promissores através dos mecanismos de regulação imunológica descritos anteriormente, como a modulação da produção de citocinas, recrutamento de células regulatórias e desvio imunológico, dando suporte para o avanço de estudos para a completa caracterização dessas moléculas.

O potencial terapêutico de proteínas recombinantes de helmintos pode ser adicionalmente elevado pela superação das limitações dos sistemas de expressão em uso, de modo a obter moléculas mais similares às proteínas nativas que seriam capazes de mimetizar a imunomodulação observada em infecções helmínticas.

Referências

Ansell, B. R. et al. Insights into the immuno-molecular biology of *Angiostrongylus vasorum* through transcriptomics--prospects for new interventions. **Biotechnol Adv**, v. 31, n. 8, p. 1486-500, Dec 2013. ISSN 1873-1899. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895945>>.

Arico, C.; Bonnet, C.; Javaud, C. N-glycosylation humanization for production of therapeutic recombinant glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Mol Biol**, v. 988, p. 45-57, 2013. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475713> >.

Assenberg, R. et al. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Curr Opin Struct Biol**, v. 23, n. 3, p. 393-402, Jun 2013. ISSN 1879-033X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731801> >.

Baqueiro, T. et al. Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. **Respir Res**, v. 11, p. 51, 2010. ISSN 1465-993X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20433763 >.

Bashi, T. et al. The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 2, p. 98-104, Feb 2015. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25449677> >.

Berriman, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-8, Jul 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19606141> >.

Bing, S. J. et al. Galectin isolated from parasite inhibits remission of experimental autoimmune encephalomyelitis by up-regulating autoantibody. **Clin Exp Immunol**, v. 180, n. 3, p. 419-31, Jun 2015. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25619397> >.

Borloo, J. et al. In-depth proteomic and glycomic analysis of the adult-stage *Cooperia oncophora* excretome/secretome. **J Proteome Res**, v. 12, n. 9, p. 3900-11, Sep 2013. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895670> >.

Brenna, Ø. et al. Relevance of TNBS-colitis in rats: a methodological study with endoscopic, histologic and Transcriptomic [corrected] characterization and correlation to IBD. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54543, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382912> >.

Brännström, K. et al. The *Schistosoma mansoni* protein Sm16/SmSLP/SmSPO-1 assembles into a nine-subunit oligomer with potential To inhibit Toll-like receptor signaling. **Infect Immun**, v. 77, n. 3, p. 1144-54, Mar 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124604> >.

Cantacessi, C. et al. Bioinformatics meets parasitology. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 5, p. 265-75, May 2012. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615422> >.

Cho, M. K.; Lee, C. H.; Yu, H. S. Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through toll-like receptor 2.

Parasite Immunol, v. 33, n. 5, p. 265-75, May 2011. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204854> >.

Choi, Y. J. et al. A deep sequencing approach to comparatively analyze the transcriptome of lifecycle stages of the filarial worm, *Brugia malayi*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p. e1409, Dec 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180794> >.

Collins, P. R. et al. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 17, p. 17038-46, Apr 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754899> >.

Croese, J. et al. A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 136-7, Jan 2006. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16344586> >.

Croft, A. M.; Bager, P.; Kumar, S. Helminth therapy (worms) for allergic rhinitis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, p. CD009238, 2012. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513973> >.

Cwiklinski, K. et al. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. **Genome Biol**, v. 16, p. 71, 2015. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887684> >.

Daniłowicz-Luebert, E. et al. A nematode immunomodulator suppresses grass pollen-specific allergic responses by controlling excessive Th2 inflammation. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 3-4, p. 201-10, Mar 2013. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23174104> >.

Deehan, M. et al. Immunomodulatory properties of *Ascaris suum* glycosphingolipids - phosphorylcholine and non-phosphorylcholine-dependent effects. **Parasite Immunol**, v. 24, n. 9-10, p. 463-9, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 0141-9838. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12654088 >.

Donnelly, S. et al. Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. **J Biol Chem**, v. 285, n. 5, p. 3383-92, Jan 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923225> >.

Du, L. et al. The protective effect of the recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice. **Dig Dis Sci**, v. 56, n. 10, p. 2810-7, Oct 2011. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476030> >.

_____. Regulation of recombinant *Trichinella spiralis* 53-kDa protein (rTsP53) on alternatively activated macrophages via STAT6 but not IL-4R α in vitro. **Cell Immunol**, v. 288, n. 1-2, p. 1-7, 2014 Mar-Apr 2014. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24534206> >.

Ebner, F. et al. Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease. **Allergy**, v. 69, n. 11, p. 1489-97, Nov 2014. ISSN 1398-9995. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069662> >.

Fernández, F. J.; Vega, M. C. Technologies to keep an eye on: alternative hosts for protein production in structural biology. **Curr Opin Struct Biol**, v. 23, n. 3, p. 365-73, Jun 2013. ISSN 1879-033X. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481468> >.

Fernández-Robledo, J. A.; Vasta, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. **Trends Parasitol**, v. 26, n. 5, p. 244-54, May 2010. ISSN 1471-5007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189877> >.

Foth, B. J. et al. Whipworm genome and dual-species transcriptome analyses provide molecular insights into an intimate host-parasite interaction. **Nat Genet**, v. 46, n. 7, p. 693-700, Jul 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929830> >.

Frenzel, A.; Hust, M.; Schirrmann, T. Expression of recombinant antibodies. **Front Immunol**, v. 4, p. 217, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908655> >.

Fujihara, J. et al. Two N-linked glycosylation sites (Asn18 and Asn106) are both required for full enzymatic activity, thermal stability, and resistance to proteolysis in mammalian deoxyribonuclease I. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 72, n. 12, p. 3197-205, Dec 2008. ISSN 1347-6947. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060393> >.

Garg, S. K.; Croft, A. M.; Bager, P. Helminth therapy (worms) for induction of remission in inflammatory bowel disease. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 1, p. CD009400, 2014. ISSN 1469-493X. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24442917> >.

Gasser, R. B. A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. **Vet Parasitol**, v. 193, n. 4, p. 353-64, Apr 2013. ISSN 1873-2550. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485434> >.

Ghedin, E. Panning for molecular gold in whipworm genomes. **Nat Genet**, v. 46, n. 7, p. 661-3, Jul 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24965726> >.

Ghedin, E. et al. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1756-60, Sep 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17885136> >.

Goodridge, H. S. et al. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 3, p. 127-37, Mar 2007. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266740> >.

Grabitzki, J. et al. The PCome of *Caenorhabditis elegans* as a prototypic model system for parasitic nematodes: identification of phosphorylcholine-substituted proteins. **Mol Biochem Parasitol**, v. 161, n. 2, p. 101-11, Oct 2008. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652849> >.

Gruden-Movsesijan, A. et al. Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. **Parasite Immunol**, v. 32, n. 6, p. 450-9, Jun 2010. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500676> >.

Harnett, M. M. et al. The phosphorylcholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 4, p. 518-23, Apr 2008. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17704067> >.

Harnett, W.; Harnett, M. M. Immunomodulatory activity and therapeutic potential of the filarial nematode secreted product, ES-62. **Adv Exp Med Biol**, v. 666, p. 88-94, 2009. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20054977> >.

Hartmann, S. et al. A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 9, p. 2253-60, Sep 1997. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9341767> >.

Hartmann, W. et al. Nematode-derived proteins suppress proliferation and cytokine production of antigen-specific T cells via induction of cell death. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e68380, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861729> >.

He, L. et al. Biochemical and immunological characterization of annexin B30 from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products. **Parasitol Res**, v. 113, n. 7, p. 2743-55, Jul 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24861011> >.

Hu, S. et al. Molecular cloning and expression of a functional anti-inflammatory protein, Sj16, of *Schistosoma japonicum*. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 2, p. 191-200, Jan 2009. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804475> >.

Huang, C. J.; Lin, H.; Yang, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, n. 3, p. 383-99, Mar 2012. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252444> >.

Hübner, M. P. et al. Helminth protection against autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice is independent of a type 2 immune shift and requires TGF- β . **J Immunol**, v. 188, n. 2, p. 559-68, Jan 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174447> >.

Jacobs, P.; Bissonnette, R.; Guenther, L. C. Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases--focusing on work productivity and disability. **J Rheumatol Suppl**, v. 88, p. 55-61, Nov 2011. ISSN 0380-0903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045980> >.

Jang, S. W. et al. Parasitic helminth cystatin inhibits DSS-induced intestinal inflammation via IL-10(+)F4/80(+) macrophage recruitment. **Korean J Parasitol**, v. 49, n. 3, p. 245-54, Sep 2011. ISSN 1738-0006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072824> >.

Jex, A. R. et al. *Ascaris suum* draft genome. **Nature**, v. 479, n. 7374, p. 529-33, Nov 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031327> >.

_____. Genome and transcriptome of the porcine whipworm *Trichuris suis*. **Nat Genet**, v. 46, n. 7, p. 701-6, Jul 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929829> >.

Ji, P. et al. AcCystatin, an immunoregulatory molecule from *Angiostrongylus cantonensis*, ameliorates the asthmatic response in an aluminium hydroxide/ovalbumin-induced rat model of asthma. **Parasitol Res**, v. 114, n. 2, p. 613-24, Feb 2015. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25399816> >.

Kang, J. M. et al. Identification and functional characterization of CsStefin-1, a cysteine protease inhibitor of *Clonorchis sinensis*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 177, n. 2, p. 126-34, Jun 2011. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354219> >.

Karnaukhova, E. et al. Expression of human alpha1-proteinase inhibitor in *Aspergillus niger*. **Microb Cell Fact**, v. 6, p. 34, 2007. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967194> >.

Khan, W. et al. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 5931-7, Nov 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12379667 >.

Kim, J. Y. et al. Inhibition of dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal inflammation via enhanced IL-10 and TGF-beta production by galectin-9 homologues isolated from intestinal parasites. **Mol Biochem Parasitol**, v. 174, n. 1, p. 53-61, Nov 2010. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603157> >.

Kim, S. E. et al. Crude extracts of *Caenorhabditis elegans* suppress airway inflammation in a murine model of allergic asthma. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35447, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558152> >.

Komine-Aizawa, S. et al. The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune-mediated pregnancy loss. **J Reprod Immunol**, v. 92, n. 1-2, p. 21-6, Dec 2011. ISSN 1872-7603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983343> >.

Kron, M. A. et al. Nematode asparaginyl-tRNA synthetase resolves intestinal inflammation in mice with T-cell transfer colitis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 20, n. 2, p. 276-81, Feb 2013. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254300> >.

Layland, L. E. et al. *Schistosoma mansoni*-mediated suppression of allergic airway inflammation requires patency and Foxp3⁺ Treg cells. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2379, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23967364> >.

Lee, H. M. et al. Up-regulation of protease-activated receptor 2 in allergic rhinitis. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 116, n. 7, p. 554-8, Jul 2007. ISSN 0003-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727088> >.

Lohman, R. J. et al. Antagonism of protease-activated receptor 2 protects against experimental colitis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 340, n. 2, p. 256-65, Feb 2012. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22028393> >.

Maizels, R. M.; McSorley, H. J.; Smyth, D. J. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? **Clin Exp Immunol**, v. 177, n. 1, p. 38-46, Jul 2014. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24749722> >.

Mazor, Y. et al. Isolation of full-length IgG antibodies from combinatorial libraries expressed in *Escherichia coli*. **Methods Mol Biol**, v. 525, p. 217-39, xiv, 2009. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252859> >.

Mishra, P. K. et al. Systemic impact of intestinal helminth infections. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 4, p. 753-62, Jul 2014. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736234> >.

Mitreva, M. et al. The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. **Nat Genet**, v. 43, n. 3, p. 228-35, Mar 2011. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21336279> >.

Morphew, R. M. et al. Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by Nonidet P40. **Vet Parasitol**, v. 191, n. 3-4, p. 379-85, Jan 2013. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021260> >.

Murray, L. et al. Expression and purification of an active cysteine protease of *Haemonchus contortus* using *Caenorhabditis elegans*. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1117-25, Aug 2007. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451718> >.

Müller, M. P. et al. Exploring adenylation and phosphocholination as post-translational modifications. **Chembiochem**, v. 15, n. 1, p. 19-26, Jan 2014. ISSN 1439-7633. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24174209> >.

Nagayasu, E. et al. Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitol Int**, v. 62, n. 1, p. 57-65, Feb 2013. ISSN 1873-0329. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022620> >.

Newlands, G. F. et al. Cloning and characterization of a beta-galactoside-binding protein (galectin) from the gut of the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 119 (Pt 5), p. 483-90, Nov 1999. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599080> >.

Pacífico, L. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 98-107, Jan 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18824533 >.

Park, H. K. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Isolated from a Parasite Inhibited Th2 Cytokine Production in CMSPs of Atopic Asthma Patients. **J Asthma**, v. 49, n. 1, p. 10-5, Feb 2012. ISSN 1532-4303. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149098> >.

Park, S. K. et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of anisakis simplex suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. **J Immunol**, v. 182, n. 11, p. 6907-14, Jun 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454687> >.

Parker, W.; Ollerton, J. Evolutionary biology and anthropology suggest biome reconstitution as a necessary approach toward dealing with immune disorders. **Evol Med Public Health**, v. 2013, n. 1, p. 89-103, Jan 2013. ISSN 2050-6201. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481190> >.

Pfeifer, B. A.; Khosla, C. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 65, n. 1, p. 106-18, Mar 2001. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238987> >.

Pineda, M. A. et al. From the worm to the pill, the parasitic worm product ES-62 raises new horizons in the treatment of rheumatoid arthritis. **Lupus**, v. 24, n. 4-5, p. 400-11, Apr 2015. ISSN 1477-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801883> >.

_____. The parasitic helminth product ES-62 suppresses pathogenesis in collagen-induced arthritis by targeting the interleukin-17-producing cellular network at multiple sites. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 10, p. 3168-78, Oct 2012. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729944> >.

Puneet, P. et al. The helminth product ES-62 protects against septic shock via Toll-like receptor 4-dependent autophagosomal degradation of the adaptor MyD88. **Nat Immunol**, v. 12, n. 4, p. 344-51, Apr 2011. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21358639> >.

Rodgers, D. T. et al. Drug-like analogues of the parasitic worm-derived immunomodulator ES-62 are therapeutic in the MRL/Lpr model of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Jun 2015. ISSN 1477-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085597> >.

Roger, T. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). **J Endotoxin Res**, v. 9, n. 2, p. 119-23, 2003. ISSN 0968-0519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12803886> >.

Rossini, M. et al. Why golimumab in the treatment of psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis? **Reumatismo**, v. 66, n. 4, p. 285-303, 2015. ISSN 0048-7449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25829189> >.

Sanin, D. E.; Mountford, A. P. Sm16, a major component of *Schistosoma mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical activation and delays antigen processing. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 1, 2015. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25561160> >.

Santos, L. N. et al. A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects. **Parasite Immunol**, v. 35, n. 5-6, p. 188-93, May 2013. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398517> >.

Sasaki, Y. et al. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. **Mol Hum Reprod**, v. 10, n. 5, p. 347-53, May 2004. ISSN 1360-9947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14997000> >.

Schmidlin, F. et al. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. **J Immunol**, v. 169, n. 9, p. 5315-21, Nov 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391252> >.

Schwarz, F. et al. A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. **Nat Chem Biol**, v. 6, n. 4, p. 264-6, Apr 2010. ISSN 1552-4469. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190762> >.

Sharma, R. et al. Molecular and functional characterization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) homolog of human from lymphatic filarial parasite *Wuchereria bancrofti*. **Parasitol Res**, v. 111, n. 5, p. 2035-47, Nov 2012. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22875393> >.

Shiny, C. et al. Recombinant *Wolbachia* heat shock protein 60 (HSP60) mediated immune responses in patients with lymphatic filariasis. **Microbes Infect**, v. 13, n. 14-

15, p. 1221-31, Dec 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827871> >.

Smooker, P. M. et al. Cathepsin B proteases of flukes: the key to facilitating parasite control? **Trends Parasitol**, v. 26, n. 10, p. 506-14, Oct 2010. ISSN 1471-5007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580610> >.

Sofronic-Milosavljevic, L. J. et al. Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Med Microbiol Immunol**, v. 202, n. 3, p. 239-49, Jun 2013. ISSN 1432-1831. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307236> >.

Somerset, D. A. et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. **Immunology**, v. 112, n. 1, p. 38-43, May 2004. ISSN 0019-2805. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096182> >.

Stack, C. M. et al. De-glycosylation of *Pichia pastoris*-produced *Schistosoma mansoni* cathepsin B eliminates non-specific reactivity with IgG in normal human serum. **J Immunol Methods**, v. 304, n. 1-2, p. 151-7, Sep 2005. ISSN 0022-1759. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125194> >.

Strachan, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, Nov 1989. ISSN 0959-8138. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2513902> >.

Summers, R. et al. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. 825-32, Apr 2005a. ISSN 0016-5085. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15825065 >.

_____. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 87-90, Jan 2005b. ISSN 0017-5749. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15591509 >.

Sun, X. et al. Effects of a recombinant schistosomal-derived anti-inflammatory molecular (rSj16) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced activated RAW264.7. **Parasitol Res**, v. 110, n. 6, p. 2429-37, Jun 2012. ISSN 1432-1955. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281546> >.

Sun, Y. et al. Modulation of dendritic cell function and immune response by cysteine protease inhibitor from murine nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. **Immunology**, v. 138, n. 4, p. 370-81, Apr 2013. ISSN 1365-2567. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23240853> >.

Tang, Y. T. et al. Genome of the human hookworm *Necator americanus*. **Nat Genet**, v. 46, n. 3, p. 261-9, Mar 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441737> >.

Tezuka, H. et al. Various types of *Dirofilaria immitis* polyproteins selectively induce a Th2-Type immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 7, p. 3802-11, Jul 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12819063> >.

Valle, C. et al. Stage-specific expression of a *Schistosoma mansoni* polypeptide similar to the vertebrate regulatory protein stathmin. **J Biol Chem**, v. 274, n. 48, p. 33869-74, Nov 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567347> >.

Vedadi, M. et al. Biophysical characterization of recombinant proteins: a key to higher structural genomics success. **J Struct Biol**, v. 172, n. 1, p. 107-19, Oct 2010. ISSN 1095-8657. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466062> >.

Vermeire, J. J. et al. Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 8, p. 355-63, Aug 2008. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18603473> >.

Viehmann Milam, A. A. et al. A humanized mouse model of autoimmune insulinitis. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1712-24, May 2014. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478396> >.

Wang, W. et al. Transcriptional and proteomic analysis reveal recombinant galectins of *Haemonchus contortus* down-regulated functions of goat CMSP and modulation of several signaling cascades in vitro. **J Proteomics**, v. 98, p. 123-37, Feb 2014. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24401599> >.

Wasley, L. C. et al. The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. **Blood**, v. 77, n. 12, p. 2624-32, Jun 1991. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2043765> >.

Yang, X. et al. Cloning, expression and characterisation of a type II cystatin from *Schistosoma japonicum*, which could regulate macrophage activation. **Parasitol Res**, v. 113, n. 11, p. 3985-92, Nov 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25096535> >.

Yanming, S. et al. Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 6, p. 319-26, Jun 2007. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518950> >.

Younis, A. E. et al. Stage-specific excretory-secretory small heat shock proteins from the parasitic nematode *Strongyloides ratti*--putative links to host's intestinal mucosal defense system. **FEBS J**, v. 278, n. 18, p. 3319-36, Sep 2011. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762402> >.

_____. Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Strongyloides* acting at the parasite-host cell

interface. **Microbes Infect**, Oct 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037391> >.

Zhang, H.; Zeng, X.; He, S. Evaluation on potential contributions of protease activated receptors related mediators in allergic inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 829068, 2014. ISSN 1466-1861. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876677> >.

Zhou, Q. J. et al. Expression of *Caenorhabditis elegans*-expressed Trans-HPS, partial aminopeptidase H11 from *Haemonchus contortus*. **Exp Parasitol**, v. 145, p. 87-98, Oct 2014. ISSN 1090-2449. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25128369> >.

Zhu, X. Q. et al. Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. **Nat Commun**, v. 6, p. 6145, 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25649139> >.

Ziegler, T. et al. A Novel Regulatory Macrophage Induced by a Helminth Molecule Instructs IL-10 in CD4+ T Cells and Protects against Mucosal Inflammation. **J Immunol**, v. 194, n. 4, p. 1555-64, Feb 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589067> >.

Quadro 1. Bancos de dados relacionados a helmintos

As bases de dados genômicas são essenciais para a modelagem bioinformática e tem alcançado grande progresso nos últimos anos. O objetivo é disseminar genomas de referência de alta qualidade e disponibilizar ferramentas de análise para a comunidade científica de um modo útil e amigável ao usuário (Martin et al., 2015). As bases de dados de helmintos, especificamente, visam fornecer subsídios para o avanço na compreensão da biologia de helmintos e desenvolvimento de terapias curativas ou preventivas para doenças negligenciadas (Mangiola et al., 2013).

Embora genomas de helmintos ainda estejam em sua infância, atualmente o 50 Helminth Genoma Initiative de Wellcome Trust Sanger Institute (<https://www.sanger.ac.uk/research/initiatives/globalhealth/research/helminthgenomes/>) contribuiu amplamente para investigação sobre os papéis de genes de helmintos e seus transcritos visando identificar novos alvos de intervenção no diagnóstico, imunização e tratamento de infecções por helmintos e, adicionalmente, para ajudar na obtenção de informações sobre a capacidade imunomodulatória de moléculas de helmintos sobre doenças inflamatórias. Outro banco de dados específico para helmintos, Helminth.net (www.helminth.net), formado pelos websites nematode.net e trematode.net, fornece uma série de ferramentas de análise que tomam proveito de uma coleção de banco de dados relacionados a helmintos, a fim de explorar o conhecimento sobre a expressão e a função dos genes destes parasitos. As ferramentas de análise incluem: Nemapath / Tremapath que compara vias KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) contra vários organismos que podem ser definidos pelo usuário; Nemagene / Tremagene buscam genes por nome, anotação, cluster ou estágio de desenvolvimento; Além de outros relacionados a regiões conservadas, fármacos e identificação de alvo da vacina, etc (Martin et al., 2015).

A anotação funcional da sequência gênica de helmintos depende de análises comparativas baseadas em homologia com conjuntos de dados de sequências já curados e anotados para uma série de organismos (Cantacessi et al., 2012). Uma grande parte de transcritos e produtos gênicos desses helmintos não podem ser funcionalmente anotados usando esta abordagem, devido a ausência de moléculas homólogas em conjuntos de dados disponíveis (Mangiola et al., 2013). Assim, os conjuntos de dados transcriptômicos para 11 helmintos importantes socioeconomicamente foram compilados e curados para criar um novo banco de dados de helminto, HelmDB (www.helmdb.org). Ele usa uma abordagem específica baseada na integração de dados e de transferência de anotação que é capaz de fornecer anotação de Ontologia Gênica para proteínas que, convencionalmente, não seriam anotadas (Mangiola et al., 2013).

