

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARINA RANHEL OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PREDNISOLONA E DO EXTRATO SALINO DE
Strongyloides venezuelensis EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (BeWo)
INFECTADAS POR *Toxoplasma gondii*

Uberlândia

2023

MARINA RANHEL OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PREDNISOLONA E DO EXTRATO SALINO DE
Strongyloides venezuelensis EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (BeWo)
INFECTADAS POR *Toxoplasma gondii*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Instituto de Biologia (INBIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga

Coorientadora: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Uberlândia

2023

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PREDNISOLONA E DO EXTRATO SALINO DE
Strongyloides venezuelensis EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (BeWo)
INFECTADAS POR *Toxoplasma gondii*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao
Instituto de Biologia (INBIO) da Universidade Federal
de Uberlândia (UFU) como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia, 24 de novembro de 2023

Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga
Presidente da Banca (Orientador)

Dra. Iasmin Aparecida Cunha Araújo
Membro 1 da Banca

Ms. Joed Pires de Lima Júnior
Membro 2 da Banca

Dedico este trabalho ao meu maior amor, às pessoas que me deram a vida, que guiaram meus passos, acalmaram meu coração e me fizeram acreditar que tudo seria possível: meus pais. Sem eles, que abdicaram de tantas vontades e sonhos para tornar o meu real e possível, esses 5 longos e mais importantes anos da minha vida não teriam sido concluídos com o sucesso que concluo hoje. Mãe, Camila Fernandes Ranhel Oliveira, você é meu exemplo de mulher, de garra e de resiliência. Pai, Marco Aurélio de Oliveira, você é minha inspiração de determinação, força de vontade e perseverança. Recebam esse trabalho como prova de que tudo que vocês me ensinaram ao longo da vida foi aprendido e colocado em prática.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Dr. Henrique Tomaz Gonzaga, que acreditou no meu potencial para compor a equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses (LADIPAR). Você, com certeza, se tornou uma grande inspiração para mim; inspiração essa que vou carregar por toda a vida em meus futuros trabalhos com esse mundo incrível da ciência que você me apresentou.

Agradeço ao Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, de modo geral, por me acolherem, por me ajudarem em inúmeras dificuldades, por sanarem as dúvidas e, principalmente, por acreditarem no projeto. Sem vocês, nada disso seria possível. Em especial à Priscila, Bellisa e Luana, obrigada por tanta paciência com meu início.

Não poderia deixar de agradecer à Fabíola, minha parceira de projeto, obrigada por estar comigo diariamente, por me auxiliar em tantas atividades, pela paciência e parceria. Você, sem nem saber, me acalmou em muitos dias aflitos. Te carregarei para o resto da vida! Estarei sempre torcendo por ti.

Agradeço aos meus amigos de curso, em especial aos que caminharam comigo até este fim: Kalebe, Mariana e Emily, que agora carrega em seu ventre meu mais novo amor, Francisco. Obrigada por terem sido minha família nessa cidade, vocês foram meu suporte, minha força para continuar. Em especial à Karina K. de Oliveira Nogueira, que foi meu ombro, meu conforto, minha luz e meu motivo de risadas em meio a tanto caos e correria. Dividir esse momento com você tornou tudo mais leve.

Deixo meu mais especial agradecimento às minhas avós, Carmen de Lourdes Fernandes Ranhel e Dionésia Ferro de Oliveira, as mulheres mais incríveis que já conheci na vida. Vocês são, sem dúvidas, responsáveis por minha trajetória até aqui. Obrigada por todas as orações, todas as velas acesas, todo carinho, amor e por cada comida gostosa que já me permitiram compartilhar com vocês.

Agradeço às minhas filhas de 4 patas, Olga e Alaska, que nunca lerão estes agradecimentos, mas tenho certeza que sentem todo meu amor e gratidão pela companhia nesta vida solitária que é estar longe da família.

Um agradecimento especial ao meu companheiro nesses 5 anos morando em Uberlândia, Marcus Vinícius de Deus Bernardes, que tanto me acolheu, me apoiou e incentivou. Independentemente de qual relação tenhamos, sempre carregarei gratidão a ti em meu coração, pois você foi meu alicerce nesta cidade. Obrigada pela companhia em muitas madrugadas de estudos e angústias, pelas caronas à faculdade, pelos abraços de conforto e por acreditar em mim, mais que qualquer outra pessoa.