Por outro lado, o 959 Nematode Genoma (www.nematodegenomes.org) é um banco de dados baseado na plataforma Semantic MediaWiki (SMW), ou seja, um site que permite que qualquer pessoa adicione, exclua ou revise o conteúdo usando um navegador da web. Desse modo, a proposta é conectar os usuários e compartilhar dados para formar colaborações mais do que dar suporte a anotação funcional; e tornar os resultados dos estudos em andamento disponíveis mais do que disponibilizar genomas completos, que é mais adequado para os bancos de dados convencionais (Kumar, Schiffer e Blaxter, 2012) (Kumar et al., 2012).

Atualmente, os bancos de dados específicos de helmintos favorecem, em especial, a compreensão dos mecanismos de interação com o hospedeiro que são exclusivos para essa classe de parasitas e podem ser exploradas nas estratégias de busca e produção de moléculas com potencial para regular o sistema imunológico do hospedeiro e, subsequentemente, serem utilizadas no tratamento de doenças relacionadas com a exacerbação da resposta imune.

Tabela 1. Proteínas recombinantes de helmintos com propriedades imunoregulatórias

Proteína recombinante	Helminto de origem	Classe da proteína	Mecanismo de Imunoregulação	Modelo experimental	Sistema de expressão hospedeiro /vetor/indução	Peso molecular	Referência
Protease catepsina L (rFheCL1)	<i>F. hepatica</i>	Protease	Supressão de inflamação de Th1 orientada por macrófagos	Modelo murino de sepse; Cultura celular de macrófagos	<i>P. pastoris</i> GSII5 / pPIC9K / Metanol	24,5 kDa	(Collins et al., 2004;Donnelly et al, 2010)
Catepsina B1 (SmB1)	<i>S. mansoni</i>	Protease	Supressão da secreção de citocinas proinflamatórias de macrófago	Cultura celular de macrófagos	<i>P. pastoris</i> GSII5 / pPIC9K / Metanol	39,0 kDa	(Donnelly et al., 2010;Pilha et al, 2005)
Glutathiona transferase classe sigma (rFhGST-si)	<i>F. hepatica</i>	Antioxidante	Supressão da resposta imune Th17	Cultura de células dendríticas	<i>Escherichia coli</i>	24,5 kDa	(Dowling et al, 2010)
Cistatina tipo I (CsStefin-1)	<i>C. sinensis</i>	Cistatina	Recrutamento de macrófagos secretores de IL-10	Inflamação Intestinal induzida por DSS	<i>Escherichia coli</i> (M15) / pQE-30 / IPTG	12.0 kDa	(Jang et al., 2011)
(rHp-CPI)	<i>H. polygyrus</i>	Cistatina	Modula a ativação e maturação de células dendríticas	Cultura de células dendríticas e co-	<i>Escherichia coli</i> (Origami) / pET32a / IPTG	15,7 kDa	(Sun et al., 2013)

					cultura com células T		
AvCystatin	<i>A. viteae</i>	Cistatina	Supressão de respostas Th2 alérgico específico	Resposta alérgica específicas ao pólen de grama	<i>Escherichia coli</i> / pET28a / IPTG	17.2 kDa	(Daniłowicz-Luebert et al, 2013;Hartmann et al, 1997)
FhHDM-1	<i>F. hepatica</i>	Catelicidina-like	Liga-se e neutraliza LPS	Inflamação induzida por LPS	<i>Escherichia coli</i> (BL21) / pET21b /IPTG	9,2 kDa	(Robinson et al., 2011)
Proteína de 53 kDa (rTsP53)	<i>T. spiralis</i>	glicoproteína	Desvio imune Th2	Colite induzida por TNBS	<i>Escherichia coli</i> (BL21) / pET28a /IPTG	53,0 kDa	(Du et al., 2011)
Bm-33	<i>B. malayi</i>	Inibidor de pepsina	Diminuição de limfoproliferação	CMSP de indivíduos infectados por <i>W. bancrofti</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) / pRSET-A / IPTG	33,0 kDa	(Krushna et al., 2011)
rDiAg	<i>D. immitis</i>	Poliproteína	Inibição de IL-4, IL-23, TNF- α e IL-17	Perda de gravidez imuno-mediada	<i>Escherichia coli</i> HMS174 (DE3) /pET3A / IPTG	15,0 kDa	(Komine-Aizawa et al., 2011)
Sra-MIF	<i>S. rattii</i>	Homólogo de citocina	Aumento do nível de IL-10	Cultura de CMSP	<i>Escherichia coli</i> BL21 /pJC45 / IPTG	13.5 kDa	(Younis et al., 2011b)

Sj16	<i>S. japonicum</i>	-	Aumento de IL-10 e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e não	Cultura celular de macrófago	<i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3) / pGEX-4T/ IPTG	kDa 16,0	(Sun et al., 2012)
ShTSP2	<i>S. haematobium</i>	Proteína do tegumento	Aumento do nível de IL-10	-	<i>Escherichia coli</i>	-	(Lima et al., 2013)
Sm29	<i>S. mansoni</i>	Glicoproteína ligada a membrana	Aumento do nível de IL-10	-	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) / pET21a / IPTG	18,0 kDa	(Lima et al., 2013)
As-MIF	<i>A. simplex</i>	Homólogo de citobmasncina	Aumento do nível de IL-10 e TGF- β e recrutamento de células T reg	Colite intestinal e inflamação alérgicas das vias aéreas	<i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3) / pET28a /IPTG	13,0 kDa	(Cho et al., 2011; Park et al, 2009)
rHco-gal-m rHco-gal-f	<i>H. contortus</i>	Lectina	Modulação de cascatas de sinalização <i>in vitro</i>	Cultura de CMSP de cabras saudáveis	<i>Escherichia coli</i> DH5 α / pBV220 / IPTG	32,5 kDa	(Wang et al., 2014)
Anexina B (rCsANXB30)	<i>C. sinensis</i>	Proteína de ligação	Alta indução de IL-10 e IgG1	-	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) / pET28a /IPTG	38,8 kDa	(He et al., 2014)
Sra-HSP17s	<i>S. ratti</i>	Proteína de choque térmico	Indução da produção de IL-10, mas não de TNF- α	Cultura de CMSP de indivíduos saudáveis,	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) / pJC45 /IPTG	18 – 19 kDa	(Younis et al., 2011b)

OvALT-2	<i>O. volvulus</i>		Indução da morte de células T	Cultura de esplenócitos	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) / pJC40 / IPTG	15,0 kDa	(Hartmann <i>et al.</i> , 2013)
OvNLT-1	<i>O. volvulus</i>		Indução da morte de células T	Cultura de esplenócitos	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) / pJC40 / IPTG	-	(Hartmann <i>et al.</i> , 2013)
Galectin-9	<i>T. leonina</i>	Lectina	Aumento da produção de TGF-b e IL-10.	Inflamação intestinal induzida por DSS	<i>Escherichia coli</i> BL21 / pET28a / IPTG	31.5 kDa	(Kim <i>et al.</i> , 2010)
HSP-60	<i>Wolbachia</i> (bactéria endossimbionte de nematodeos filarídeos)	Proteína de choque térmico	Aumento da produção de IL-10 e TGF- β e reduzida expressão de IFN- γ .	Cultura de CMSP de pacientes com filariose	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) / pRSET-A / rrrrr	60,0 kDa	(Shiny <i>et al.</i> , 2011)

UMA ABORDAGEM GERAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE HELMINTOS COM ATIVIDADE IMUNOREGULATÓRIA EM POTENCIAL

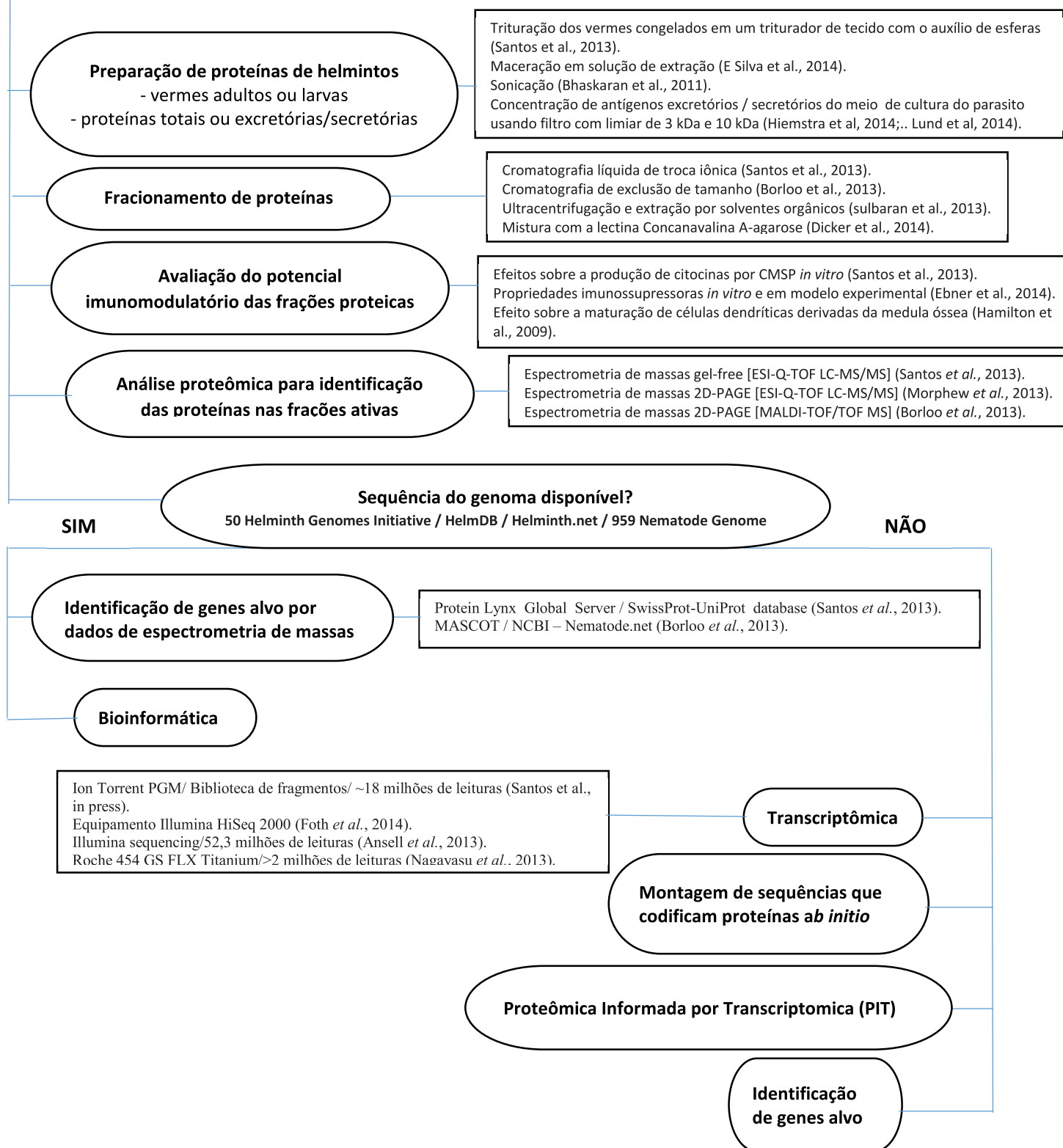


Figura 1. Uma abordagem geral para identificação de proteínas de helminto com atividade imunoregulatória em potencial.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar proteínas de *Trichuris trichiura* com atividade imunomodulatória e os seus respectivos genes codificadores.

Objetivos Específicos

Identificar, por espectrometria de massas, o conteúdo proteico de frações do extrato somático de *T. trichiura* provenientes de cromatografia de troca iônica, com atividade imunomodulatória sobre células mononucleares do sangue periférico humanas *in vitro*.

Sequenciar e caracterizar o transcriptoma total do verme adulto de *Trichuris trichiura*.

Identificar genes que codificam proteínas de *Trichuris trichiura* com atividade imunomodulatória, através de análises comparativas do transcriptoma *in silico*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Manuscrito 1. Uma Abordagem Proteômica para Identificar Proteínas do Extrato de *Trichuris trichiura* com Efeitos Imunomodulatórios.

Autores: Leonardo N Santos, Margareth B C Gallo, Eduardo S Silva, Camila AV Figueiredo, Philip J Cooper, Maurício L Barreto, Sebastião Loureiro, Lain C Pontes-de-Carvalho, Neuza M Alcântara-Neves

Publicado no periódico: Parasite Immunology

Fator de impacto: 2,143

Manuscrito 1 Publicado. A Proteomic Approach to Identify Proteins from *Trichuris trichiura* Extract with Immunomodulatory Effects (Anexo A).

Uma Abordagem Proteômica para Identificar Proteínas do Extrato de *Trichuris trichiura* com Efeitos Imunomodulatórios

Leonardo N Santos¹, Margareth B C Gallo², Eduardo S Silva¹, Camila AV Figueiredo¹, Philip J Cooper³, Maurício L Barreto⁴, Sebastião Loureiro⁴, Lain C Pontes-de-Carvalho⁵, Neuza M Alcântara-Neves¹ #

¹ Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde; Universidade Federal da Bahia, Salvador – Bahia, Brasil;

² Plataforma de Espectrometria de Massas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador – Bahia, Brasil;

³ Departamento de Parasitologia Bioquímica Molecular, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK;

⁴ Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador – Bahia, Brasil;

⁵ Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador – Bahia, Brasil;

#Autor correspondente:

NMAN: Laboratório de Alergia e Acarologia

Instituto de Ciências da Saúde

Av. Reitor Miguel Calmon, s/n. sala 203.

40110-160 – Salvador – BA, Brasil

Tel.: +557132838948

neuzalcantara@gmail.com

RESUMO

Infeções por *Trichuris trichiura* e outros nematódeos trichurídeos tem sido reportadas por apresentar efeitos protetores contra atopia, doenças alérgicas e autoimunes. O objetivo do presente estudo foi investigar as propriedades imunomodulatórias do extrato do adulto de *T. trichiura* (TtE) e suas frações (TtEFs) sobre a produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico e identificar seus componentes proteicos. Quatorze TtEFs foram obtidas por cromatografia de troca iônica e testadas quanto aos seus efeitos sobre a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico. Os constituintes moleculares das seis frações mais ativas foram avaliados utilizando nano cromatografia líquida / espectrometria de massas. A homologia entre *T. trichiura* e o nematódeo relacionado *Trichinella spiralis* foi usada para identificar 10 proteínas em TtEFs. Entre aquelas identificadas, frutose bisfosfato aldolase, um homólogo do fator inibitório da migração de macrófagos e proteína de choque térmico 70 podem contribuir para os efeitos imunomodulatórios de TtEFs. A identificação de tais proteínas pode levar ao desenvolvimento de novos medicamentos para a terapia de alergia e de outras doenças inflamatórias.

Palavras-chave: Immunoregulação; Proteínas de choque térmico 70; Helmintos; Frutose bisfosfato aldolase; Homólogo do fator inibitório da migração de macrófagos.

NOTA DE PESQUISA

Existem dados epidemiológicos mostrando que a prevalência das doenças alérgicas e autoimunes tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas entre crianças que vivem em centros urbanos de países de renda baixa e média (Asher, 2011). A hipótese da higiene fornece uma explicação para tal tendência temporal na prevalência de doenças inflamatórias (Cooke, 2009; Rook, 2009). Algumas infecções por helmintos intestinais tem sido associadas com a proteção contra doenças inflamatórias (Rook, 2009), entre elas, infecções por tricurídeos foram reportadas em estudos epidemiológicos e clínicos como protetoras contra atopia, asma e doenças autoimunes (Summers *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2008; Moncayo *et al.*, 2010). Além disso, extratos de helmintos e suas moléculas que regulam vias específicas da resposta imune *in vitro* foram identificados (Harnett, McInnes e Harnett, 2004; Cardoso *et al.*, 2010).

No presente estudo, os efeitos imunomodulatórios de frações do extrato de adultos de *T. trichiura* sobre produção de citocinas por monócitos do sangue periférico humano (CMSPs) *in vitro* foram investigados e a técnica de espectrometria de massas foi usada para identificar o conteúdo proteico das frações ativas que poderia estar mediando estes efeitos. De nosso conhecimento, não há pesquisa semelhante sendo feita usando extratos isolados do helminto tricurídeo humano.

Vermes adultos de *T. trichiura* foram isolados de crianças equatorianas (Cooper *et al.*, 2006) tratadas com pamoato de pirantel e bisacodil. A aprovação ética para obtenção das amostras de fezes das crianças foi concedido pelo Comitê de Ética da Universidade San Francisco de Quito, Equador. O consentimento escrito informado foi concedido pelos pais ou responsáveis. Os vermes (5 g – peso úmido) foram lavados em tampão de salina fosfatada 0.15 M pH 7.4 e seu extrato foi preparado em um homogeneizador de tecido com auxílio de esferas de sílica / zircônio (BioSpec Products, Inc, Bartlesville, USA) e 20 mM de TRIS-HCl pH 8, contendo uma mistura de inibidores de protease (1 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil, 50µM de tosil fenilalanil clorometil cetona, 50 µM de tosil lisina clorometil cetona e 2 mM de etilenodiamina tetra acetato; SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA), com um rendimento de 200 mg de proteína. O extrato foi submetido a cromatografia de troca iônica usando um gradiente de

sal (NaCl) para eluição em uma coluna Mono Q 5/50 (GE Healthcare; São Paulo, SP, Brasil). As 14 frações coletadas (TtEF-1 a TtEF-14) foram dializadas contra meio RPMI 1640.

CMSPs, obtidos de oito adultos saudáveis com idade entre 21-40 anos, foram incubados em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 a 37°C em meio RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 1% de glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 20 $\mu\text{g/mL}$ de polimixina B (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, as células foram cultivadas na presença e na ausência de 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína de cada TtEF ou TtE. Esta foi a concentração ótima, definida a partir de um ensaio onde foi testada a faixa de 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas em CMSPs para estimular a produção de IL-10 (dados não mostrados). Aprovação ética para a coleta de sangue de doadores foi concedida pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, proposta 179/2008, projeto n° 277. Todos os indivíduos assinaram um consentimento escrito. Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (4 UE/mL; SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e Fitohemaglutinina (PHA, 5 $\mu\text{g/mL}$; SIGMA-Aldrich, St., Louis, MO, EUA) foram usados como controles positivos. Os efeitos inibitórios das TtEFs na produção de citocinas foram avaliados pelo co-cultivo de CMSPs com cada TtEF ou TtE na presença de LPS (4 UE/mL), para avaliar a IL-10 e $\text{TNF-}\alpha$; ou LPS (4 UI/mL) e $\text{IFN-}\gamma$ (100 ng/mL; BD Bioscience, San Diego, CA, EUA), para IL-12 p40; ou PHA (5 $\mu\text{g/mL}$), para IL-5 e IL-13. CMSPs cultivada com LPS ou PHA na ausência de TtEF ou TtE foram usadas como controles.

Sobrenadantes foram coletadas após 24h de cultura para avaliar a produção de IL-10, IL-12 p40 e $\text{TNF-}\alpha$ e após 120h para avaliar a produção de IL-5 e IL-13. Citocinas foram quantificadas por kit de ELISA de captura, conforme as instruções do fabricante (Pharmingen, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). A produção de citocinas por CMSPs estimuladas ou inibidas por TtE ou TtEFs foi comparada com aquela de culturas controle usando análises pareadas, com Wilcoxon signed rank test. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Para análise por espectrometria de massas, alíquotas das seis TtEFs mais ativas correspondendo a 150 μg de proteína de cada foram dessecadas e reconstituídas em 100

μL de NH_4HCO_3 (50 mM, pH 9,7) em duplicata, reduzidas pela incubação com 5 μL de 200 mM de ditioneitol em 100 mM NH_4HCO_3 a 95°C por 5 minutos e alquiladas com 4 μL de 500 mM de iodoacetamida em 100 mM de NH_4HCO_3 por 45 minutos a temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida com 5 μL de 200 mM de ditioneitol em 100 mM NH_4HCO_3 . A digestão foi feita com tripsina em grau de pureza para sequenciamento (Promega Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil) a 1/50 (p/p) tripsina/proteína, a 37°C por oito horas. Peptídeos tripticos foram dessalinizados com cartuchos de Macro Trap™, seguindo as instruções do fabricante (Michrom BioResources, Auburn, CA, EUA).

Separação de peptídeos foi realizada por cromatografia líquida (nanoACQUITY UPLC™, Waters Corporation, Barueri, São Paulo, Brasil) em duplicata. Os peptídeos derivados da digestão por tripsina (3 μL) foram carregados a um fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ para uma coluna Symmetry C₁₈ trap (Waters Corporation, Barueri, São Paulo, Brasil) por 2 minutos, usando 0,1% de ácido fórmico (AF) / 3% de acetonitrila (ACN) em água como eluente. Peptídeos foram eluídos da coluna Trap com gradiente crescente usando solvente B (0,1% AF em ACN) e separados em uma coluna C18 BEH 130 (Waters Corporation, Barueri, São Paulo, Brasil) a um fluxo de 0,6 $\mu\text{L}/\text{minuto}$.

Detecção de massa dos peptídeos foi executada em um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-tempo-de-vôo (Q-TOF *micro*, Micromass, Alliedscienpro, Quebec, Canadá) equipado com uma fonte de nanoeletrospray Z. A aquisição por análise direta dos dados no modo de pesquisa foram processadas por MassLynx (v 4.1, Waters Corporation, Barueri, São Paulo, Brasil) e buscou contra os dados da ordem Trichocephalida no banco de dados SwissProt-UniProt, baixado em agosto de 2011. A busca de dados foi realizada por Protein Lynx Global Server v 2.5 (PLGS). PLGS minimiza resultados falso-positivos decorrentes da existência de proteínas homólogas no banco de dados pesquisados pela combinação de vários filtros e fatores de *scoring*. Parâmetros de busca foram definidos para a tolerância de peptídeo de 100 ppm, tolerância de fragmento de massa de 0,1 Da e erro de calibração estimado de 0.005 Da. O campo para enzima foi definido como tripsina e do número máximo de clivagens ausentes para 1. Alquilação por iodoacetamida de cisteína (carbamidometil C) e oxidação de metionina foram definidos como modificações fixas e variáveis, respectivamente. Resultados de busca foram validados automaticamente quando, pelo

menos, três fragmento de íons medidos consecutivamente de um peptídeo corresponderam a fragmento de íons b ou y teóricos de uma sequência de proteína conhecida. Todo o conjunto de dados de proteínas identificadas foram adicionalmente selecionados pela consideração apenas das proteínas replicadas em ambas as duplicatas técnicas do instrumento com uma probabilidade de identificação superior a 95% e o *score* PLGS superior a 9 (uma medida estatística calculada pelo instrumento de busca PLGS usando o algoritmo de Monte Carlo que indica a acurácia da identificação. Ele depende de vários fatores e entre eles está o número de entradas no banco de dados, a área do pico, o número de peptídeos pareados / não pareados, dados de fragmentação, etc.). O maior valor de *score* PLGS obtido neste experimento foi 9.696.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que o sangue total de crianças infectadas por *T. trichiura* produz IL-10 quando estimulado com antígeno do parasita (Figueiredo *et al.*, 2010), que infecções por *T. trichiura* estão inversamente associadas com reatividade ao teste de puntura cutânea (SPT) para alérgenos comuns (Moncayo *et al.*, 2010), e que infecções no início da vida estão associadas a uma reduzida prevalência de reatividade ao SPT mais tarde na infância (Rodrigues *et al.*, 2008). Estas observações são complementadas no presente estudo, no qual é mostrado que algumas frações do extrato somático de *T. trichiura* (TtEF-6 e TtEF-8 a TtEF-14) são capazes de estimular a produção de IL-10 (Tabela 1 e Figura S1) e induzir a produção de TNF- α e IL-12 p40 por CMSPs de doadores não infectados previamente em ensaios estimulatórios (Tabela 1), apesar de inibi-los em ensaio inibitório (Tabela 1; Figura S2 e Figura S3). Esses achados e o perfil cromatográfico de TtE (Figura 1) indicam que as frações avaliadas do extrato podem conter diferentes moléculas capazes de induzir efeitos inflamatórios diversos, o que está de acordo com as manifestações inflamatórias de infecção por helmintos conhecidas e que são observadas, particularmente, durante infecções precoces (Schönemeyer *et al.*, 2001; Alcântara-Neves *et al.*, 2010; Smits *et al.*, 2010). Nenhuma das frações estimulou a produção das citocinas Th2, IL-5 e IL-13 (dados não mostrados), mas as frações TtEF-8 a TtEF-10 inibiram significativamente a produção de IL-5 por CMSPs estimuladas com PHA (Tabela 1 e Figura S4). A supressão de IL-5 tem sido descrita como uma característica da resposta Th2 modificada, o que levaria a reduzida participação de eosinófilos (Samitas, Rådinger e Bossios, 2011). A resposta Th2 modificada parece ser um mecanismo para potencialmente diminuir o dano associado a inflamação Th2 (Maizels e Yazdanbakhsh, 2003) e, indiretamente, diminuiria a resposta

alérgica. TtEF-9 e TtEF-10 inibiram a produção de IL-13 induzida por PHA (Tabela 1 e Figura S5). Esta citocina está envolvida na indução de inflamação pulmonar e, especialmente, na produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas (Hoshino *et al.*, 2007; Walsh, 2010). TtEF-9 apresentou as propriedades regulatórias mais potentes entre as frações testadas e também esteve associada com a inibição de TNF- α e IL-12p40 induzidas por LPS (Tabela 1). Isto demonstra a vantagem de usar frações de TtE, haja vista que esta abordagem pode separar componentes do parasita com atividade regulatória fraca ou inexistente, tais como TtEF-13 que não inibiu a produção de nenhuma citocina, de componentes com efeito intermediário e componentes com alto potencial imunoregulatório. No extrato total, as moléculas com atividade imunoregulatória podem ser mascaradas por outros componentes inativos.

Devido à existência muito limitada de dados disponíveis sobre o genoma de *T. trichiura*, a identificação da maioria das proteínas nas frações ativas de TtEF foi alcançada pela comparação da homologia com *Trichinella spirallis*, um nematódeo da ordem Trichocephalida, que mostra reatividade antigênica cruzada marcante com *T. trichiura* (Roach *et al.*, 1988) e também demonstrou atividade regulatória contra doenças autoimunes em modelos experimentais (Saunders *et al.*, 2007; Gruden-Movsesijan *et al.*, 2010). Aproximadamente 1300 proteínas (probabilidade > 95%) foram identificadas a partir das seis frações mais ativas (TtEF-6, TtEF-8 a TtEF-12), mas apenas 39 proteínas foram identificadas duplamente em amostras e validadas de acordo com os parâmetros do equipamento especificados na metodologia (Tabela S1). Algumas proteínas foram encontradas em mais de uma das frações ativas. O homólogo de fator inibitório de migração de macrófagos (MIFH) foi a única proteína identificada diretamente de *T. trichiura* e esteve presente em TtEF-6, TtEF-8 e TtEF-9 (Tabela S1). MIFH é produzido por diversos parasitas e parece ter um papel importante no mecanismo de evasão dentro do hospedeiro, mimetizando o MIF humano (Maizels e Yazdanbakhsh, 2003). MIFH de parasitas intestinais tem vários efeitos imunomodulatórios reconhecidos na inflamação alérgica das vias aéreas e intestinal (Park *et al.*, 2009; Cho, Lee e Yu, 2011) e atua através do recrutamento de monócitos e células T regulatórias (Younis, Soblik, *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), diminuindo a produção de citocinas Th2 por CMSPs de pacientes com asma atópica, ao passo que aumenta a produção de IL-10 e TGF- β (Park *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2012). Frutose bisfosfato aldolase (FBPA) que esteve presente em todas as frações, exceto na TtEF-10, e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, presente em TtEF-6,

TtEF-8 e TtEF-10 (Tabela S1), são proteínas essenciais envolvidas no ciclo de vida do parasita, bem como no estabelecimento de infecção e também podem desempenhar um papel modulador da resposta imune (Asahi *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2008). Da mesma forma, a proteína de choque térmico 70 (HSP 70), presente em TtEF-8 e TtEF-10, pode ter propriedades imunoregulatórias similares às aquelas descritas para a proteína de *Schistosoma japonicum* (Hauet-Broere *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009).

Os dados mostrados no presente trabalho apresentam evidências de que frações protéicas de *T. trichiura* têm efeitos imunomodulatórios em CMSPs de indivíduos não infectados e fornecem alguns indícios importantes sobre as proteínas que podem ser relevantes na mediação destes efeitos. Estas proteínas poderiam ser consideradas para avaliação adicional como novas ferramentas terapêuticas para o tratamento ou prevenção de doenças alérgicas e autoimunes. Além disso, estes dados corroboram os efeitos imunoregulatórios que tem sido associados à infecção por *T. trichiura*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Plataforma de Espectrometria de Massas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz por permitirem a análise proteômica. Este estudo foi parcialmente financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (Programa INCT/MCT/CNPq; Contrato n ° 5737862008 e MCT-CNPq-Edital n ° 015/2008) e SCAALA (Social Change of Asthma and Allergy in Latin America - Programme, financiado por WELLCOME TRUST, Grant No. 072405/Z/03/Z). WELLCOME TRUST, CNPq, CAPES e FAPESB forneceram bolsas de estudo para alguns dos autores.

REFERÊNCIAS

Alcântara-Neves, N. M. *et al.* The presence of serum anti-*Ascaris lumbricoides* IgE antibodies and of *Trichuris trichiura* infection are risk factors for wheezing and/or atopy in preschool-aged Brazilian children. **Respir Res**, v. 11, p. 114, 2010. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731833> >.

Asahi, H. *et al.* *Schistosoma mansoni* phosphoenolpyruvate carboxykinase, a novel egg antigen: immunological properties of the recombinant protein and identification of a T-

cell epitope. **Infect Immun**, v. 68, n. 6, p. 3385-93, Jun 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816489> >.

Asher, M. I. Urbanisation, asthma and allergies. **Thorax**, v. 66, n. 12, p. 1025-6, Dec 2011. ISSN 1468-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948729> >.

Cardoso, L. et al. Schistosoma mansoni antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **Clin Exp Immunol**, Feb 2010. ISSN 1365-2249. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20132231 >.

Cho, M. K.; Lee, C. H.; Yu, H. S. Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through toll-like receptor 2. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 5, p. 265-75, May 2011. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204854> >.

Cooke, A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 12-7, Jan 2009. ISSN 1365-2567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19120494 >.

Cooper, P. J. et al. Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). **BMC Pulm Med**, v. 6, p. 24, 2006. ISSN 1471-2466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16970809> >.

Figueiredo, C. A. et al. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. **Infect Immun**, v. 78, n. 7, p. 3160-7, Jul 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404082> >.

Gruden-Movsesijan, A. et al. Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic Trichinella spiralis infection in Dark Agouti rats. **Parasite Immunol**, v. 32, n. 6, p. 450-9, Jun 2010. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500676> >.

Harnett, W.; McInnes, I.; Harnett, M. ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. **Immunol Lett**, v. 94, n. 1-2, p. 27-33, Jun 2004. ISSN 0165-2478. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15234531 >.

Hauet-Broere, F. et al. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. **Ann Rheum Dis**, v. 65 Suppl 3, p. iii65-8, Nov 2006. ISSN 0003-4967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038477> >.

Hoshino, T. et al. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 1, p. 49-62, Jul 2007. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400729> >.

Maizels, R. M.; Yazdanbakhsh, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 733-44, Sep 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949497> >.

Marques, H. H. et al. Protective effect and granuloma down-modulation promoted by RP44 antigen a fructose 1,6 bisphosphate aldolase of *Schistosoma mansoni*. **Immunobiology**, v. 213, n. 5, p. 437-46, 2008. ISSN 0171-2985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472052> >.

Moncayo, A. L. et al. Risk factors for atopic and non-atopic asthma in a rural area of Ecuador. **Thorax**, v. 65, n. 5, p. 409-16, May 2010. ISSN 1468-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20435862> >.

Park, H. K. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Isolated from a Parasite Inhibited Th2 Cytokine Production in CMSPs of Atopic Asthma Patients. **J Asthma**, v. 49, n. 1, p. 10-5, Feb 2012. ISSN 1532-4303. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149098> >.

Park, S. K. et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of anisakis simplex suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. **J Immunol**, v. 182, n. 11, p. 6907-14, Jun 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454687> >.

Roach, T. I. et al. Antigenic cross-reactivity between the human whipworm, *Trichuris trichiura*, and the mouse trichuroids *Trichuris muris* and *Trichinella spiralis*. **Parasite Immunol**, v. 10, n. 3, p. 279-91, May 1988. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3412784> >.

Rodrigues, L. et al. Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 11, p. 1769-77, Nov 2008. ISSN 1365-2222. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18547322 >.

Rook, G. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 3-11, Jan 2009. ISSN 1365-2567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19120493 >.

Samitas, K.; Rådinger, M.; Bossios, A. Current update on eosinophilic lung diseases and anti-IL-5 treatment. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 6, n. 3, p. 189-205, Sep 2011. ISSN 1574-891X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824072> >.

- Saunders, K. et al. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. **Infect Immun**, v. 75, n. 1, p. 397-407, Jan 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17043101 >.
- Schönemeyer, A. et al. Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. **J Immunol**, v. 167, n. 6, p. 3207-15, Sep 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544307> >.
- Smits, H. H. et al. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 10, n. 1, p. 3-12, Jan 2010. ISSN 1534-6315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425508> >.
- Summers, R. et al. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 9, p. 2034-41, Sep 2003. ISSN 0002-9270. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14499784 >.
- Walsh, G. M. Tralokinumab, an anti-IL-13 mAb for the potential treatment of asthma and COPD. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 11, n. 11, p. 1305-12, Nov 2010. ISSN 2040-3429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157650> >.
- Wang, X. et al. CD4+CD25+ Treg induction by an HSP60-derived peptide SJMHE1 from *Schistosoma japonicum* is TLR2 dependent. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 11, p. 3052-65, Nov 2009. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19882655> >.
- Younis, A. E. et al. Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Strongyloides* acting at the parasite-host cell interface. **Microbes Infect**, Oct 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037391> >.
- Zhang, Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor homolog from *Plasmodium yoelii* modulates monocyte recruitment and activation in spleen during infection. **Parasitol Res**, Oct 2011. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015474> >.

Tabela 1. Resumo da produção de citocinas por CMSPs estimuladas com extrato somático de *Trichuris trichiura* (TtE) e suas frações (TtEFs), e as respectivas

proteínas identificadas por espectrometria de massas através de comparação por homologia com os parasitas da ordem Trichocephalida

Amostra analisada	^a Efeitos estimulatórios sobre a produção de citocinas			^b Efeitos inibitórios sobre a produção de citocinas					^c Conteúdo de proteínas com potencial efeito imunoregulatório
	IL-10	TNF- α	IL-12	IL-10	TNF- α	IL-12	IL-5	IL-13	
			p40			p40			
TtE	203.1 (37,8)	333 (110,2)	99.06 (39,5)	62,9 (80,4)	149.9 (59,5)	227.2 (68,7)	85,5 (45,1)	96,93 (251,4)	-----
TtEF-6	704.7 (102,9)	404.4 (119,9)	122.1 (36)	89,08 (63,1)	450.2 (111,6)	243 (122,4)	54,77 (48,3)	332,1 (297,9)	FBPA; MIFH; FEPCQ
TtEF-8	461.3 (102,5)	290.6 (94,5)	94,77 (49,8)	101,4 (65,2)	543,5 (204,8)	317,9 (151,5)	125.9 (63,8)	360,9 (202,3)	FBPA; MIFH; HSP70; FEPCQ
TtEF-9	340.2 (73)	310.9 (132,7)	78,13 (35,5)	78,31 (89,3)	590 (149,5)	462.6 (183,2)	140.3 (59,6)	711 (253,3)	FBPA; MIFH
TtEF-10	486.7 (139,3)	402.2 (167,7)	84,66 (49,3)	72,73 (48)	803 (149,3)	369,2 (160,9)	77.68 (25)	485.2 (194,6)	HSP70; FEPCQ
TtEF-11	595.2 (140,9)	448.8 (159,2)	53.87 (16,4)	36,47 (60,3)	643,8 (119,3)	374,1 (130,9)	112 (59,1)	18,56 (174)	FBPA
TtEF-12	641.5 (99,8)	618.2 (157,5)	178.6 (79,9)	102,9 (89,2)	490.1 (145,8)	245,4 (112,9)	122,3 (65,4)	44,36 (242,9)	FBPA
TtEF-13	309.1 (120,2)	258.6 (81,5)	143,9 (79,1)	164,4 (90,7)	108,3 (45,7)	33,09 (37)	60,9 (73)	329 (297,1)	-----
TtEF-14	213 (45,4)	244.9 (82,1)	70.13 (25,4)	91,71 (34,5)	262.5 (38,2)	142,4 (61,5)	57.97 (20,5)	323,4 (220,6)	-----

^a **Efeitos estimulatórios na produção de citocinas.** Células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) foram cultivadas na presença de 50 μ g/mL de TtE ou TtEF; os resultados foram expressos como o aumento da concentração de citocinas em pg/mL e erro padrão da média em relação às células estimuladas e não-estimuladas.

^b **Efeitos inibitórios sobre a produção de citocinas.** CMSPs foram estimuladas com uma dose sub-ótima de LPS (4 UE/mL), para avaliar a inibição da IL - 10 e TNF- α ; ou LPS (4UE/mL) e IFN- γ (100ng/mL), para IL-12 p40; ou PHA (5 μ g/mL), para IL-5 e IL-13 e co-cultura com TtE ou TtEFs. Os resultados foram expressos como a diminuição da concentração de citocinas em pg/mL e erro padrão da média em relação às células estimuladas na ausência ou presença de TtE e TtEFs. Números em negrito são estatisticamente significativos com valor de $p < 0,05$ (por Wilcoxon signed rank test). ^c FBPA: frutose bisfosfato aldolase; MIFH: homólogo de fator inibitório da migração de macrófagos; HSP 70: proteínas de choque térmico 70; FEPCQ: fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

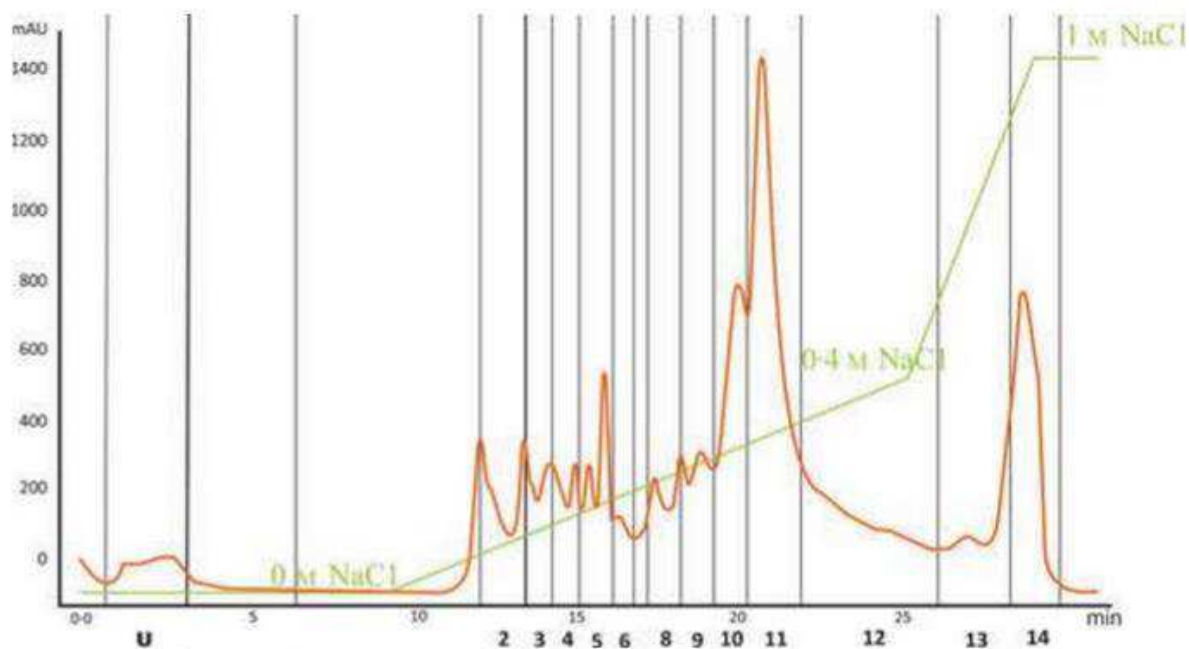


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato somático de *T. trichiura* obtido através de fracionamento por troca iônica. Linha verde representa o gradiente de eluição com sal (0 a 1 M de NaCl). Absorbância foi monitorada a 280 nm na unidade de miliabsorvância (mAU). U e respectivos números correspondem às frações coletadas TtEF-2 a TtEF-14, que são delimitadas por linhas retas verticais.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Proteínas identificadas e validadas por espectrometria de massas nas frações mais ativas do extrato somático de *Trichuris trichiura* (TtEF-6 e TtEF-8 a TtEF-12) obtidas por cromatografia de troca iônica

Proteína	Número de acesso	Presença em TtEF	mW ^a (Da)	pI (pH)	PLGS ^b	Prob ^c (%)	PEP ^d	Cobertura ^e (%)	Erro Médio	Erro RMS ^f
Proteína 1433	C9DTY3 TRISP ^g	-12	28180	4.63	9.696	100	3	10	29.63	45.41
Fragmento de actina	Q8T6A7 TRISP	-9	17796	4.65	9.662	96.79	2	25	4.71	5.39
Actina 5C	E5SLU1 TRISP	-9	41810	5.15	9.695	99.91	2	10.64	7.79	7.81
Actina despolimerizante fator 2 isoforma c	E5SH19 TRISP	-6	40201	6.39	9.696	100	1	4.01	1.06	1.06
Fragmento de subunidade β de ATP sintase	E5T350 TRISP	-11	13620	5.73	9.693	99.7	2	17,32	12,29	14.08
Subunidade β de ATP sintase	E5SC35 TRISP	-9; -10; -11	58179	4.93	9.696	100	1	2.39	1.84	1.84
Subunidade α de hexosaminidase	E5SET7 TRISP	-8	61596	5,81	9.696	100	1	1,49	6.78	6.78
Calponin-like	C4PEE3 TRISP	-10; -11	16782	8,72	9.696	100	1	9.21	6.13	6.13
Catepsina B	E5S399 TRISP	-6; -8; -9	40202	7.58	9.696	100	1	2.25	9,79	9,79
Subunidade do fator 2 de especificidade para clivagem e poliadenilação	E5SK23 TRISP	-6	131596	5.52	9.696	100	1	0,67	7,96	7,96
Complexina	E5SE07 TRISP	-11	19239	5.76	9.696	100	1	12.21	66.55	66.55
Fator 1 α de alongamento	E5S5Z6 TRISP	-6	57826	9.25	9.696	100	1	2.09	99.25	99.25
Frutose bisfosfato aldolase	E5SNV8 TRISP	-6; -8; -9; -11; -12	41080	6,67	9.696	100	2	6,61	5.31	5.86
Glutamato desidrogenase	E5S4S8 TRISP	-6	58487	7.59	9.696	100	1	2.27	29.66	29.66
Proteína de choque térmico 70	A6YT30 9BILA ^h	-8; -10	71015	5.32	9.689	99.43	5	10.32	11.65	14,27
Fragmento proteína ifa 1 do filamento intermediário	E5T9Q5 TRISP	-10	11243	4.64	9.688	99.25	2	29,79	21,58	27,12
Malato desidrogenase	E5SJF6 TRISP	-9	36113	8,00	9.696	100	1	5,71	58.49	58.49
Enzima málica	E5SDX8 TRISP	-6; -8; -9	69491	6.50	9.696	100	1	1.78	9.65	9.65
Enzima málica	E5S251 TRISP	-8	70788	6.49	9.696	100	1	1.42	13,18	13,18
Membrana associada a proteína de transferência de fosfatidilinositol 2	E5S942 TRISP	-6	135049	6.26	9.696	100	1	0.75	48.17	48.17
Homólogo de fator inibitório de migração	MIFH TRITR ⁱ	-6; -8; -9	12035	9,57	9.696	100	1	21.93	75.49	75.49
Nitrato redutase periplasmática	E5SSG1 TRISP	-8	15273	7,87	9.696	100	1	9,49	57.96	57.96
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	E5SLA7 TRISP	-6; -8	71102	6,51	9.696	100	2	2,52	6,07	6,33
Fosforilase	E5SHF9 TRISP	-6; -8; -9	107763	6,48	9.696	100	3	3,80	14.11	18.87
Subunit β de Propionyl CoA carboxilase	E5SIB0 TRISP	-10; -11	59243	7.69	9.696	100	1	2,97	10.74	10.74