Por fim, agradeço ao meu irmão, Marco Antônio Ranhel Oliveira, por também ser um exemplo de pessoa a ser seguido por mim.

Obrigada por tudo, a todos vocês. Amo cada um com todo meu coração.

*“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto
É realidade.”*

Raul Seixas

RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo parasito *Toxoplasma gondii* e representa um risco significativo em mulheres grávidas. A passagem transplacentária de taquizoítos pode resultar na toxoplasmose congênita, uma condição com potenciais implicações graves para o feto. Por outro lado, a estrongiloidíase, causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*, tem associada ao uso de corticosteroides, entre outros fatores, às complicações das síndromes de hiperinfecção e disseminação. A incidência das formas graves da estrongiloidíase durante o período gestacional permanece, em grande parte, desconhecida, uma vez que apenas relatos de casos isolados foram documentados na literatura. A prednisolona, um corticosteroide, possui efeitos de supressão da resposta inflamatória, porém, o uso durante a gravidez requer uma avaliação cuidadosa dos riscos potenciais para o feto. Diante deste cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar os estímulos do extrato salino de *S. venezuelensis* e da prednisolona em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) infectadas com *T. gondii* quanto à viabilidade celular e à proliferação do parasito. Como modelo de célula hospedeira, foi utilizado células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo). Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade do tratamento com o extrato salino de *S. venezuelensis* ou prednisolona em concentrações seriadas (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/ml) por meio do ensaio de MTT. Os resultados obtidos revelaram que as diferentes concentrações dos compostos não apresentaram toxicidade quando comparado com o controle. Posteriormente, avaliou-se o índice de replicação intracelular de *T. gondii* através do ensaio de proliferação, analisado pela reação de β-galactosidase. Neste ensaio, tratamos as células BeWo infectadas com *T. gondii* nas concentrações de 32, 8 e 2 µg/ml para ambos os estímulos. Além disso, realizamos a combinação dos dois estímulos nas mesmas concentrações. Constatou-se que a condição experimental com a combinação de prednisolona com o extrato salino de *S. venezuelensis*, na concentração de 32 µg/ml, resultou em uma significativa redução na taxa de proliferação intracelular do *T. gondii*, quando comparado com o grupo controle e entre as outras concentrações menores do estímulo conjunto. Assim, essas descobertas destacam o efeito conjunto da prednisolona e do extrato salino de *S. venezuelensis* em modelo da interface materno-fetal da toxoplasmose: a capacidade de reduzir a taxa de proliferação de *T. gondii*, possivelmente com efeitos na diminuição do risco da forma congênita, sem efeitos de citotoxicidade nas células hospedeiras.

Palavras-chave: Corticosteroides. Estrongiloidíase. *Strongyloides venezuelensis*. Toxoplasmose. Toxoplasmose congênita.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is an infection caused by the parasite *Toxoplasma gondii* and represents a significant risk in pregnant women. The transplacental passage of tachyzoites can result in congenital toxoplasmosis, a condition with potential serious implications for the fetus. On the other hand, strongyloidiasis, caused by the nematode *Strongyloides stercoralis*, is associated with the use of corticosteroids, among other factors, and can lead to complications such as hyperinfection and dissemination syndromes. The incidence of severe forms of strongyloidiasis during pregnancy remains largely unknown, and just isolated cases have been reported. Prednisolone, a corticosteroid, has effects on suppressing the inflammatory response; however, its use during pregnancy requires a careful evaluation of potential risks to the fetus. In this context, this study aimed to evaluate the effects of *S. venezuelensis* saline extract and prednisolone on human trophoblastic cells infected with *T. gondii* regarding cell viability and parasite proliferation. Human villous trophoblastic cells (BeWo lineage) were used as a host cell model. Initially, the cytotoxicity of treatment with *S. venezuelensis* saline extract or prednisolone at serial concentrations of 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, and 0.125 µg/ml was assessed using MTT assays. Different concentrations of the compounds exhibited no toxicity when compared to the control. Subsequently, the intracellular replication index of *T. gondii* was evaluated through a proliferation assay, analyzed by β-galactosidase reaction. In this assay, BeWo cells infected with *T. gondii* were treated with concentrations of 32, 8, and 2 µg/ml for both stimuli. Additionally, the combination of both stimuli was performed at the same concentrations. Remarkably, it was found treatment with prednisolone and *S. venezuelensis* saline extract combination at a concentration of 32 µg/ml resulted in a significant reduction in *T. gondii* intracellular proliferation rate when compared to untreated cells (control group) and to the other combined stimulus lower concentrations. Thus, these findings highlight the combined effect of prednisolone and *S. venezuelensis* saline extract in a maternal-fetal interface model of toxoplasmosis: the ability to reduce *T. gondii* proliferation rate, possibly with effects on decreasing the risk of the congenital form, without cytotoxic effects on host cells.