Proteína quinase C - Isozima cerebral	E5RZI8 TRISP	-9	54034	4.99	9.696	100	1	2.36	64,95	64,95
Receptor 3 hepta-helicoidal caderina EGF LAG	E5S2B0 TRISP	-8	118974	4.51	9.696	100	1	1,03	29.51	29.51
Proteína de domínio de núcleo integrase	E5SGA7 TRISP	-6	124814	10.67	9.696	100	1	0,82	49.03	49.03
Proteína de domínio LIM e SH3	E5SDN9 TRISP	-6	33623	9.67	9.696	100	1	3,55	0.55	0.55
PUP ^j	E5S3G4 TRISP	-6; -8; -9; -10; -11	27552	9.96	9.696	100	1	5.58	27.24	27.24
PUP	E5S7N5 TRISP	-8	14814	9.98	9.696	100	1	7.75	51.59	51.59
PUP	E5SLI9 TRISP	-6; -8; -9	27183	9,24	9.696	100	1	3,02	30.94	30.94
PUP	E5SU40 TRISP	-8	10809	8.66	9.696	100	1	16.16	81.77	81.77
PUP	E5S5R3 TRISP	-9	47528	9.27	9.696	100	1	1,69	18.07	18.07
PUP	E5SZF6 TRISP	-8; -9	13591	4.43	9.696	100	1	7,76	59.19	59.19
PUP	E5T2Z1 TRISP	-9; -10; -11	20204	9.59	9.695	99,99	1	14.04	26.47	26.47
PUP	E5T9E8 TRISP	-6	15532	5,03	9.656	96.19	1	7,46	55.56	55.56
Proteínas ribossomais L11	E5SFL8 TRISP	-6; -9	53459	9.67	9.696	100	1	2.54	4,55	4,55
tRNA citosina 5 metiltransferase	E5S9L5 TRISP	-8	77555	8.40	9.696	100	1	1.32	11.57	11.57

^amW = molecular weight; ^bPLGS score = a statistical measurement calculated by PLGS using Monte Carlo algorithm that indicates the identification accuracy; ^cProb = probability of the protein identification; ^dPep = number of identified peptides in the protein sequence; ^eCoverage = shows the identified peptide (s) percentage in relation to the total protein sequence; ^fRMS error = indicates the identification precision; ^gTRISP = *Trichinella spiralis*; ^hBILA = *Trichinella native*; ⁱTRITR = *Trichuris trichiura*; ^jPUP = putative uncharacterized protein

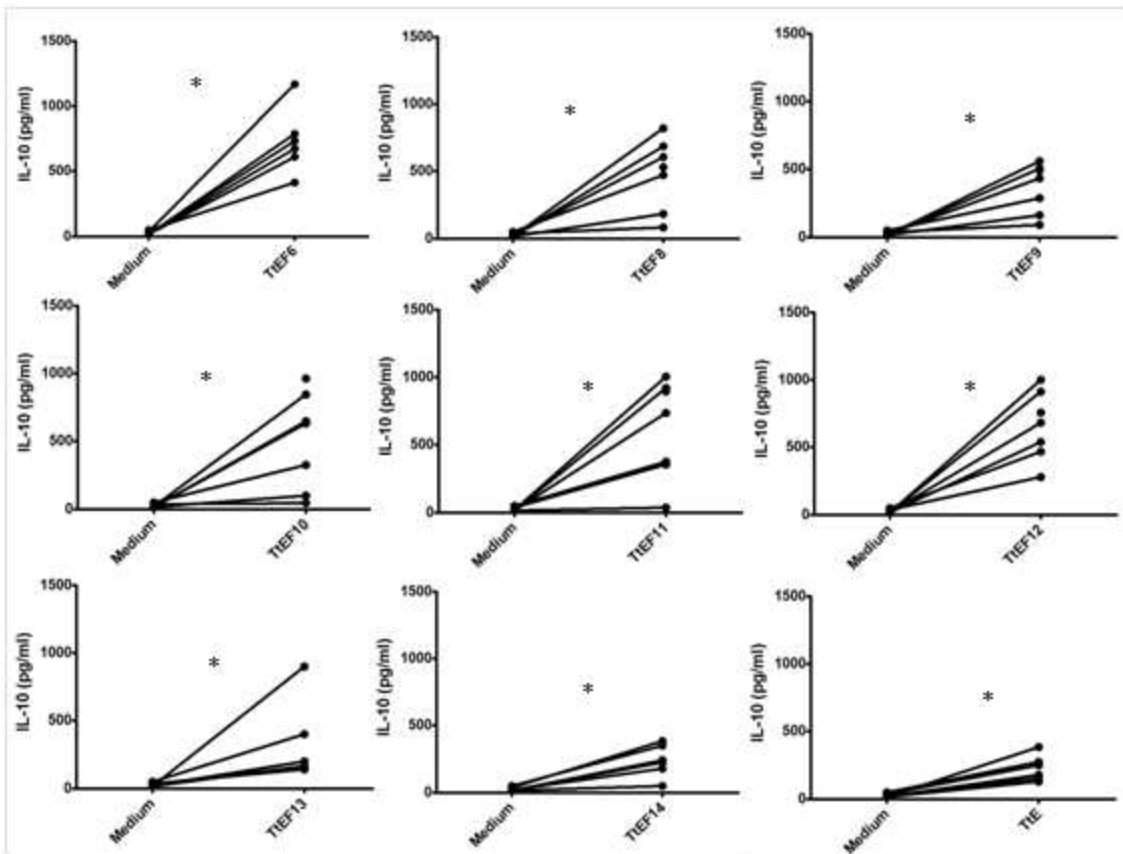


Figura S1. **Indução da produção de IL-10 pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis.** O nível de IL-10 em sobrenadantes de cultura foi analisado por ELISA. CMSPs foram cultivada por 24 horas na ausência (meio) ou na presença de fração (TtEF) indicado no eixo X. As linhas representam cada indivíduo. *: $p < 0,05$ (em relação as diferenças entre os dois grupos de CMSPs).

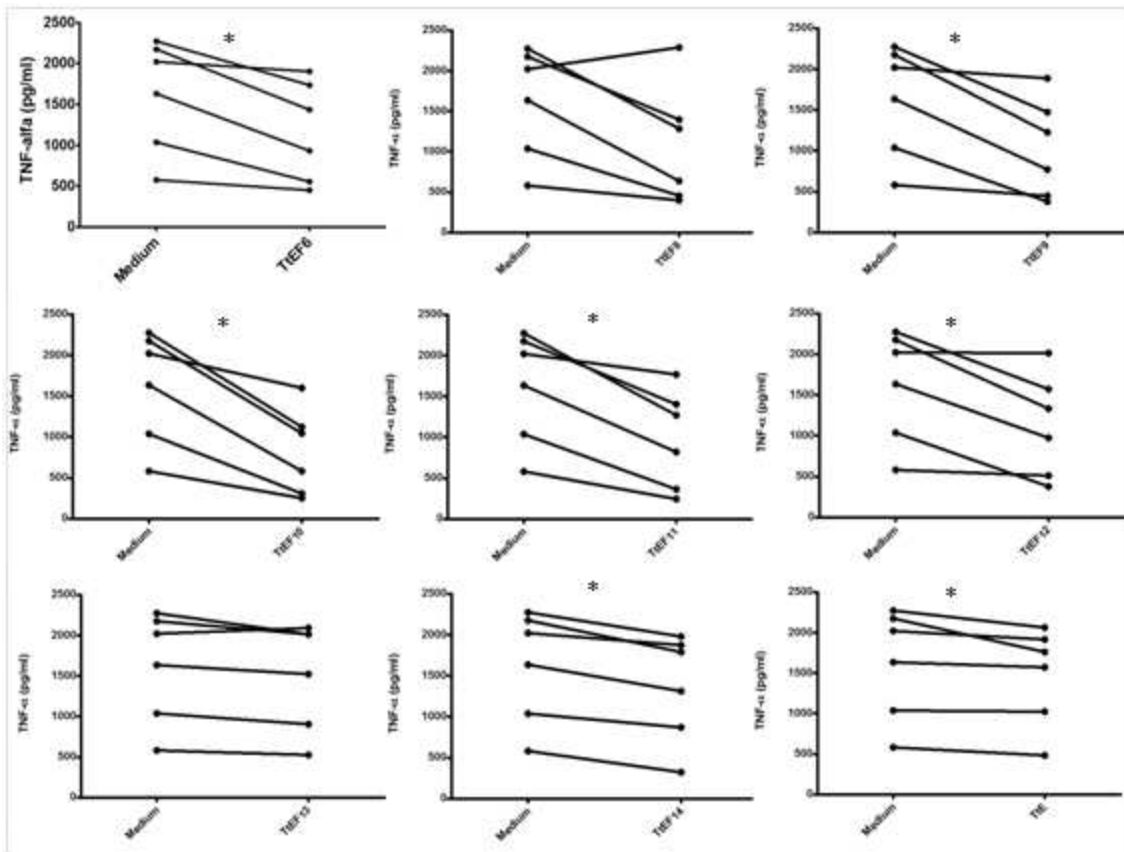


Figura S2. **Inibição da produção de TNF- α pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis.** Todas CMSPs foram estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano. Os níveis de TNF- α no sobrenadantes da cultura foram analisados por ELISA. As CMSPs foram cultivadas por 24 horas na ausência (meio) ou na presença de fração (TtEF) indicado no eixo X. As linhas representam cada indivíduo. *: $p < 0,05$ (em relação as diferenças entre os dois grupos de CMSPs).

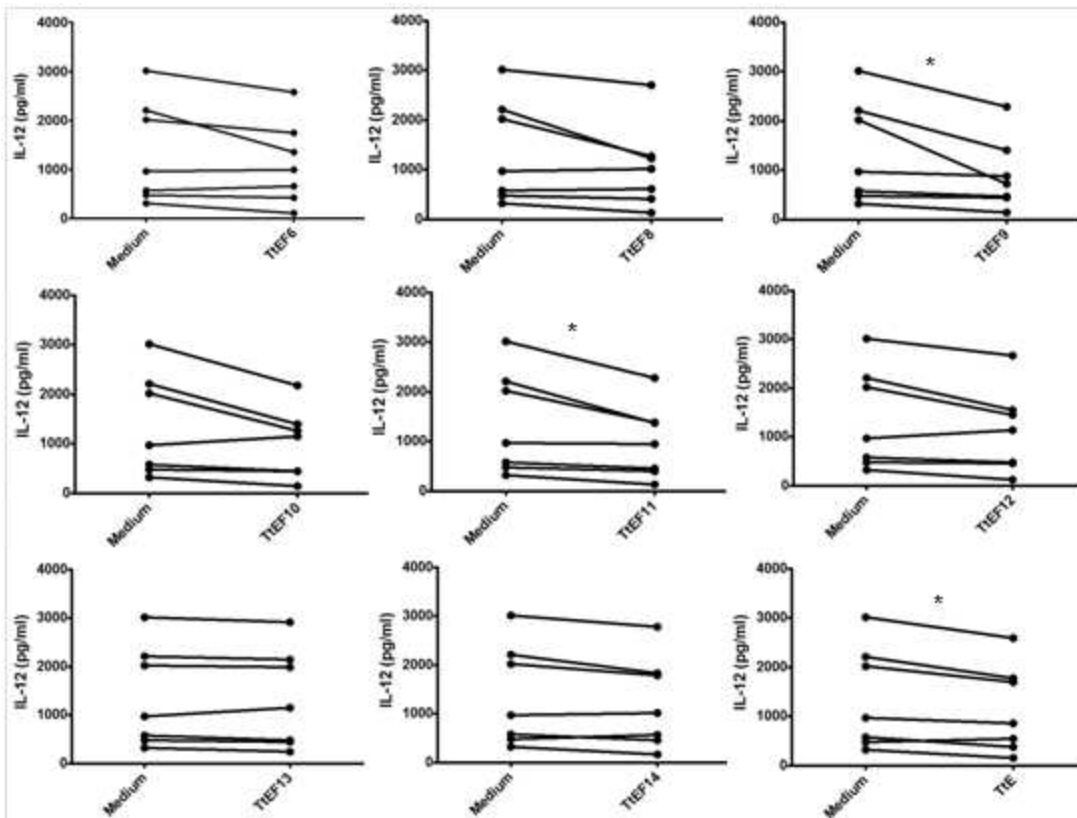


Figura S3. Inibição da produção de IL-12 p40 pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis. Todas CMSPs foram estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano. O nível de IL-12 p40 em sobrenadantes de cultura foram analisados por ELISA. CMSPs foram cultivadas por 24 horas na ausência (meio) ou na presença de fração (TtEF) indicado no eixo X. As linhas representam cada indivíduo. *p: < 0,05 (em relação as diferenças entre os dois grupos de CMSPs).

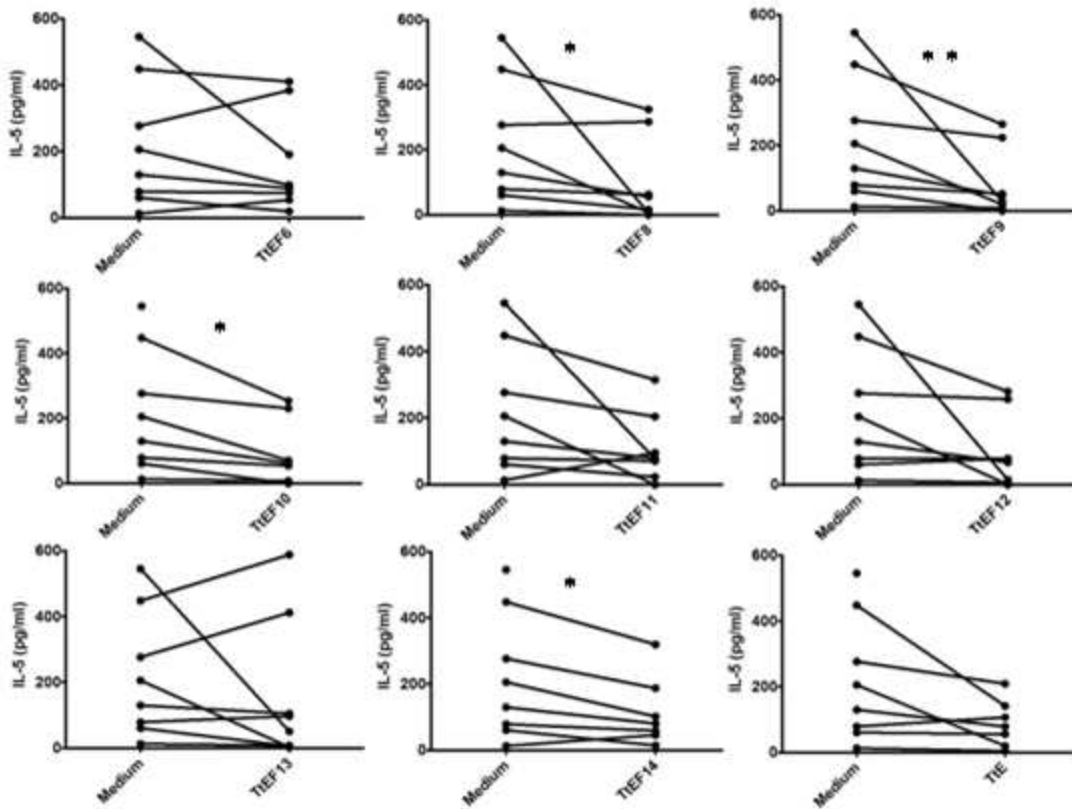


Figura S4. Inibição da produção de IL-5 pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis. Todas CMSPs foram estimuladas com fitohemaglutinina. O nível de IL-5 em sobrenadantes de cultura foi analisado por ELISA. CMSPs foram cultivadas por 5 dias na ausência (meio) ou na presença de fração (TtEF) indicado no eixo X. As linhas representam cada indivíduo. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ (em relação as diferenças entre os dois grupos de CMSPs).

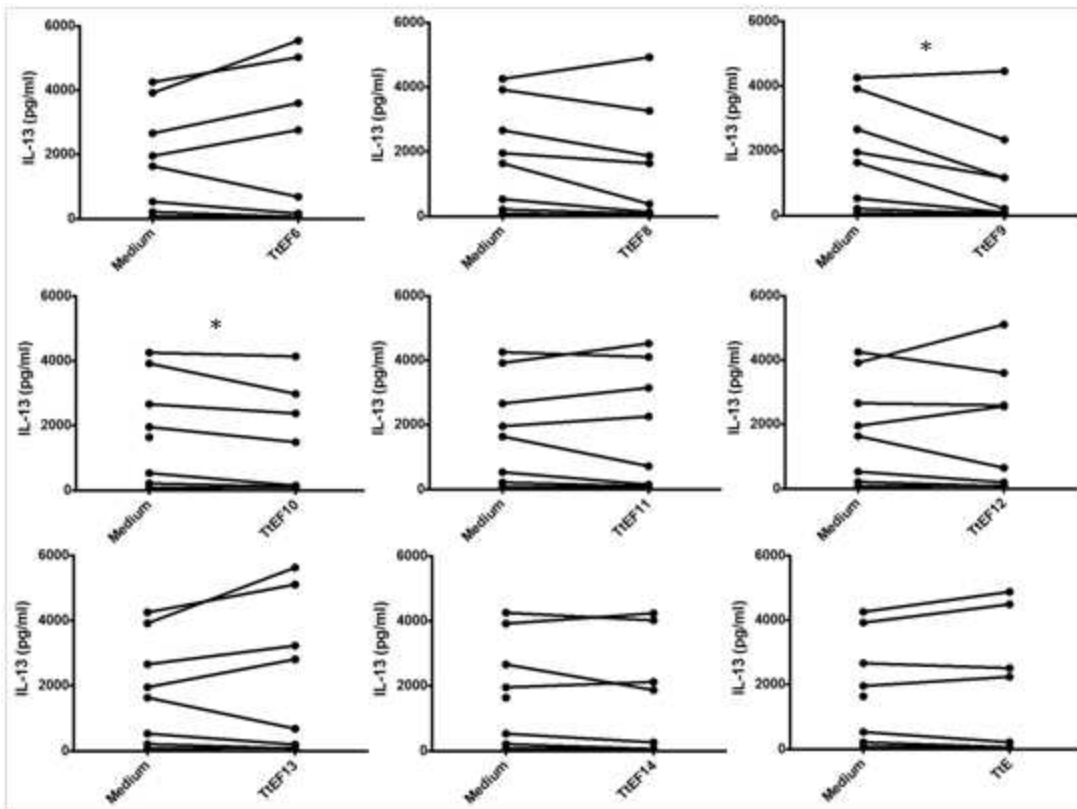


Figura S5. Inibição da produção de IL-13 pelo extrato somático de *T. trichiura* (TtE) ou suas frações em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis. Todas CMSPs foram estimuladas com fitohemaglutinina. O nível de IL-13 em sobrenadantes de cultura foi analisado por ELISA. CMSPs foram cultivadas por 5 dias na ausência (meio) ou na presença de fração (TtE) indicado no eixo X. As linhas representam cada indivíduo. *: $p < 0,05$ (em relação as diferenças entre os dois grupos de CMSPs).

Manuscrito 2. Montagem e Caracterização *de novo* do Transcriptoma do Verme Adulto de *Trichuris trichiura* usando Sequenciamento por *Ion Torrent*

Autores: Leonardo N. Santos, Eduardo S. Silva, André S. Santos, Pablo H. de Sá, Rommel T. Ramos, Artur Silva, Philip J. Cooper, Maurício L. Barreto, Sebastião Loureiro, Carina S. Pinheiro, Neuza M. Alcantara-Neves, Luis G. C. Pacheco.

Periódico submetido: Acta Tropica

Fator de impacto: 2,270

Comprovante de submissão do Manuscrito 2: *De novo* Assembly and Characterization of the *Trichuris trichiura* Adult Worm Transcriptome using Ion Torrent Sequencing (Anexo B).

Montagem e Caracterização *de novo* do Transcriptoma do Verme Adulto de *Trichuris trichiura* usando Sequenciamento por *Ion Torrent*

Leonardo N. Santos^a, Eduardo S. Silva^a, André S. Santos^a, Pablo H. de Sá^b, Rommel T. Ramos^b, Artur Silva^b, Philip J. Cooper^{c, d}, Maurício L. Barreto^{e, f}, Sebastião Loureiro^e, Carina S. Pinheiro^a, Neuza M. Alcantara-Neves^{a, *}, Luis G. C. Pacheco^{a, *}

^a *Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, Brasil.*

^b *Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Belém - PA, Brasil.*

^c *Institute of Infection and Immunity, Universidade de St George de Londres, Londres, Reino Unido.*

^d *Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas e Crônicas, Pontificia Universidade Católica do Equador, Quito, Equador.*

^e *Instituto de Saúde Pública da Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, Brasil;*

^f *Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, FIOCRUZ-BA, Salvador - BA, Brasil.*

* Autores para correspondência: Tel. / Fax: +55 71 3283-8932. Endereços de e-mail: neuza@ufba.br (N. Alcântara-Neves); luis.pacheco@ufba.br (L. Pacheco).

Abreviaturas: BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*; ADNc, ADN complementar; CLAED, cromatografia líquida de alta performance desnaturante; GO, *Gene Ontology*; KEGG, *Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomas*; NCBI, *National Center for Biotechnology Information*; NR, não-redundante; ARNr, ARN ribossômico;

RESUMO

A infecção por nematódeos, incluindo o helminto transmitido pelo solo *Trichuris trichiura*, tem levado a modulação da resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, tem um impacto sobre o desenvolvimento e manifestação de doenças inflamatórias crônicas humanas. A derivação *de novo* de proteomas de helmintos, a partir do sequenciamento de transcriptomas, poderá fornecer dados valiosos para ajudar na identificação de proteínas do parasito que poderão ser avaliadas como potenciais moléculas imunoterapêuticas. Aqui, nós caracterizamos o transcriptoma da fase adulta do tricurídeo humano usando tecnologia de sequenciamento de nova geração e uma estratégia de montagem *de novo*. Cerca de 17,6 milhões de *reads* de alta qualidade foram montados em 6.414 *contigs*, com um N50 de 1.606 pb. A maioria dos transcritos montados de *T. trichiura* representaram sequências que codificam proteínas com ortólogos compartilhados pelo parasita relacionado *Trichinella spiralis* (4.419 proteínas) e por nematódeos filarídeos (3.202 proteínas). Vinte transcritos foram identificados como sequências gênicas codificadoras das proteínas das frações proteicas do extrato somático, previamente identificadas por análise de espectrometria de massas, que apresentaram atividades imunomodulatórias. Cinco desses transcritos estiveram entre as sequências codificadoras de proteínas mais expressas no verme adulto. Além disso, ortólogos de proteínas com propriedades imunomodulatórias em parasitas relacionados também foram preditas a partir do transcriptoma de *T. trichiura* montado *de novo*.

Palavras-chave: *Trichuris trichiura*; Transcriptoma; Sequenciamento de nova geração; Genômica funcional.

1. Introdução

Trichuris trichiura (tricurídeo de humanos) é um dos helmintos transmitidos pelo solo de alta relevância para a saúde pública, haja vista que são estimados 5 bilhões de seres humanos sob risco estável de transmissão por este parasita, dos quais quase 1 bilhão são crianças em idade escolar (Pullan e Brooker, 2012). Tricurídeos adultos medem entre 30-50 mm de comprimento e colonizam o intestino grosso humano, onde podem viver por até dois anos, com as fêmeas botando até 5.000 ovos por dia (Bethony *et al.*, 2006). A sintomatologia da tricuriase normalmente inclui manifestações intestinais (diarreia e dor abdominal), indisposição, fraqueza e retardo no desenvolvimento físico e cognitivo (WHO, 2014).

A infecção por helmintos, incluindo *T. trichiura*, modula a resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, tem um impacto sobre o desenvolvimento e manifestação de doenças inflamatórias crônicas humanas (Maizels, Mcsorley e Smyth, 2014; Mishra *et al.*, 2014; Bashi *et al.*, 2015). Especificamente, estudos epidemiológicos têm demonstrado claramente uma associação inversa entre a infecção por *T. trichiura* e a reação de hipersensibilidade tipo 1 na pele em resposta a aeroalérgenos em crianças (Rodrigues *et al.*, 2008). Além disso, o potencial terapêutico de ovos de *Trichuris suis* (tricurídeo de suínos) tem sido demonstrada em alguns grupos de pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e colite ulcerativa, bem como em pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente (Summers *et al.*, 2003; Summers *et al.*, 2005b; Summers *et al.*, 2005a; Fleming *et al.*, 2011).

Em um esforço para melhor caracterizar o potencial imunomodulatório de proteínas do tricurídeo de humano, o nosso grupo realizou um estudo anterior em que diversas frações do extrato somático do verme adulto (a seguir referenciadas como TtEFs) foram avaliadas quanto aos seus efeitos imunomodulatórios sobre respostas de citocinas em células mononucleares do sangue periférico humano (CMSPs), cultivadas na presença destes antígenos (Santos *et al.*, 2013). Seis TtEFs foram capazes de aumentar a produção da citocina imunoregulatória, interleucina (IL)-10, quando

cultivadas com CMSP e de inibir a produção de citocinas de perfil Th1 e Th2 por CMSP, quando co-cultivadas com doses sub-ótimas de estímulos (por exemplo, fitohemaglutinina para citocinas Th2) (Santos *et al.*, 2013). A caracterização adicional dessas frações protéicas (TtEFs) por nano cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi capaz de identificar proteínas, com ortólogos no parasita *Trichinella spiralis* e foram consideradas moléculas imunomodulatória promissoras (Santos *et al.*, 2013). Para incluir nessa pesquisa mais um passo para permitir-nos projetar essas moléculas do parasita como proteínas recombinantes, fizemos um estudo do transcriptoma da forma adulta de *T. trichiura* para identificar os genes que codificam essas proteínas imunomodulatórias, tomando proveito da montagem do draft do genoma de *T. trichiura* recentemente publicado e do transcriptoma e genoma de referência do parasita de camundongo *T. muris* (Foth *et al.*, 2014). Nós relatamos aqui, de nosso conhecimento, a primeira análise do transcriptoma da espécie *T. trichiura*, o que contribuirá para a anotação funcional da sequência genômica lançada recentemente (Foth *et al.*, 2014) e ajudará na descoberta de moléculas de *T. trichiura* que podem possuir propriedades imunomodulatórias.

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta de parasitas e extração do RNA total

Adultos de *T. trichiura* foram obtidos pelo tratamento de crianças infectadas da província de Esmeraldas - Equador com pamoato de pirantel e posterior coleta nas amostras de fezes por 1-2 dias após o tratamento. A aprovação ética foi concedida pelo Comitê de Ética da Universidade San Francisco de Quito - Equador e o consentimento informado por escrito foi concedido pelos pais ou responsáveis. Os vermes adultos foram lavados cuidadosamente em 0,15 M de solução tamponada de salina fosfatada (pH 7,4) e o ARN total foi extraído utilizando um protocolo padrão de Trizol® (Life Technologies) com o auxílio de esferas de sílica / zircônio (BioSpec Products, Inc.). Verificou-se a pureza do ARN por espectrofotometria (razão 260 nm / 280 nm = 1,95) e a quantificação foi realizada

fluorometricamente usando o kit de teor de RNA, Qubit® (Life Technologies).

2.2. Depleção de ARNr por DHPLC e preparação da biblioteca de ADNc

Cem microgramas de ARN total foram submetidos à depleção de ARN ribossomal por cromatografia líquida de alta eficiência desnaturante (CLAED) utilizando uma coluna do tipo cartucho RNaseP™ (Transgenomic®) em um equipamento Wave® System 4500 (Transgenomic®), conforme descrito em detalhes por Castro e colaboradores (Castro *et al.*, 2013). ARN total depletado de ARNr foi então usado para a preparação da biblioteca de ADNc com o kit Ion total RNA-Seq v2, de acordo com as recomendações do fabricante (Life Technologies).

2.3. Sequenciamento por Ion Torrent e montagem de novo do transcriptoma

Sequenciamento do transcriptoma foi realizada com o Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM) e o chip Ion 318™, de acordo com as recomendações do fabricante (Life Technologies). As leituras brutas foram armazenadas em formato FASTQ; leituras curtas (<50 nt) foram removidas e as sequências remanescentes foram aparadas (*trimming*) em ambas as extremidades 5' e 3' com o FastX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html). A avaliação da qualidade das sequências foi feita com a ferramenta FastQC através da plataforma RNA-Rocket (Warren *et al.*, 2015).

A montagem *de novo* das leituras foi gerada com o montador MIRA 4.0 (Chevreux *et al.*, 2004). O conjunto de dados do transcriptoma de *T. trichiura* está acessível publicamente através de RNA-Rocket (Warren *et al.*, 2015) sob o link, <http://rnaseq.pathogenportal.org/u/lpacheco/h/ttrichiuratranscriptome>. As leituras aparadas também foram mapeadas contra sequência genômica recém lançada de *T. trichiura* v2.0 (Foth *et al.*, 2014) usando a estratégia do Ion Torrent mapper (TMAP).

2.4. Anotação funcional do transcriptoma

As ferramentas Blast2GO v.2.8 (<http://www.blast2go.org>) e TRAPID (Rapid Analysis of Transcriptome Data) (Van Bel *et al.*, 2013) foram utilizadas para recuperar anotações funcionais para os transcritos montados de *Trichuris trichiura*. Buscas de similaridade por BLASTx foram realizadas contra o banco de dados não redundante (nr) do NCBI (E-value: $<1E^{-05}$); domínios proteicos conservados das proteínas preditas e atribuição das sequências a famílias gênicas foram realizadas através de buscas contra a fonte de dados OrthoMCLDB 5.0 (Van Bel *et al.*, 2013). Obtivemos classificações funcionais de ontologia gênica (GO) e anotações de vias *Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomas* (KEGG) para todas as sequências do transcriptoma. Uma anotação curada manualmente de todas os transcritos montados foi realizada através da análise com a ferramenta *Translate tool* (<http://web.expasy.org/translate/>) seguido por buscas de similaridade BLASTp contra base de dados não redundante (nr) do NCBI (E-value: $<1E^{-05}$) ou contra o banco de dados HelmDB (<http://gasser-research.vet.unimelb.edu.au/helmdb/>). Todas as sequências que codificaram proteínas ainda não caracterizadas, foram adicionalmente caracterizadas através de buscas contra a coleção de motivos PROSITE, usando ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>). A predição de prováveis peptídeos sinais foi realizada com o servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

2.5. Análise de transcritos de *T. trichiura* que codificam proteínas com atividades imunomodulatórias

Buscas tBLASTn (E-value: $<1E^{-05}$) foram realizadas contra o conjunto de dados do transcriptoma de *T. trichiura*, usando as sequências de aminoácidos das proteínas que foram previamente identificadas por espectrometria de massas de seis frações cromatográficas do extrato somático do helminto (TtEF-6, TtEF-8, TtEF-9, TtEF-10, TtEF-11 e TtEF-12) e que mostraram atividades imunomodulatórias *in vitro* (Santos *et al.*, 2013). Estas proteínas foram identificadas no estudo anterior, utilizando buscas em Protein Lynx Global Server (PLGS) contra bancos de dados de proteínas de parasitas relacionados, em particular *T. spiralis* (Santos *et al.*, 2013).

Estruturas tridimensionais de proteínas foram modeladas utilizando o servidor SWISS-MODEL,

cuja validação foi realizada utilizando Prosa-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at>) e *STING Millennium Suite* (<http://www.cbi.cnptia.embrapa.br>). Alinhamento estrutural múltiplo foi obtido com o MUSTANG (*Multiple Structural Alignment Algorithm*) (Konagurthu *et al.*, 2006) e a visualização das estruturas proteicas foi realizada usando o software UCSF quimera, versão 1.6.1 (Pettersen *et al.*, 2004).

2.6. Análises de expressão

O software NextGENE® v2.4 (SoftGenetics) foi usado para estimar os níveis de expressão dos transcritos de *T. trichiura* através do alinhamento de todo o conjunto de leituras aparadas contra cerca de 75 Mbp do draft do genoma montado de *T. trichiura* (GenBank: GCA_000613005.1). O número de leituras mapeadas para cada região genômica anotada foi calculado e, em seguida, normalizados para valores RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) que se refere ao número de leituras dividido pelo tamanho do transcrito (kb) vezes o número total de milhões de sequências mapeadas. Um valor limiar de RPKM de 0,3 foi ajustado para detectar confiavelmente a presença de um transcrito para um gene que codifica uma proteína específica.

3. Resultados e Discussão

3.1. Sequenciamento e montagem de novo do transcriptoma de *T. trichiura*

Cerca de 19 milhões de leituras brutas (comprimento acumulado de 2.642.638.062 pb) foram obtidos pelo sequenciamento da biblioteca de ADNc de *T. trichiura*. Avaliação do *trimming* e qualidade resultou em aproximadamente 17,6 milhões (93,6%) de sequências de alta qualidade, com a maior parte das leituras acima do nível Q20 (Tabela 1; Fig. S1). A montagem *de novo* do transcriptoma teve o rendimento de 6.414 *contigs* (sequências consenso) com um N50 de 1.606 pb. O tamanho médio dos *contigs* do transcriptoma montado *ab initio* foi de 1.404 pb e o comprimento dos *contigs* variou de 183 pb a 9.499 pb (Tabela 1). Leituras com as extremidades aparadas também

foram mapeados contra a sequência do draft do genoma recém-lançado de *T. trichiura* v2.0 (Foth *et al.*, 2014) e 92,08% das leituras foram mapeadas para a referência; 81,64% das leituras foram mapeadas para as sequências que codificam proteínas preditas (Tabela 1), o que demonstra uma boa qualidade do protocolo de extração do ARN e da preparação da biblioteca de ADNc (Sultan *et al.*, 2014).

3.2. Anotação funcional e classificação

A maioria dos 6.414 transcritos montados de *T. trichiura* representam sequências que codificam proteínas com ortólogos compartilhados pelo parasita relacionado *T. spiralis* (4.419 proteínas) e pelos nematódeos filarídeos (*Loa loa*, *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti*) (3.202 proteínas) (Fig. 1A). Entre estes, 4.935 transcritos puderam ser atribuídos a 2.683 famílias gênicas (Tabela 1). Um total de 16.086 anotações funcionais de ontologia gênica foram obtidas para sequências que codificam proteínas preditas; estas anotações foram distribuídas em três categorias representando processos biológicos (44,2%), funções moleculares (37,4%) e componentes celulares (18,4%) (Fig. 1 B e C).

Entre as sequências anotadas para processos biológicos, as categorias mais representadas foram processos celulares e metabólicas (1.791 e 1.447 sequências, respectivamente), ao passo que 30 proteínas preditas foram classificadas na categoria de processos do sistema imune (Fig. 1 B). Para funções moleculares, as sequências de *T. trichiura* foram distribuídos em oito categorias, com 103 proteínas preditas envolvidas com atividade de regulação enzimática e a maior parte das proteínas remanescentes (1.617) envolvidas em funções de ligação (Fig. 1 C).

Proteínas preditas de *T. trichiura* também foram submetidas à análise de vias biológica através do mapeamento contra ortólogos KEGG. No total, 960 proteínas preditas puderam ser atribuídas a 88 vias bioquímicas diferentes (Tabela suplementar S1). As vias predominantes foram: "metabolismo de purina" (ko00230, 16,0%), "metabolismo de pirimidina" (ko00240, 5,5%), "biossíntese de aminoacil-RNA" (ko00970, 3,4%), "metabolismo de tiamina" (ko00730, 3,3%) e "sistema de sinalização de fosfatidilinositol" (ko04070, 3,2%) (Tabela suplementar S1).

3.3. Anotação de transcritos que codificam proteínas de funções não caracterizadas

No total, foram identificados 5.713 transcritos que codificam proteínas, seguindo curadoria manual da anotação automatizada dos 6.414 transcritos de *T. trichiura* montados *ab initio*. Destes, 3.617 codificam proteínas que são homólogos de outras com funções já atribuídas (proteínas caracterizadas). O restante, 2.096 transcritos codificam proteínas não caracterizadas (anotadas como “proteínas de função desconhecida” ou “proteínas hipotéticas”). Oitenta e quatro destas proteínas possuem peptídeo sinal. Ao buscar por padrões PROSITE, utilizando a abordagem ScanProsite (De Castro *et al.*, 2006), fomos capazes de obter anotações funcionais para 607 das 2.096 proteínas preditas de *T. trichiura* não caracterizados. Foi possível identificar 1.522 *hits* PROSITE nestas proteínas, pertencentes a 337 domínios, famílias e sítios funcionais diferentes. Vinte e sete destes *hits* estavam presentes em mais de 5 proteínas não caracterizadas, conforme mostrado na Fig. 2. O domínio *zinc-finger* foi o mais prevalente e encontrado em 48 proteínas não caracterizadas (Fig. 2). Os domínios *zinc-finger* são estruturas proteicas de ligação a ácidos nucleicos, principalmente, envolvidos na regulação da transcrição. Muitas classes de *zinc-fingers* são caracterizados de acordo com o número e as posições dos resíduos de histidina e cisteína envolvidos na coordenação do átomo de zinco (Rosenfeld e Margalit, 1993). Os domínios *zinc-finger* do tipo C2H2 (PDOC00028), com a propriedade de ligação a ADN ou ARN, e do tipo RING (PDOC00449), que pode desempenhar um papel fundamental na via de ubiquitinação (Ito *et al.*, 2001), foram os mais comumente encontrados nas proteínas de *T. trichiura* (Fig. 2).

O domínio de proteína quinase (PDOC00100) foi identificada em 34 proteínas não caracterizadas de *T. trichiura* (Fig. 2); proteínas com as maiores probabilidades de serem proteína quinases verdadeiras normalmente apresentam dois domínios específicos: (i) resíduos de serina / treonina, envolvidas na ligação de ATP, e (ii) proteína tirosina quinases, com atividade catalítica (Knighton *et al.*, 1991; Hanks e Hunter, 1995). Seis das proteínas preditas de *T. trichiura*, das 34 proteínas identificadas com domínios de proteína quinase, exibiram ambos os domínios (transcritos

codificadores: Trichuris_c3928, Trichuris_c1599, Trichuris_c913, Trichuris_c5646, Trichuris_c5800 e Trichuris_c5399).

3.4. Níveis de expressão de transcritos de *T. trichiura*

A abundância dos transcritos de *T. trichiura* foi estimada por valores RPKM normalizados, seguindo mapeamento das leituras do transcriptoma contra o draft do genoma lançado recentemente para a espécie (Foth *et al.*, 2014). Um limiar rigoroso de RPKM de 0,3 foi definido para detectar de forma confiável a presença de um transcrito de um gene particular. Observou-se que a grande maioria da atividade transcricional do adulto do *Trichuris trichiura* é concentrada em apenas 10% do total de regiões transcritas do genoma (cerca de 1.798 regiões, que incluem regiões exônicas, intrônicas e intergênicas, de acordo com o draft do genoma montado de *T. trichiura* v.2.0) (Fig. 3). Resultados similares tem sido reportados recentemente para o estágio adulto de outro parasita nematódeo, *Angiostrongylus vasorum*, em que foi observada uma atividade transcricional muito alta concentrada apenas em um pequeno grupo de genes específicos (Ansell *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que existe uma predominância de transcritos que codificam proteínas com funções desconhecidas (proteínas hipotéticas) entre os 40 transcritos mais abundantes que codificam proteínas identificados no transcriptoma do adulto de *T. trichiura* (Tabela 2), similarmente ao que foi demonstrada para os genes mais altamente expressos de *Trichuris muris* (Foth *et al.*, 2014).

A Figura 4 apresenta a anotação funcional das proteínas de *T. trichiura* codificadas pelos transcritos mais expressos dentre os identificados neste estudo, utilizando as classificações GO.

3.5 Transcritos de *T. trichiura* que codificam proteínas com atividades imunomodulatórias

Na presente análise, foi possível identificar 20 transcritos que codificam para as proteínas previamente detectadas nas frações protéicas imunomodulatórias de *T. trichiura* (TtEFs), descritas no estudo de Santos *et al.* (2013) (vide item 2.5; Tabela 3).

TtEF9 foi a fração proteica que apresentou melhor resposta imunorregulatória, induzindo um alto nível de IL-10 quando cultivadas com CMSP e apresentando fortes efeitos inibitórios contra a produção de citocinas Th1 e Th2 quando co-cultivadas com doses sub-ótimas de estímulos imunológicos (Santos *et al.*, 2013). Os transcritos identificados neste estudo que codificam proteínas presentes na TtEF9 foram os seguintes: Trichuris_c4050 (fragmento de actina); Trichuris_c484 (ATP sintase, subunidade β); Trichuris_c2878 (Cisteína protease específica do intestino); Trichuris_c2166 (frutose bisfosfato aldolase); Trichuris_c1625 (malato desidrogenase); Trichuris_c5525 (proteína-quinase C, isoenzima cerebral); e Trichuris_c230 (Girdin).

Exceto pela TtEF 10, a proteína “frutose bisfosfato aldolase” (transcrito codificante: Trichuris_c2166) foi identificada em todas as frações imunomodulatórias previamente descritas (Santos *et al.*, 2013). (Tabela S2). Do mesmo modo, “Cisteína protease específica do intestino” (transcrito codificante: Trichuris_c2878) e “Proteína de choque térmico 70 (HSP70)” (transcrito codificante: Trichuris_c4194) também estavam presentes em mais de uma das frações imunomodulatórias (TtEF) (Tabela 3). Portanto, estas sequências representam candidatos adequados para futura expressão utilizando tecnologia de DNA recombinante. A modelagem tridimensional destas proteínas de *T. trichiura* demonstrou alta similaridade estrutural com os seus ortólogos caracterizados de *T. spiralis* (Fig. 5).

Em adição a estas proteínas, foram investigadas sequências do transcriptoma de *T. trichiura* que codificam proteínas, para as quais foram demonstradas propriedades imunomodulatórias em helmintos relacionados, incluindo uma endopeptidase tipo serina de larvas de primeiro estágio de *Trichuris suis* (Tsui7304731) (Ebner *et al.*, 2014) e a catepsina L1 de *Fasciola hepatica* (Dowling *et al.*, 2010). A proteína Tsui7304731, juntamente com as proteínas de função desconhecida, Tsui7583957 e Tsui7234544, foram previamente identificadas por espectrometria de massas no extrato excretório / secretório de larvas L1 de *T. suis*, e demonstraram efeitos imunomodulatórios em um modelo murino de alergia (Ebner *et al.*, 2014). Buscas de tBLASTn contra o transcriptoma de *T.*

trichiura, utilizando a sequência de aminoácidos de Tsui7304731 identificou o transcrito Trichuris_c27 (E-value: $2.8E^{-136}$). O alinhamento estrutural das duas proteínas também demonstrou alta similaridade (Fig. 5). Transcritos que codificam proteínas com similaridades com Tsui7583957 e Tsui7234544 também foram encontrados no transcriptoma de *T. trichiura*: Trichuris_c4299 (E-value: $3E^{-092}$) e Trichuris_c2345 (E-value: $2E^{-037}$), respectivamente. A Catepsina L1 de *F. hepatica* é outra proteína de helminto com atividade imunorregulatória (Dowling *et al.*, 2010). Uma busca tBLASTn contra o transcriptoma de *T. trichiura* identificou o transcrito Trichuris_c3964, que codifica uma provável proteína com elevada similaridade para o homólogo de *F. hepatica* (Fig. 5).

4. Conclusões

Em conclusão, apresentamos a primeira exploração transcriptômica do estágio adulto do tricurídeo de humanos, *T. trichiura*, utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração e uma estratégia de montagem *de novo*. Fomos capazes de identificar transcritos que codificam para proteínas anteriormente descritas com atividades imunomodulatórias. Os nossos resultados permitirão produzirmos proteínas recombinantes de *T. trichiura* codificadas por estes transcritos que poderiam ser avaliadas como potenciais moléculas terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas em seres humanos.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelos seguintes programas de fomento: Programa INCT / MCT / CNPq - Contrato nº. 5737862008; MCTI / CNPq / FNDCT Ação Transversal Nº 79/2013 (RENORBIO); FAPESB (PET0005 / 2010 e JCB017 / 2013); e CAPES (nº 077_2012 projeto). LNS foi beneficiário de uma bolsa de doutorado da FAPESB. NMAN e MLB foram beneficiários de bolsas de pesquisa do CNPq.

Referências

- Ansell, B. R. et al. Insights into the immuno-molecular biology of *Angiostrongylus vasorum* through transcriptomics--prospects for new interventions. **Biotechnol Adv**, v. 31, n. 8, p. 1486-500, Dec 2013. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895945> >.
- Bashi, T. et al. The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 2, p. 98-104, Feb 2015. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25449677> >.
- Bethony, J. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521-32, May 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16679166 >.
- Castro, T. L. et al. Ion Torrent-based transcriptional assessment of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* equi strain reveals denaturing high-performance liquid chromatography a promising rRNA depletion method. **Microb Biotechnol**, v. 6, n. 2, p. 168-77, Mar 2013. ISSN 1751-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316806> >.
- Chevreux, B. et al. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Res**, v. 14, n. 6, p. 1147-59, Jun 2004. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15140833> >.
- de Castro, E. et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Web Server issue, p. W362-5, Jul 2006. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845026> >.
- Dowling, D. J. et al. Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. **Infect Immun**, v. 78, n. 2, p. 793-801, Feb 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917714> >.
- Ebner, F. et al. Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease. **Allergy**, v. 69, n. 11, p. 1489-97, Nov 2014. ISSN 1398-9995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069662> >.
- Fleming, J. O. et al. Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I study. **Mult Scler**, v. 17, n. 6, p. 743-54, Jun 2011. ISSN 1477-0970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372112> >.
- Foth, B. J. et al. Whipworm genome and dual-species transcriptome analyses provide molecular insights into an intimate host-parasite interaction. **Nat Genet**, v. 46, n. 7, p. 693-700, Jul 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929830> >.
- Hanks, S. K.; Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB J**, v. 9, n. 8, p. 576-96, May 1995. ISSN

0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768349> >.