Keywords: Corticosteroids. Strongyloidiasis. *Strongyloides venezuelensis*. Toxoplasmosis. Congenital toxoplasmosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e a toxoplasmose.....	10
1.2 Toxoplasmose congênita: prevalência e sintomas	11
1.3 Linhagem de células trofoblásticas humana: BeWo	12
1.4 <i>Strongyloides stercoralis</i>: estrogiloidíase e sua relação com o uso de corticosteroides	13
1.5 Efeitos da prednisolona na infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Strongyloides stercoralis</i>	14
2. OBJETIVO.....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Fontes do extrato salino de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e da prednisolona	19
3.2 Cultura de células BeWo e <i>Toxoplasma gondii</i>	20
3.3 Ensaio de viabilidade celular	20
3.4 Ensaio de proliferação.....	21
3.5 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS	24
4.1 A prednisolona e o extrato salino de <i>Strongyloides venezuelensis</i> não reduziram a viabilidade das células BeWo	24
4.2 Extrato salino de <i>S. venezuelensis</i> em conjunto com a prednisolona em determinada concentração reduziram a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo.....	25
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii* e a toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infecção parasitária de ampla distribuição e representa um desafio significativo para a saúde pública em nível global. Esse parasito intracelular afeta vários órgãos e uma ampla gama de hospedeiros. Nos seres humanos, está associada a complicações graves, especialmente em pacientes imunocomprometidos e em fetos (AJZENBERG et al., 2009).

O parasito *Toxoplasma gondii* possui três estágios infectantes: bradizoítos, esporozoítos e taquizoítos. Os bradizoítos surgem na fase crônica da infecção e resultam da transformação dos taquizoítos devido, entre outros fatores, à pressão da resposta do sistema imunológico do hospedeiro. Nesse estágio de multiplicação mais lenta, eles são responsáveis pela formação de pseudocistos nos tecidos, principalmente cérebro e músculos. Tornam-se altamente resistentes tanto ao suco gástrico quanto ao sistema imunológico (BLADER & SAEJI, 2009).

A resistência dos bradizoítos ao suco gástrico é de importância significativa, uma vez que podem ser ingeridos juntamente com carnes cruas ou malcozidas de animais de caça ou criação infectados. Essa via de transmissão é uma das principais maneiras pelas quais os seres humanos podem adquirir a infecção por *T. gondii*, tornando-se um elo fundamental na cadeia epidemiológica da toxoplasmose (DUBEY & JONES, 2008). É importante ressaltar que, em casos de imunossupressão, pode haver reativação da infecção, levando à conversão dos bradizoítos de volta a taquizoítos. Isso pode ter implicações significativas na saúde do hospedeiro, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, onde a reativação da infecção pode resultar em manifestações clínicas graves (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

Os esporozoítos, encontrados no interior de estruturas resistentes denominadas de oocistos, são formados no trato intestinal do hospedeiro definitivo felino, como os gatos domésticos, e liberados nas fezes de forma imatura (BICHARA et al., 2014). No ambiente, os oocistos esporulam, tornando-se oocistos maduros, adquirindo resistência e durabilidade para sobreviver em condições adversas. Esses oocistos maduros podem ser ingeridos por hospedeiros intermediários, como roedores ou aves, quando entram em contato com o ambiente contaminado, completando assim o ciclo de infecção (ROVIRA-DIAZ et al., 2022).

Com a ingestão dos cistos ou oocistos, desencadeiam-se eventos altamente regulados que culminam na liberação de bradizoítos ou esporozoítos, marcando o início do ciclo de

infecção (FRANCO et al., 2011). Essas modificações são resultado de processos biológicos sofisticados, incluindo a regulação da expressão gênica e reorganização intracelular (ROBERT-GANGNEUX & DARDÉ, 2012). O parasito, uma vez no epitélio intestinal, entra em uma fase de reprodução rápida em que ocorrem múltiplas divisões celulares sucessivas, dando origem a um grande número de taquizoítos.