Ito, K. et al. N-Terminally extended human ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) mediate the ubiquitination of RING-finger proteins, ARA54 and RNF8. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 9, p. 2725-32, May 2001. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322894> >.

Knighton, D. R. et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. **Science**, v. 253, n. 5018, p. 407-14, Jul 1991. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1862342> >.

Konagurthu, A. S. et al. MUSTANG: a multiple structural alignment algorithm. **Proteins**, v. 64, n. 3, p. 559-74, Aug 2006. ISSN 1097-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16736488> >.

Maizels, R. M.; McSorley, H. J.; Smyth, D. J. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? **Clin Exp Immunol**, v. 177, n. 1, p. 38-46, Jul 2014. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24749722> >.

Mangiola, S. et al. Getting the most out of parasitic helminth transcriptomes using HelmDB: implications for biology and biotechnology. **Biotechnol Adv**, v. 31, n. 8, p. 1109-19, Dec 2013. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266393> >.

Mishra, P. K. et al. Systemic impact of intestinal helminth infections. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 4, p. 753-62, Jul 2014. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736234> >.

Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605-12, Oct 2004. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264254> >.

Pullan, R. L.; Brooker, S. J. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 81, 2012. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537799> >.

Rodrigues, L. et al. Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 11, p. 1769-77, Nov 2008. ISSN 1365-2222. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18547322 >.

Rosenfeld, R.; Margalit, H. Zinc fingers: conserved properties that can distinguish between spurious and actual DNA-binding motifs. **J Biomol Struct Dyn**, v. 11, n. 3, p. 557-70, Dec 1993. ISSN 0739-1102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8129873> >.

Santos, L. N. et al. A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects. **Parasite Immunol**, v. 35, n. 5-6, p. 188-93, May 2013. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398517> >.

Summers, R. et al. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 9, p. 2034-41, Sep 2003. ISSN 0002-9270. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14499784 >.

_____. Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. 825-32, Apr 2005a. ISSN 0016-5085. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15825065 >.

_____. Trichuris suis therapy in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 87-90, Jan 2005b. ISSN 0017-5749. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15591509 >.

Van Bel, M. et al. TRAPID: an efficient online tool for the functional and comparative analysis of de novo RNA-Seq transcriptomes. **Genome Biol**, v. 14, n. 12, p. R134, 2013. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24330842> >.

Warren, A. S. et al. RNA-Rocket: an RNA-Seq analysis resource for infectious disease research. **Bioinformatics**, v. 31, n. 9, p. 1496-8, May 2015. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25573919> >.

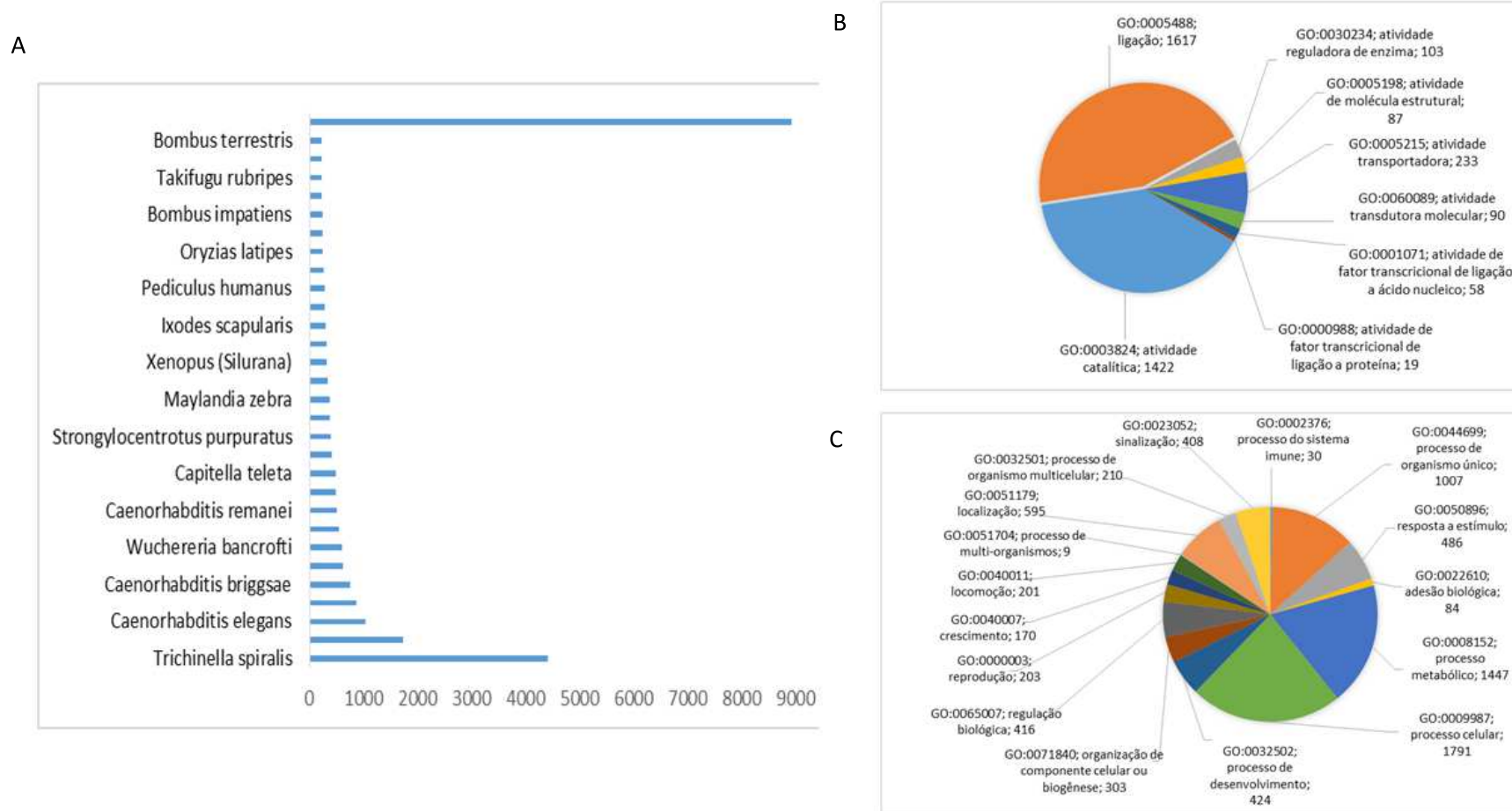


Fig. 1. Anotação funcional de proteínas de *T. Trichiura* preditas do sequenciamento do seu transcriptoma. A) Distribuição de espécies dos principais ortólogos encontrados para proteínas de *T.trichiura*, conforme determinado através de buscas de similaridade BLASTx das seqüências do transcriptoma contra o banco de dados não-redundante de NCBI (cut-off E-value: $< 1E^{-05}$). Classificações de ontologia gênica (GO) das proteínas preditas são sumarizadas em duas categorias principais, no segundo nível: processo biológico (B); e (C) função molecular.

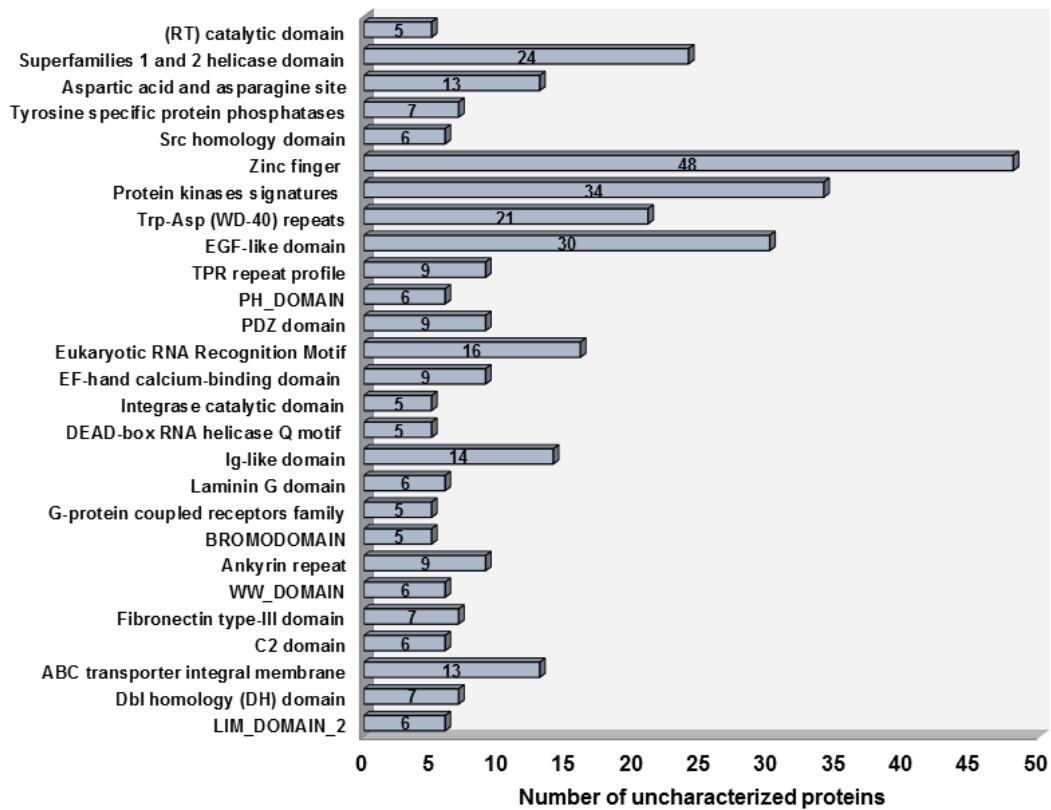


Fig. 2. Domínios de proteína, famílias e sítios funcionais identificados em 607 proteínas preditas ainda não caracterizadas do transcriptoma de *T. trichiura*. Buscas foram realizadas contra a coleção de motivos PROSITE, usando ScanProsite. O número de proteínas não caracterizadas atribuídas a cada hit são apresentados. Apenas hits com mais de 5 proteínas atribuídas são mostrados.

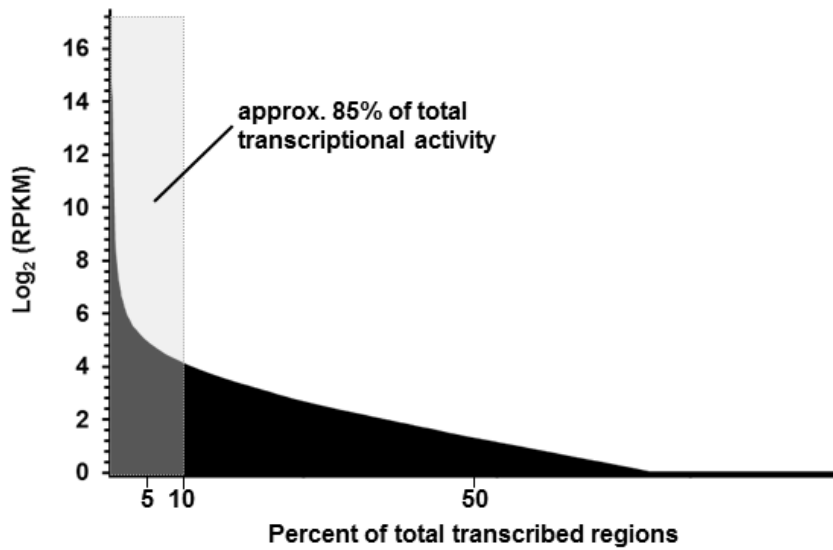


Fig. 3. A atividade transcricional total no transcriptoma do verme adulto de *T. trichiura*, conforme avaliada pela abundância transcricional normalizada (valores RPKM). As leituras por quilobase por milhão de leituras mapeadas, valores (RPKM) para todas as regiões transcritas do genoma de *T. trichiura* foram medidas seguindo mapeamento das leituras do transcriptoma contra o draft do genoma montado de *T. trichiura* v2.0, usando o software NextGENe®. Apenas 10% das regiões transcritas contribuíram para cerca de 85% da atividade transcricional total do transcriptoma do verme adulto, conforme indicado. Os valores RPKM são mostrados como Log₂.

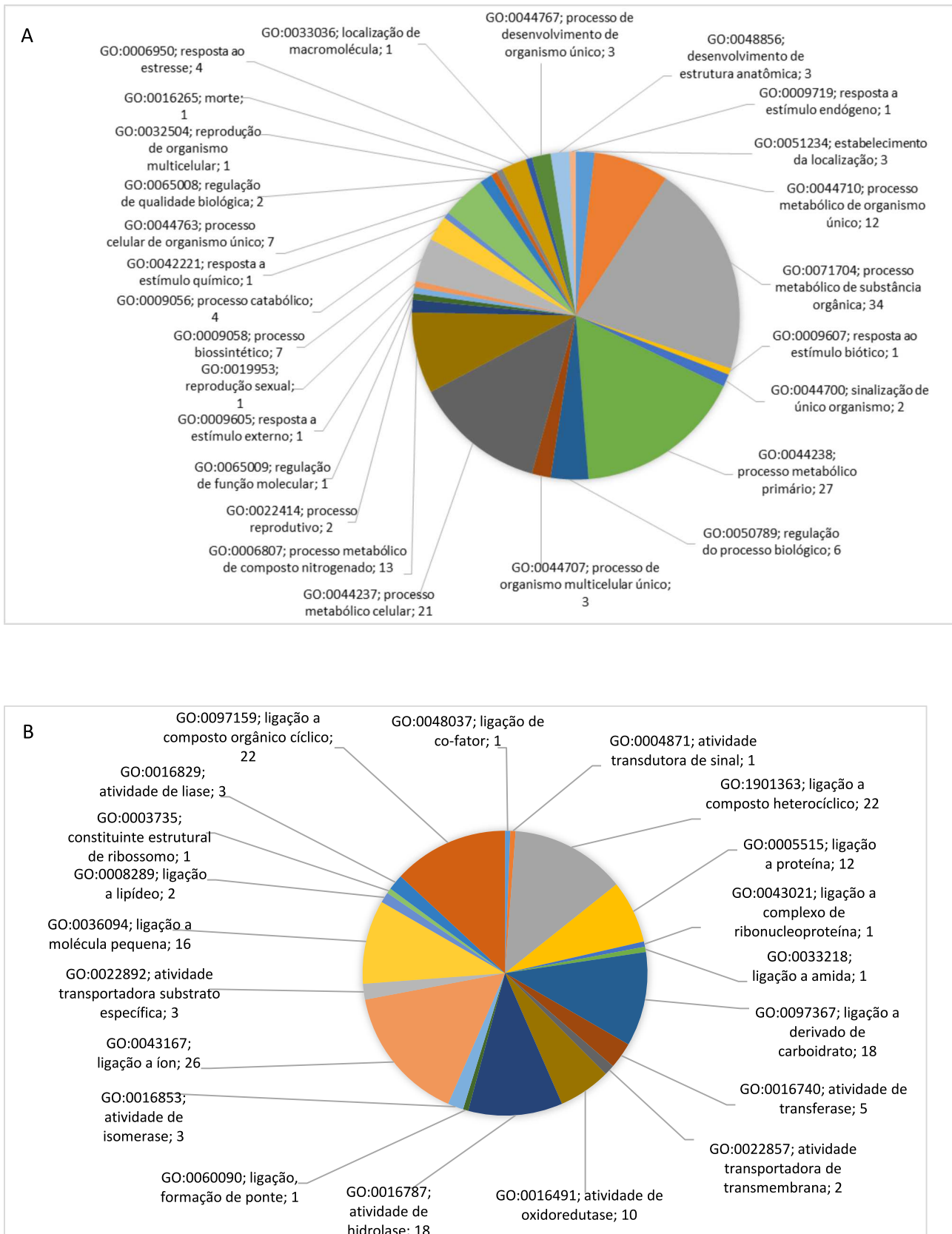


Fig. 4. Anotação funcional dos 200 transcritos codificadores de proteínas mais expressos, usando classificações GO. Anotações foram obtidos através da análise com a ferramenta Blast2GO. Classificações por ontologia gênica (GO) das proteínas previstas são apresentados em duas categorias, no terceiro nível: (A) processos biológicos; e (B) funções moleculares.

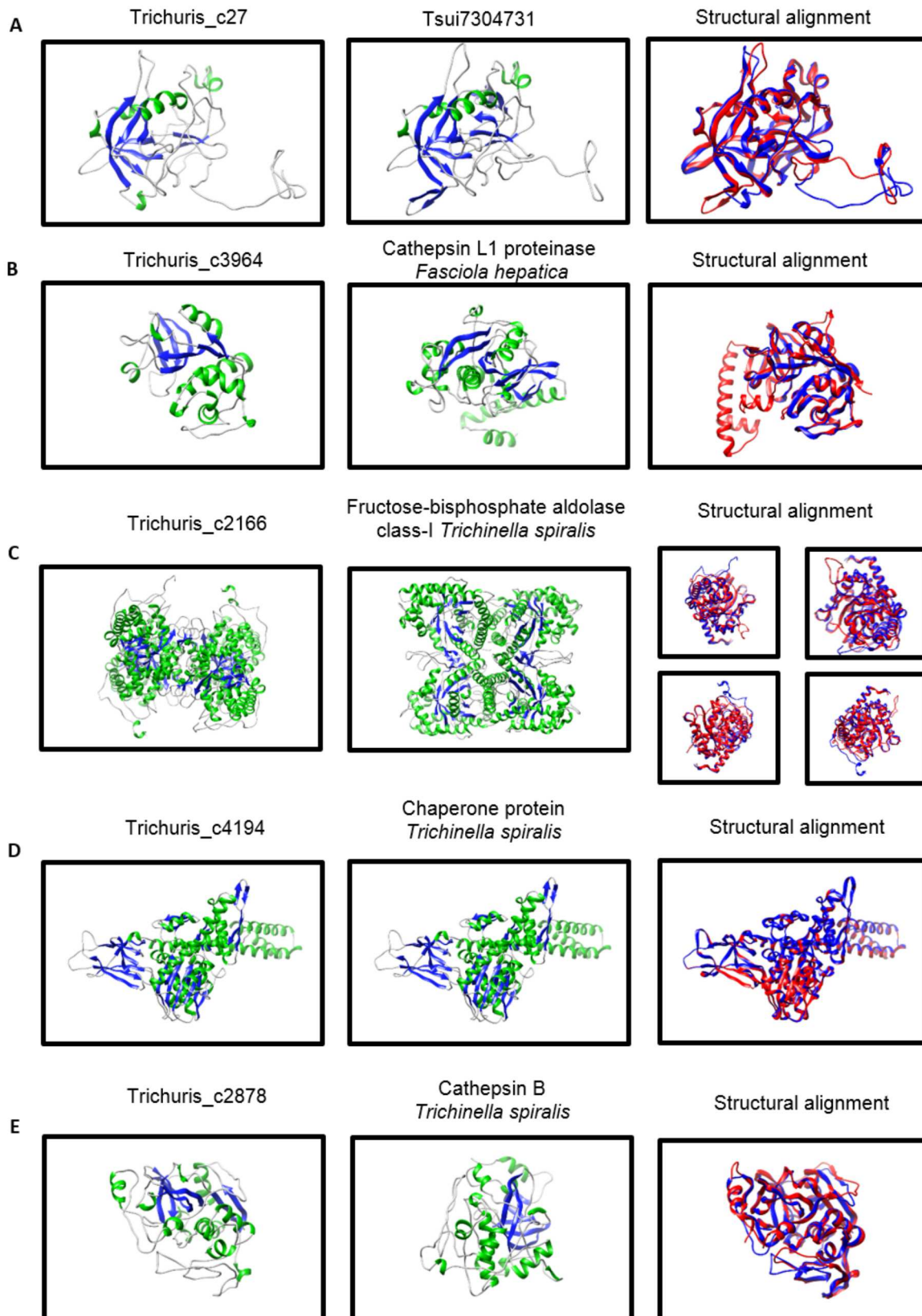


Fig. 5. Alinhamento estrutural das estruturas tridimensionais das proteínas imunomodulatórias de helmintos com seus respectivos ortólogos preditos do transcriptoma de *T. trichiura*. A) Trichuris_c27 com o molde Tsui7304731; B) Trichuris_c3964 com o molde catepsina L1 proteinase (*Fasciola hepatica*); C) Trichuris_c2166 com o molde frutose bisfosfato

aldolase classe I (*Trichinella spiralis*); D) Trichuris_c4194 com o molde proteína Chaperona (*Trichinella spiralis*); E) Trichuris_c2878 com o molde catepsina B (*Trichinella spiralis*).

Tabela 1. Resumo dos resultados de sequenciamento e montagem do transcriptoma do adulto de *T. trichiura*

Estatísticas	Dados do transcriptome de <i>T. trichiura</i>
Número de leituras brutas	18.838.891
Número de leituras selecionadas	17.640.541
Total de pares de bases (pb) (dados brutos)	2.642.638.062
Total de pares de bases (pb) (dados selecionados)	2.360.442.157
Faixa de comprimento da sequência em nucleotídeos	50-362
Conteúdo médio de GC	49.0%
Número de contigs montados <i>ab initio</i>	6.414
Faixa de comprimento de <i>contig</i>	183 bp – 9.499 bp
Comprimento médio de <i>contig</i>	1.404 bp
Tamanho de contig N50	1.606 bp
Percentual de leituras acima do nível Q20	97,6%
Leituras mapeadas para regiões codificante de proteína ^a	81,64%
Leituras mapeadas para regiões não-codificantes ^a	10,44%
Número de transcritos atribuídos à famílias gênicas específicas ^b	4.935 (76,9%)
Número de transcritos que codificam domínios de proteína reconhecíveis ^b	4.154 (64,7%)
Número de transcritos que codificam proteínas identificadas em frações imunomodulatórias do extrato proteico de <i>T. trichiura</i> ^c	20

^a Leituras foram mapeadas contra draft do genoma montado de *T. trichiura* v 2.0, no qual 9.650 genes foram previstos para esta espécie (Foth *et al.*, 2014).

^b Conforme predito pela ferramenta TRAPID (Van Bel *et al.*, 2013), usando uma fonte de dados OrthoMCLDB 5.0.

^c Baseado nas frações protéicas imunomodulatórias identificadas no trabalho de Santos *et al* (2013).

Tabela 2. As 40 sequências que codificam proteínas mais altamente transcritas identificadas no transcriptoma do verme adulto de *T. trichiura*

Número de acesso ^a	Descrição	Ortólogos mais próximos ^b	E-value ^c	RPKM ^d (Log ₂)	(%) ^e
CDW60949.1	Proteína hipotética TTRE_0000935701	Tsui7125196	1E-100	15,96	2,27
CDW60883.1	Proteína hipotética TTRE_0000928701	Tsui7105291	1.00E-11	15.21	1.36
CDW54233.1	Proteína hipotética TTRE_0000250301	Tsui7559952	1.00E-09	14.96	1.14
CDW58325.1	Proteína hipotética TTRE_0000663201	Tsui7105291	6.00E-11	14,74	0,98
CDW61263.1	Proteína hipotética TTRE_0000971101	Tsui7105291	1.00E-11	14.52	0,84
CDW61211.1	Proteína hipotética TTRE_0000965201	Tsui7124323	2.00E-151	14.50	0,83
CDW61046.1	Proteína hipotética TTRE_0000946501	Tsui7124510	3.00E-83	14,33	0,74
CDW52979.1	Proteína hipotética TTRE_0000124101	Tsui7267220	1.00E-14	14.30	0.72
CDW56655.1	Proteína hipotética TTRE_0000493701	Tsui7105291	3.00E-17	14.29	0.72
CDW61033.1	Proteína hipotética TTRE_0000944801	Tsui7124627	1.00E-84	14,26	0.70
CDW52980.1	Proteína hipotética TTRE_0000124301	Tsui7267220	3.00E-12	14.20	0,67
CDW58692.1	Proteína hipotética TTRE_0000701701	Tsui7105291	3.00E-13	14.11	0,63
CDW54610.1	Proteína <i>spindle-pole body</i> (Pcp1)	M513_09656	2e-40	13,36	0,38
CDW58129.1	Proteína contendo domínios Vitellogenin N e VWD e DUF1943	Tsui7113118	3.00E-146	13.19	0,33
CDW61299.1	Proteína hipotética TTRE_0000974801	Tsui7323554	7.00E-09	12,80	0,26
CDW52290.1	Proteína contendo domínio CBM 14	Tsui7123749	0.0	12.47	0.20
CDW61345.1	Proteína hipotética TTRE_0000980101	Tsui7125196	2.00E-18	12,08	0.15
CDW61059.1	Proteína hipotética TTRE_0000948201	Tsui7121137	0.0	11.45	0,10
CDW59881.1	Proteína hipotética TTRE_0000822501	Tsui7115052	3.00E-18	10.59	0,06
CDW54015.1	Proteína com cauda de poli- cisteína e histidina isoforma 2	Tsui7117112	4.00E-91	10,34	0.05
CDW60272.1	Proteína hipotética TTRE_0000863601	NH		10.27	0,04
CDW61247.1	Hidrolase associada a parede celular	Asuu8446313	1.00E-15	10.27	0,04
CDW54307.1	Proteína de choque térmico 90	Tsui7117373	0.0	10,05	0,04
CDW52579.1	Proteína hipotética TTRE_0000084101	Tsui7106971	4.00E-119	10.01	0,04
CDW54937.1	Proteína de ligação poliadenilada 1	Tsui7108405	0.0	9,82	0,03
CDW56365.1	Poliubiquitina	Tsui7109600	0.0	9.41	0.02
CDW58714.1	Proteínas contendo domínios TIL e CBM 14	Tsui7119446	0.0	9,38	0.02
CDW56490.1	Proteína hipotética TTRE_0000477001	NH		9.13	0.02
CDW57445.1	Proteína contendo domínio CBM	Tsui7137747	0.0	9.05	0.02

	14				
CDW53632.1	Proteína hipotética TTRE_0000189701	Tsui7129116	3.00E-86	8.86	0.02
CDW56602.1	Proteína contendo dompinio de tirosinase	Tsui7146002	0.0	8.79	0.02
CDW52289.1	Proteína hipotética TTRE_0000054801	Tsui7134747	1.00E-43	8.76	0.02
CDW54940.1	Proteína contendo domínio CBM 14	Tsui7110776	0.0	8,74	0.02
CDW61148.1	Proteína hipotética TTRE_0000958101	Tsui7242031	1.00E-23	8,72	0.02
CDW60206.1	Proteína contendo dompinio de tripsina	Tsui7201621	0.0	8.67	0.01
CDW53952.1	Ácido graxo sintase	Tsui7130170	0.0	8,64	0.01
CDW53617.1	Enzima conversora da angiotensina	Tsui7118907	0.0	8,64	0.01
CDW57937.1	Calreticulina	Tsui7272154	2.00E- 175	8,55	0.01
CDW56497.1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase GTP	Tsui7136493	0.0	8.51	0.01
CDW55082.1	Proteína contendo domínios TSP 1 e CBM 14	Tsui7387368	0.0	8.46	0.01

NH = sem homólogos encontrados; Tsui = *Trichuris suis*; Asuu = *Ascaris suum*.

^a Base de dados PROTEIN do NCBI.

^b Ortólogos mais próximos encontrados no banco de dados HelmDB (Mangiola *et al.*, 2013).

^c Busca tBLASTn contra HelmDB (Mangiola *et al.*, 2013).

^d Abundância de transcrito normalizado em leituras por quilobases por milhão de leituras mapeadas (RPKM).

^e Percentual do total de atividade transcricional (conforme determinado por valores RPKM).

Tabela 3. Análise da expressão de transcritos que codificam proteínas de *T. trichiura* com atividades imunoregulatórias

Proteína ID ^a	Descrição	Abundância do transcrito (RPKM) ^b	TtEF 6	TtEF 8	TtEF 9	TtEF 10	TtEF 11	TtEF 12
CDW56935.1	Actina	179,54			X			
CDW53601.1	Fator despolimerizante de actina 2, isoforma c	7,00	X					
CDW53275.1	ATP sintase, sub-unidade beta	89,03			X	X	X	
CDW53384.1	Beta-hexosaminidase	22,47		X				
CDW57885.1	Cisteína protease específica do intestino	6,85	X	X	X			
CDW60307.1	Fumarato redutase dependente de NADH	12,15	X					
CDW53142.1	Fator de alongamento de tradução de eucarioto 1A	249,53	X					
CDW54435.1	Frutose bisfosfato aldolase classe I	76,75	X	X	X		X	X
CDW53185.1	Glutamato desidrogenase	10,49	X					
CDW56034.1	Proteína de choque térmico 70	196,20		X		X		
CDW53003.1	Malato desidrogenase	64,28			X			
CDW54347.1	Proteína de degeneração da retina B	5,46	X					
CDW58553.1	Proteína quinase C, isozima cerebral	3,68			X			
CDW56947.1	Laminina G 2 e proteína contendo domínio caderina e EGF CA	10,01		X				
CDW57784.1	Proteína contendo domínios Ufd2P core e U-box	17,06	X					
CDW56963.1	Nebulina e proteína contendo domínios LIM e SH3 1	4,87	X					
CDW52208.1	Girdin	36,50			X			
CDW54989.1	tRNA (citosine(34) C(5)) metiltransferase	11,39		X				
CDW56497.1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase GTP	363,89	X	X				
CDW54395.1	Proteína de filamento intermediário ifa 1	281,45				X		

^a Proteínas previamente identificadas através de análises de espectrometria de massas de seis frações cromatográficas do extrato somática do tricurídeo (TtEF 6, TtEF 8, TtEF 9, TtEF 10, TtEF11 e TtEF 12), que demonstraram atividades imunomodulatórias *in vitro* (Santos *et al.*, 2013). Base de dados PROTEIN do NCBI.

^b Abundância dos transcritos normalizada em leituras por quilobases por milhão leituras mapeadas (RPKM), conforme determinado pela análise com o software NextGENe® v 2.4 (SoftGenetics).

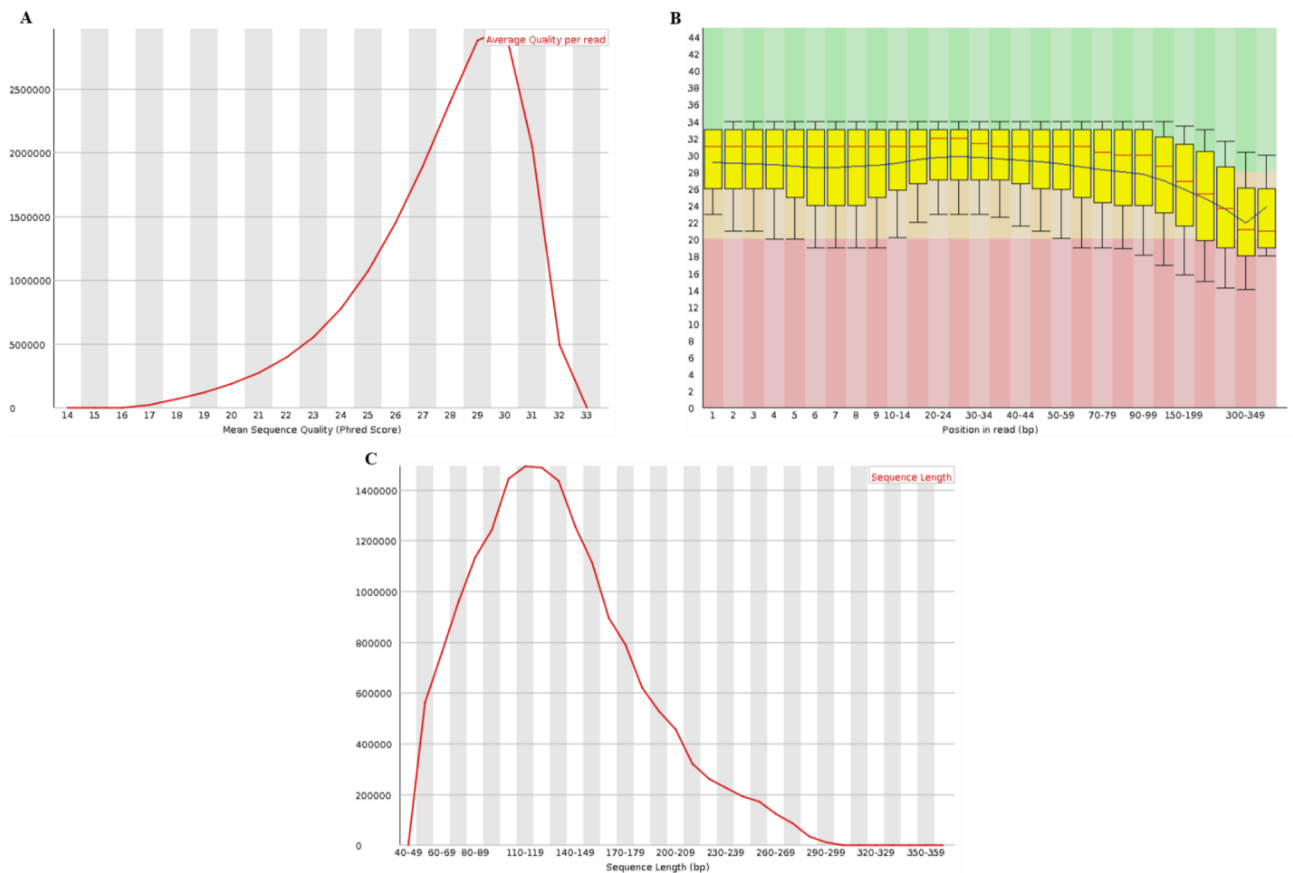


Fig. S1. Verificação da qualidade do sequenciamento do transcriptoma de *T. trichiura* no Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM). A) Scores de qualidade por sequência; B) Qualidade de sequência por base; C) Distribuição de comprimento de sequência. Gráficos foram gerados pela ferramenta FastQC através da plataforma RNA-Rocket (Warren et al., 2015).

Tabela S1. Mapeamento de vias biológicas de proteínas preditas de *T. trichiura* contra ortólogos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

CATEGORIA DA VIA KEGG	NÚMERO DE PROTEÍNAS PREDITAS	VIA KEGG PREDOMINANTE NA CATEGORIA	NÚMERO DE PROTEÍNAS NA VIA PREDOMINANTE (PERCENTUAL RELATIVO AO TOTAL DE PROTEÍNAS)
METABOLISMO			
METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS	209	Metabolismo de piruvato	30 (3,1%)
METABOLISMO ENERGÉTICO	71	Vias de fixação de carbono em procariotos	27 (2,8%)
METABOLISMO LIPÍDICO	57	Metabolismo de glicerofosfolípideo	15 (1,6%)
METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS	207	Metabolismo das purinas	154 (16%)
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS	79	Metabolismo de cisteína e metionina	15 (1,6%)
METABOLISMO DE OUTROS AMINOÁCIDOS	33	Metabolismo da glutatona	16 (1,7%)
METABOLISMO E BIOSÍNTESE DE GLICANOS	36	Biossíntese de N-glicano	11 (1,1%)
METABOLISMO DE VITAMINAS E COFATORES	69	Metabolismo de tiamina	32 (3,3%)
METABOLISMO DE TERPENÓIDES E POLICETÍDEOS	15	Biossíntese de tetraciclina	9 (0,9%)
BIOSÍNTESE DE OUTROS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	26	Biossíntese de aflatoxina	9 (0,9%)
METABOLISMO E BIODEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS	31	Degradação de aminobenzoato	10 (3,2%)
PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÃO GENÉTICA			
TRADUÇÃO	33	Biossíntese de aminoacil-tRNA	33 (3,4%)
PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO LOCAL			
TRANSDUÇÃO DE SINAL	37	Sistema de sinalização de fosfatidilinositol	31 (3,2%)
SISTEMAS DO ORGANISMO			
SISTEMA IMUNOLÓGICO	11	Via de sinalização de receptor de células T	11 (1,1%)

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho fizemos um levantamento das estratégias de identificação de proteínas derivadas de nematódeos com função imunomodulatória e de produção das respectivas proteínas na forma recombinante. Diferentes classes de proteínas de diversas espécies de helmintos foram produzidas em sistemas de expressão em *E. coli* e *P. pastoris*, muitas vezes, na forma funcionalmente ativa. Estas proteínas exerceram importante imunoregulação *in vitro* e em modelos experimentais de doenças associadas a exacerbações de diferentes perfis de resposta imunológica, tais como inflamação alérgica das vias aéreas, inflamação intestinal, perda imune da gravidez e artrite.

A abordagem proteômica proporcionou identificar proteínas das frações do extrato somático de *T. trichiura* possivelmente responsáveis por seus efeitos imunomodulatórios. Particularmente, o homólogo do fator inibitório da migração de monócitos, frutose bisfosfato aldolase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e proteína de choque térmico 70 que tiveram evidências também na literatura que as colocaram como candidatos promissores a serem adicionalmente avaliados.

Exceto pelo homólogo do fator inibitório da migração de monócitos, todas estas proteínas tiveram também a confirmação de sua expressão gênica na análise transcriptômica. O transcrito para fosfoenolpiruvato carboxiquinase ainda esteve entre as 40 sequências que codificam proteínas mais altamente transcritas. Além destas, também identificamos outras sequências que codificam proteínas com potencial imunomodulatório de helmintos relacionados descritas na literatura.

Portanto, a abordagem proteômica foi ratificada por esta análise transcriptômica, a qual é a primeira de que temos conhecimento para o estágio adulto de *Trichuris trichiura* e contribuirá para a anotação funcional da sequência genômica deste parasito. Esta análise também permitirá produzirmos proteínas recombinantes de *T. trichiura* codificadas por estes transcritos que poderão contribuir para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas para doenças alérgicas e autoimunes. Por fim, o transcriptoma ainda abre um excelente campo para exploração da biologia deste nematódeo e da relação parasito-hospedeiro.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA-NEVES, N. M. et al. The presence of serum anti-Ascaris lumbricoides IgE antibodies and of Trichuris trichiura infection are risk factors for wheezing and/or atopy in preschool-aged Brazilian children. **Respir Res**, v. 11, p. 114, 2010. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731833> >.

ANSELL, B. R. et al. Insights into the immuno-molecular biology of Angiostrongylus vasorum through transcriptomics--prospects for new interventions. **Biotechnol Adv**, v. 31, n. 8, p. 1486-500, Dec 2013. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895945> >.

ARICO, C.; BONNET, C.; JAVAUD, C. N-glycosylation humanization for production of therapeutic recombinant glycoproteins in Saccharomyces cerevisiae. **Methods Mol Biol**, v. 988, p. 45-57, 2013. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475713> >.

ASAHI, H. et al. Schistosoma mansoni phosphoenolpyruvate carboxykinase, a novel egg antigen: immunological properties of the recombinant protein and identification of a T-cell epitope. **Infect Immun**, v. 68, n. 6, p. 3385-93, Jun 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816489> >.

ASHER, M. I. Urbanisation, asthma and allergies. **Thorax**, v. 66, n. 12, p. 1025-6, Dec 2011. ISSN 1468-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948729> >.

ASSENBERG, R. et al. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Curr Opin Struct Biol**, v. 23, n. 3, p. 393-402, Jun 2013. ISSN 1879-033X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731801> >.

BAQUEIRO, T. et al. Respiratory allergy to Blomia tropicalis: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. **Respir Res**, v. 11, p. 51, 2010. ISSN 1465-993X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20433763 >.

BASHI, T. et al. The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 2, p. 98-104, Feb 2015. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25449677> >.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke Schistosoma mansoni. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-8, Jul 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19606141> >.

BETHONY, J. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521-32, May 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16679166 >.

BING, S. J. et al. Galectin isolated from parasite inhibits remission of experimental autoimmune encephalomyelitis by up-regulating autoantibody. **Clin Exp Immunol**, v. 180, n. 3, p. 419-31, Jun 2015. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25619397> >.

BORLOO, J. et al. In-depth proteomic and glycomic analysis of the adult-stage *Cooperia oncophora* excretome/secretome. **J Proteome Res**, v. 12, n. 9, p. 3900-11, Sep 2013. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895670> >.

BRADLEY, J. E.; JACKSON, J. A. Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. **Parasite Immunol**, v. 26, n. 11-12, p. 429-41, 2004 Nov-Dec 2004. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771679> >.

BRENNA, Ø. et al. Relevance of TNBS-colitis in rats: a methodological study with endoscopic, histologic and Transcriptomic [corrected] characterization and correlation to IBD. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54543, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382912> >.

BROOKER, S.; CLEMENTS, A. C.; BUNDY, D. A. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. **Adv Parasitol**, v. 62, p. 221-61, 2006. ISSN 0065-308X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647972> >.

BRÄNNSTRÖM, K. et al. The *Schistosoma mansoni* protein Sm16/SmSLP/SmSPO-1 assembles into a nine-subunit oligomer with potential to inhibit Toll-like receptor signaling. **Infect Immun**, v. 77, n. 3, p. 1144-54, Mar 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124604> >.

CANTACESSI, C. et al. Bioinformatics meets parasitology. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 5, p. 265-75, May 2012. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615422> >.

CARDOSO, L. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **Clin Exp Immunol**, Feb 2010. ISSN 1365-2249. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20132231 >.

CASTRO, T. L. et al. Ion Torrent-based transcriptional assessment of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* equi strain reveals denaturing high-performance liquid chromatography a promising rRNA depletion method. **Microb Biotechnol**, v. 6, n. 2, p. 168-77, Mar 2013. ISSN 1751-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316806> >.

CHEVREUX, B. et al. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Res**, v. 14, n. 6, p. 1147-59, Jun 2004. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15140833> >.

CHO, M. K.; LEE, C. H.; YU, H. S. Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through toll-like receptor 2. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 5, p. 265-75, May 2011. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204854> >.

CHOI, Y. J. et al. A deep sequencing approach to comparatively analyze the transcriptome of lifecycle stages of the filarial worm, *Brugia malayi*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p. e1409, Dec 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180794> >.

COLLINS, P. R. et al. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 17, p. 17038-46, Apr 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754899> >.

COOKE, A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 12-7, Jan 2009. ISSN 1365-2567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19120494 >.

COOPER, P. J. et al. Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). **BMC Pulm Med**, v. 6, p. 24, 2006. ISSN 1471-2466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16970809> >.

CROESE, J. et al. A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 136-7, Jan 2006. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16344586> >.

CROFT, A. M.; BAGER, P.; KUMAR, S. Helminth therapy (worms) for allergic rhinitis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, p. CD009238, 2012. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513973> >.

CWIKLINSKI, K. et al. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. **Genome Biol**, v. 16, p. 71, 2015. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887684> >.

DANIŁOWICZ-LUEBERT, E. et al. A nematode immunomodulator suppresses grass pollen-specific allergic responses by controlling excessive Th2 inflammation. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 3-

4, p. 201-10, Mar 2013. ISSN 1879-0135. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23174104> >.

DE CASTRO, E. et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Web Server issue, p. W362-5, Jul 2006. ISSN 1362-4962. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845026> >.

DEEHAN, M. et al. Immunomodulatory properties of *Ascaris suum* glycosphingolipids - phosphorylcholine and non-phosphorylcholine-dependent effects. **Parasite Immunol**, v. 24, n. 9-10, p. 463-9, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 0141-9838. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12654088 >.

DONNELLY, S. et al. Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. **J Biol Chem**, v. 285, n. 5, p. 3383-92, Jan 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923225> >.

DOWLING, D. J. et al. Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. **Infect Immun**, v. 78, n. 2, p. 793-801, Feb 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917714> >.

DU, L. et al. The protective effect of the recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice. **Dig Dis Sci**, v. 56, n. 10, p. 2810-7, Oct 2011. ISSN 1573-2568. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476030> >.

_____. Regulation of recombinant *Trichinella spiralis* 53-kDa protein (rTsP53) on alternatively activated macrophages via STAT6 but not IL-4R α in vitro. **Cell Immunol**, v. 288, n. 1-2, p. 1-7, 2014 Mar-Apr 2014. ISSN 1090-2163. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24534206> >.

EBNER, F. et al. Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease. **Allergy**, v. 69, n. 11, p. 1489-97, Nov 2014. ISSN 1398-9995. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069662> >.

FERNÁNDEZ, F. J.; VEGA, M. C. Technologies to keep an eye on: alternative hosts for protein production in structural biology. **Curr Opin Struct Biol**, v. 23, n. 3, p. 365-73, Jun 2013. ISSN 1879-033X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481468> >.

FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. **Trends Parasitol**, v. 26, n. 5, p. 244-54, May 2010. ISSN 1471-5007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189877> >.

FIGUEIREDO, C. A. et al. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. **Infect Immun**, v. 78, n. 7, p. 3160-

7, Jul 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404082>>.

FLEMING, J. O. et al. Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. **Mult Scler**, v. 17, n. 6, p. 743-54, Jun 2011. ISSN 1477-0970. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372112>>.

FOTH, B. J. et al. Whipworm genome and dual-species transcriptome analyses provide molecular insights into an intimate host-parasite interaction. **Nat Genet**, v. 46, n. 7, p. 693-700, Jul 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929830>>.

FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Front Immunol**, v. 4, p. 217, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908655>>.

FUJIHARA, J. et al. Two N-linked glycosylation sites (Asn18 and Asn106) are both required for full enzymatic activity, thermal stability, and resistance to proteolysis in mammalian deoxyribonuclease I. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 72, n. 12, p. 3197-205, Dec 2008. ISSN 1347-6947. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060393>>.

GALVANI, A. P. Age-dependent epidemiological patterns and strain diversity in helminth parasites. **J Parasitol**, v. 91, n. 1, p. 24-30, Feb 2005. ISSN 0022-3395. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856867>>.

GARG, S. K.; CROFT, A. M.; BAGER, P. Helminth therapy (worms) for induction of remission in inflammatory bowel disease. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 1, p. CD009400, 2014. ISSN 1469-493X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24442917>>.

GASSER, R. B. A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. **Vet Parasitol**, v. 193, n. 4, p. 353-64, Apr 2013. ISSN 1873-2550. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485434>>.

GHEDIN, E. Panning for molecular gold in whipworm genomes. **Nat Genet**, v. 46, n. 7, p. 661-3, Jul 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24965726>>.

GHEDIN, E. et al. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1756-60, Sep 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17885136>>.

GOODRIDGE, H. S. et al. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 3, p. 127-37, Mar 2007. ISSN 0141-9838. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266740>>.

GRABITZKI, J. et al. The PCome of *Caenorhabditis elegans* as a prototypic model system for parasitic nematodes: identification of phosphorylcholine-substituted proteins. **Mol Biochem Parasitol**, v. 161, n. 2, p. 101-11, Oct 2008. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652849> >.

GRUDEN-MOVSESIJAN, A. et al. Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. **Parasite Immunol**, v. 32, n. 6, p. 450-9, Jun 2010. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500676> >.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB J**, v. 9, n. 8, p. 576-96, May 1995. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768349> >.

HARNETT, M. M. et al. The phosphorylcholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 4, p. 518-23, Apr 2008. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17704067> >.

HARNETT, W.; HARNETT, M. M. Immunomodulatory activity and therapeutic potential of the filarial nematode secreted product, ES-62. **Adv Exp Med Biol**, v. 666, p. 88-94, 2009. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20054977> >.

HARNETT, W.; MCINNES, I.; HARNETT, M. ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. **Immunol Lett**, v. 94, n. 1-2, p. 27-33, Jun 2004. ISSN 0165-2478. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15234531 >.

HARTMANN, S. et al. A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 9, p. 2253-60, Sep 1997. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9341767> >.

HARTMANN, W. et al. Nematode-derived proteins suppress proliferation and cytokine production of antigen-specific T cells via induction of cell death. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e68380, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861729> >.

HAUET-BROERE, F. et al. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. **Ann Rheum Dis**, v. 65 Suppl 3, p. iii65-8, Nov 2006. ISSN 0003-4967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038477> >.

HE, L. et al. Biochemical and immunological characterization of annexin B30 from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products. **Parasitol Res**, v. 113, n. 7, p. 2743-55, Jul 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24861011> >.

HOSHINO, T. et al. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 1, p. 49-62, Jul 2007. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400729> >.

HU, S. et al. Molecular cloning and expression of a functional anti-inflammatory protein, Sj16, of *Schistosoma japonicum*. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 2, p. 191-200, Jan 2009. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804475> >.

HÜBNER, M. P. et al. Helminth protection against autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice is independent of a type 2 immune shift and requires TGF- β . **J Immunol**, v. 188, n. 2, p. 559-68, Jan 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174447> >.

ITO, K. et al. N-Terminally extended human ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) mediate the ubiquitination of RING-finger proteins, ARA54 and RNF8. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 9, p. 2725-32, May 2001. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322894> >.

JACOBS, P.; BISSONNETTE, R.; GUENTHER, L. C. Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases--focusing on work productivity and disability. **J Rheumatol Suppl**, v. 88, p. 55-61, Nov 2011. ISSN 0380-0903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045980> >.

JANG, S. W. et al. Parasitic helminth cystatin inhibits DSS-induced intestinal inflammation via IL-10(+)/F4/80(+) macrophage recruitment. **Korean J Parasitol**, v. 49, n. 3, p. 245-54, Sep 2011. ISSN 1738-0006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072824> >.

JEX, A. R. et al. *Ascaris suum* draft genome. **Nature**, v. 479, n. 7374, p. 529-33, Nov 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031327> >.

_____. Genome and transcriptome of the porcine whipworm *Trichuris suis*. **Nat Genet**, v. 46, n. 7, p. 701-6, Jul 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929829> >.

Jl, P. et al. AcCystatin, an immunoregulatory molecule from *Angiostrongylus cantonensis*, ameliorates the asthmatic response in an aluminium hydroxide/ovalbumin-induced rat model of asthma. **Parasitol Res**, v. 114, n. 2, p. 613-24, Feb 2015. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25399816> >.

KANG, J. M. et al. Identification and functional characterization of CsStefin-1, a cysteine protease inhibitor of *Clonorchis sinensis*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 177, n. 2, p. 126-34, Jun 2011. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354219> >.

KARNAUKHOVA, E. et al. Expression of human alpha1-proteinase inhibitor in *Aspergillus niger*. **Microb Cell Fact**, v. 6, p. 34, 2007. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967194> >.

KHAN, W. et al. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 5931-7, Nov 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12379667 >.

KIM, J. Y. et al. Inhibition of dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal inflammation via enhanced IL-10 and TGF-beta production by galectin-9 homologues isolated from intestinal parasites. **Mol Biochem Parasitol**, v. 174, n. 1, p. 53-61, Nov 2010. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603157> >.

KIM, S. E. et al. Crude extracts of *Caenorhabditis elegans* suppress airway inflammation in a murine model of allergic asthma. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35447, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558152> >.

KNIGHTON, D. R. et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. **Science**, v. 253, n. 5018, p. 407-14, Jul 1991. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1862342> >.

KOMINE-AIZAWA, S. et al. The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune-mediated pregnancy loss. **J Reprod Immunol**, v. 92, n. 1-2, p. 21-6, Dec 2011. ISSN 1872-7603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983343> >.

KONAGURTHU, A. S. et al. MUSTANG: a multiple structural alignment algorithm. **Proteins**, v. 64, n. 3, p. 559-74, Aug 2006. ISSN 1097-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16736488> >.

KRON, M. A. et al. Nematode asparaginyl-tRNA synthetase resolves intestinal inflammation in mice with T-cell transfer colitis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 20, n. 2, p. 276-81, Feb 2013. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254300> >.

LAYLAND, L. E. et al. *Schistosoma mansoni*-mediated suppression of allergic airway inflammation requires patency and Foxp3+ Treg cells. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2379, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23967364> >.

LEE, H. M. et al. Up-regulation of protease-activated receptor 2 in allergic rhinitis. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 116, n. 7, p. 554-8, Jul 2007. ISSN 0003-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727088> >.

LOHMAN, R. J. et al. Antagonism of protease-activated receptor 2 protects against experimental colitis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 340, n. 2, p. 256-65, Feb 2012. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22028393> >.

MAIZELS, R. M.; MCSORLEY, H. J.; SMYTH, D. J. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? **Clin Exp Immunol**, v. 177, n. 1, p. 38-46, Jul 2014. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24749722> >.

MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHS, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 733-44, Sep 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949497> >.

MANGIOLA, S. et al. Getting the most out of parasitic helminth transcriptomes using HelmDB: implications for biology and biotechnology. **Biotechnol Adv**, v. 31, n. 8, p. 1109-19, Dec 2013. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266393> >.

MARQUES, H. H. et al. Protective effect and granuloma down-modulation promoted by RP44 antigen a fructose 1,6 biphosphate aldolase of *Schistosoma mansoni*. **Immunobiology**, v. 213, n. 5, p. 437-46, 2008. ISSN 0171-2985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472052> >.

MISHRA, P. K. et al. Systemic impact of intestinal helminth infections. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 4, p. 753-62, Jul 2014. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24736234> >.

MITREVA, M. et al. The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. **Nat Genet**, v. 43, n. 3, p. 228-35, Mar 2011. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21336279> >.

MONCAYO, A. L. et al. Risk factors for atopic and non-atopic asthma in a rural area of Ecuador. **Thorax**, v. 65, n. 5, p. 409-16, May 2010. ISSN 1468-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20435862> >.

MORPHEW, R. M. et al. Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by Nonidet P40. **Vet Parasitol**, v. 191, n. 3-4, p. 379-85, Jan 2013. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021260> >.

MURRAY, L. et al. Expression and purification of an active cysteine protease of *Haemonchus contortus* using *Caenorhabditis elegans*. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1117-25, Aug 2007. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451718> >.

MÜLLER, M. P. et al. Exploring adenylation and phosphocholination as post-translational modifications. **Chembiochem**, v. 15, n. 1, p. 19-26, Jan 2014. ISSN 1439-7633. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24174209> >.

NAGAYASU, E. et al. Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitol Int**, v. 62, n. 1, p. 57-65, Feb 2013. ISSN 1873-0329. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022620> >.

NEWLANDS, G. F. et al. Cloning and characterization of a beta-galactoside-binding protein (galectin) from the gut of the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 119 (Pt 5), p. 483-90, Nov 1999. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599080> >.

PACÍFICO, L. et al. Schistosoma mansoni antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 98-107, Jan 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18824533 >.

PARK, H. K. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Isolated from a Parasite Inhibited Th2 Cytokine Production in PBMCs of Atopic Asthma Patients. **J Asthma**, v. 49, n. 1, p. 10-5, Feb 2012. ISSN 1532-4303. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149098> >.

PARK, S. K. et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of anisakis simplex suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. **J Immunol**, v. 182, n. 11, p. 6907-14, Jun 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454687> >.

PARKER, W.; OLLERTON, J. Evolutionary biology and anthropology suggest biome reconstitution as a necessary approach toward dealing with immune disorders. **Evol Med Public Health**, v. 2013, n. 1, p. 89-103, Jan 2013. ISSN 2050-6201. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481190> >.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605-12, Oct 2004. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264254> >.

PFEIFER, B. A.; KHOSLA, C. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 65, n. 1, p. 106-18, Mar 2001. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238987> >.

PINEDA, M. A. et al. From the worm to the pill, the parasitic worm product ES-62 raises new horizons in the treatment of rheumatoid arthritis. **Lupus**, v. 24, n. 4-5, p. 400-11, Apr 2015. ISSN 1477-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801883> >.

_____. The parasitic helminth product ES-62 suppresses pathogenesis in collagen-induced arthritis by targeting the interleukin-17-producing cellular network at multiple sites. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 10, p. 3168-78, Oct 2012. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729944> >.

PULLAN, R. L.; BROOKER, S. J. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 81, 2012. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537799> >.

PUNEET, P. et al. The helminth product ES-62 protects against septic shock via Toll-like receptor 4-dependent autophagosomal degradation of the adaptor MyD88. **Nat Immunol**, v. 12, n. 4, p. 344-51, Apr 2011. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21358639> >.

ROACH, T. I. et al. Antigenic cross-reactivity between the human whipworm, *Trichuris trichiura*, and the mouse trichuroids *Trichuris muris* and *Trichinella spiralis*. **Parasite Immunol**, v. 10, n. 3, p. 279-91, May 1988. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3412784> >.

RODGERS, D. T. et al. Drug-like analogues of the parasitic worm-derived immunomodulator ES-62 are therapeutic in the MRL/Lpr model of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Jun 2015. ISSN 1477-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085597> >.

RODRIGUES, L. et al. Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 11, p. 1769-77, Nov 2008. ISSN 1365-2222. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18547322 >.

ROGER, T. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). **J Endotoxin Res**, v. 9, n. 2, p. 119-23, 2003. ISSN 0968-0519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12803886> >.

ROOK, G. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 3-11, Jan 2009. ISSN 1365-2567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19120493 >.

ROSENFELD, R.; MARGALIT, H. Zinc fingers: conserved properties that can distinguish between spurious and actual DNA-binding motifs. **J Biomol Struct Dyn**, v. 11, n. 3, p. 557-70, Dec 1993. ISSN 0739-1102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8129873> >.

ROSSINI, M. et al. Why golimumab in the treatment of psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis? **Reumatismo**, v. 66, n. 4, p. 285-303, 2015. ISSN 0048-7449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25829189> >.

SAMITAS, K.; RÅDINGER, M.; BOSSIOS, A. Current update on eosinophilic lung diseases and anti-IL-5 treatment. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 6, n. 3, p. 189-205, Sep 2011. ISSN 1574-891X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824072> >.

SANIN, D. E.; MOUNTFORD, A. P. Sm16, a major component of *Schistosoma mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical activation and delays antigen processing. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 1, 2015. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25561160> >.

SANTOS, L. N. et al. A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects. **Parasite Immunol**, v. 35, n. 5-6, p. 188-93, 2013 May-Jun 2013. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398517> >.

SASAKI, Y. et al. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. **Mol Hum Reprod**, v. 10, n. 5, p. 347-53, May 2004. ISSN 1360-9947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14997000> >.

SAUNDERS, K. et al. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. **Infect Immun**, v. 75, n. 1, p. 397-407, Jan 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17043101 >.

SCHMIDLIN, F. et al. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. **J Immunol**, v. 169, n. 9, p. 5315-21, Nov 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391252> >.

SCHWARZ, F. et al. A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. **Nat Chem Biol**, v. 6, n. 4, p. 264-6, Apr 2010. ISSN 1552-4469. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190762> >.

SCHÖNEMEYER, A. et al. Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. **J Immunol**, v. 167, n. 6, p. 3207-15, Sep 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544307> >.

SHARMA, R. et al. Molecular and functional characterization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) homolog of human from lymphatic filarial parasite *Wuchereria bancrofti*. **Parasitol Res**, v. 111, n. 5, p. 2035-47, Nov 2012. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22875393> >.

SHINY, C. et al. Recombinant *Wolbachia* heat shock protein 60 (HSP60) mediated immune responses in patients with lymphatic filariasis. **Microbes Infect**, v. 13, n. 14-15, p. 1221-31, Dec 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827871> >.

SMITS, H. H. et al. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 10, n. 1, p. 3-12, Jan 2010. ISSN 1534-6315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425508> >.

SMOOKER, P. M. et al. Cathepsin B proteases of flukes: the key to facilitating parasite control? **Trends Parasitol**, v. 26, n. 10, p. 506-14, Oct 2010. ISSN 1471-5007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580610> >.

SOFRONIC-MILOSavlJEVIC, L. J. et al. Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Med Microbiol Immunol**, v. 202, n. 3, p. 239-49, Jun 2013. ISSN 1432-1831. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307236> >.

SOMERSET, D. A. et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. **Immunology**, v. 112, n. 1, p. 38-43, May 2004. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096182> >.

STACK, C. M. et al. De-glycosylation of *Pichia pastoris*-produced *Schistosoma mansoni* cathepsin B eliminates non-specific reactivity with IgG in normal human serum. **J Immunol Methods**, v. 304, n. 1-2, p. 151-7, Sep 2005. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125194> >.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, Nov 1989. ISSN 0959-8138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2513902> >.

SUMMERS, R. et al. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 9, p. 2034-41, Sep 2003. ISSN 0002-9270. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14499784 >.

_____. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. 825-32, Apr 2005a. ISSN 0016-5085. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15825065 >.

_____. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 87-90, Jan 2005b. ISSN 0017-5749. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15591509 >.

SUN, X. et al. Effects of a recombinant schistosomal-derived anti-inflammatory molecular (rSj16) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced activated RAW264.7. **Parasitol Res**, v. 110, n. 6, p. 2429-37, Jun 2012. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281546> >.

SUN, Y. et al. Modulation of dendritic cell function and immune response by cysteine protease inhibitor from murine nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. **Immunology**, v. 138, n.

4, p. 370-81, Apr 2013. ISSN 1365-2567. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23240853> >.

TANG, Y. T. et al. Genome of the human hookworm *Necator americanus*. **Nat Genet**, v. 46, n. 3, p. 261-9, Mar 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441737> >.

TEZUKA, H. et al. Various types of *Dirofilaria immitis* polyproteins selectively induce a Th2-Type immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 7, p. 3802-11, Jul 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12819063> >.

TILNEY, L. G. et al. Adaptation of a nematode parasite to living within the mammalian epithelium. **J Exp Zool A Comp Exp Biol**, v. 303, n. 11, p. 927-45, Nov 2005. ISSN 1548-8969. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217807> >.

TO, T. et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health**, v. 12, p. 204, 2012. ISSN 1471-2458. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429515> >.

VALLE, C. et al. Stage-specific expression of a *Schistosoma mansoni* polypeptide similar to the vertebrate regulatory protein stathmin. **J Biol Chem**, v. 274, n. 48, p. 33869-74, Nov 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567347> >.

VAN BEL, M. et al. TRAPID: an efficient online tool for the functional and comparative analysis of de novo RNA-Seq transcriptomes. **Genome Biol**, v. 14, n. 12, p. R134, 2013. ISSN 1465-6914. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24330842> >.

VEDADI, M. et al. Biophysical characterization of recombinant proteins: a key to higher structural genomics success. **J Struct Biol**, v. 172, n. 1, p. 107-19, Oct 2010. ISSN 1095-8657. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466062> >.

VERMEIRE, J. J. et al. Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 8, p. 355-63, Aug 2008. ISSN 1471-4922. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18603473> >.

VIEHMANN MILAM, A. A. et al. A humanized mouse model of autoimmune insulinitis. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1712-24, May 2014. ISSN 1939-327X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478396> >.

WALSH, G. M. Tralokinumab, an anti-IL-13 mAb for the potential treatment of asthma and COPD. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 11, n. 11, p. 1305-12, Nov 2010. ISSN 2040-3429. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157650> >.

WANG, W. et al. Transcriptional and proteomic analysis reveal recombinant galectins of *Haemonchus contortus* down-regulated functions of goat PBMC and modulation of several

signaling cascades in vitro. **J Proteomics**, v. 98, p. 123-37, Feb 2014. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24401599> >.

WANG, X. et al. CD4+CD25+ Treg induction by an HSP60-derived peptide SJMHE1 from *Schistosoma japonicum* is TLR2 dependent. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 11, p. 3052-65, Nov 2009. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19882655> >.

WARREN, A. S. et al. RNA-Rocket: an RNA-Seq analysis resource for infectious disease research. **Bioinformatics**, v. 31, n. 9, p. 1496-8, May 2015. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25573919> >.

WASLEY, L. C. et al. The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. **Blood**, v. 77, n. 12, p. 2624-32, Jun 1991. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2043765> >.

YANG, X. et al. Cloning, expression and characterisation of a type II cystatin from *Schistosoma japonicum*, which could regulate macrophage activation. **Parasitol Res**, v. 113, n. 11, p. 3985-92, Nov 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25096535> >.

YANMING, S. et al. Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 6, p. 319-26, Jun 2007. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518950> >.

YOUNIS, A. E. et al. Stage-specific excretory-secretory small heat shock proteins from the parasitic nematode *Strongyloides ratti*--putative links to host's intestinal mucosal defense system. **FEBS J**, v. 278, n. 18, p. 3319-36, Sep 2011. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762402> >.

_____. Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Strongyloides* acting at the parasite-host cell interface. **Microbes Infect**, Oct 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037391> >.

ZHANG, H.; ZENG, X.; HE, S. Evaluation on potential contributions of protease activated receptors related mediators in allergic inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 829068, 2014. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876677> >.

ZHANG, Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor homolog from *Plasmodium yoelii* modulates monocyte recruitment and activation in spleen during infection. **Parasitol Res**, Oct 2011. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015474> >.

ZHOU, Q. J. et al. Expression of *Caenorhabditis elegans*-expressed Trans-HPS, partial aminopeptidase H11 from *Haemonchus contortus*. **Exp Parasitol**, v. 145, p. 87-98, Oct 2014. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25128369> >.

ZHU, X. Q. et al. Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. **Nat Commun**, v. 6, p. 6145, 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25649139> >.

ZIEGLER, T. et al. A Novel Regulatory Macrophage Induced by a Helminth Molecule Instructs IL-10 in CD4+ T Cells and Protects against Mucosal Inflammation. **J Immunol**, v. 194, n. 4, p. 1555-64, Feb 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589067> >.

ANEXOS

Anexo A

Manuscrito 1 publicado: A Proteomic Approach to Identify Proteins from *Trichuris trichiura* Extract with Immunomodulatory Effects

**Parasite
Immunology**

Parasite Immunology, 2013, **35**, 188–193

DOI: 10.1111/pim.12025



Brief Definitive Report

A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects

L. N. SANTOS,¹ M. B. C. GALLO,² E. S. SILVA,¹ C. A. V. FIGUEIREDO,¹ P. J. COOPER,³ M. L. BARRETO,⁴ S. LOUREIRO,⁴ L. C. PONTES-DE-CARVALHO⁵ & N. M. ALCANTARA-NEVES¹

¹Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ²Plataforma de Espectrometria de Massas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Brazil, ³Department of Molecular and Biochemical Parasitology, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK, ⁴Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil and ⁵Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Brazil

Anexo B

Comprovante de submissão do Manuscrito 2: *De novo* Assembly and Characterization of the *Trichuris trichiura* Adult Worm Transcriptome using Ion Torrent Sequencing.

----- Mensagem Original -----

De: Acta Tropica

Enviada em: 2015/11/07 08:34

Para: lgcpacheco@gmail.com

Assunto: Um número manuscrito foi atribuído: ACTROP-D-15-00464

Ms. Ref. No .: ACTROP-D-15-00464

Título: montagem novo De e caracterização do Trichuris trichiura transcriptoma de verme adulto usando Ion Torrent seqüenciamento Acta Tropica

Caro Dr. Luis Gustavo Pacheco,

Sua apresentação intitulada "De novo montagem e caracterização da Trichuris trichiura transcriptoma de verme adulto usando Ion Torrent seqüenciamento" foi atribuído o seguinte número de manuscrito: ACTROP-D-15-00464.

Você pode verificar o andamento do seu papel, registrando-se o Elsevier Sistema Editorial como um autor. A URL é <http://ees.elsevier.com/actrop/> .

Seu nome de usuário é: LPacheco-692

Se você não lembra da sua senha, por favor clique no botão "Enviar senha" link na página de login.

Obrigado por nos enviar o seu trabalho para esta revista.

Atenciosamente,

Acta Tropica