Esses taquizoítos, altamente invasivos e adaptados para a replicação eficiente, são fundamentais na disseminação do parasito pelo organismo. Eles têm a capacidade de invadir células hospedeiras, replicar-se e, subsequentemente, romper as células infectadas, permitindo-lhes adentrar a corrente sanguínea e invadir novos alvos. Esse ciclo de invasão contribui para a persistência e disseminação no hospedeiro. Pacientes com a forma aguda ou reativada da toxoplasmose podem transmitir taquizoítos via transplante de órgãos e tecidos, durante a amamentação e durante o período gestacional (ROJAS-PIRELA et al., 2021)

1.2 Toxoplasmose congênita: prevalência e sintomas

A toxoplasmose congênita é considerada uma das formas mais graves da doença. Ocorre devido à passagem transplacentária da forma taquizoíto do parasito durante a gestação. O parasito alcança a circulação e os tecidos fetais, podendo levar a complicações desde o feto até a idade adulta. É reconhecido que o risco de impacto no feto é influenciado por diversos fatores, como o estado imunológico e o genótipo da mãe, o genótipo e a virulência do parasito, bem como o estágio da gravidez em que a infecção ocorre (AJZENBERG et al., 2018).

A placenta desempenha um papel crucial, servindo como uma barreira natural que protege o feto contra a exposição de patógenos (CAPOBIANGO et al., 2016). A capacidade do *T. gondii* de cruzar a placenta pode ser influenciada por vários fatores, incluindo o estágio da gestação em que a infecção materna ocorre, o estado imunológico da mãe e o genótipo do parasito (DUBEY et al., 2010).

Durante o primeiro trimestre, o risco de infecção fetal é mais significativo, com possíveis consequências mais graves, como comprometimento do sistema nervoso central até o aborto (ARAUJO, 2011). Nesse período crítico, o trofoblasto, camada de células que reveste o embrião em desenvolvimento, desempenha um papel vital na proteção contra a infecção. Essa camada de células é dividida em citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto. O citotrofoblasto forma a camada exterior e é responsável por entrar em contato direto com a circulação materna, além de expressar moléculas de adesão que interagem com o *Toxoplasma gondii* e impedem sua invasão da placenta (FARAL-TELLO et al., 2023). Além disso, o sinciciotrofoblasto, camada

interior, modula a resposta imunológica na interface materno-fetal, controlando a inflamação e minimizando a resposta imune prejudicial ao feto (CARDOSO et al., 2019).

À medida que a gravidez avança, a resistência da placenta à infecção diminui e as chances de infecção congênita aumentam, o que pode resultar no comprometimento do sistema nervoso central e outras complicações graves (CHAUDHRY, GAD & KOREN, 2014). Por isso, durante o segundo trimestre de gestação, o trofoblasto mantém sua importância na proteção fetal contra a infecção por *T. gondii*. O citotrofoblasto apresenta proteínas de superfície que interagem com o parasito, enquanto isso, o sinciciotrofoblasto regula a resposta imunológica no ambiente intrauterino, ao contribuir para a modulação da inflamação, minimizando o risco de lesões no feto (ALMEIDA et al., 2019).

No terceiro trimestre, o sistema imunológico do feto não está completamente desenvolvido, tornando-o mais vulnerável à infecção, uma vez que o parasito pode invadir o ambiente intrauterino e causar danos diretos ao feto. Dentre os danos graves causados pela infecção do *T. gondii* no terceiro semestre gestação, estão lesões no sistema nervoso central, retardo no crescimento fetal, coriorretinite, hidrocefalia, microcefalia e até mesmo o óbito fetal (HOLEC-GASIOR; SLOWINSKA, 2023). Portanto, a infecção por *Toxoplasma gondii* representa um risco real ao bem-estar do feto, exigindo vigilância rigorosa, diagnóstico precoce e tratamento adequado para minimizar os impactos adversos dessa infecção (BRASIL, 2012; SES-SC, 2022).

1.3 Linhagem de células trofoblásticas humana: BeWo

O trofoblasto, uma célula de origem fetal, desempenha diversas funções cruciais para o êxito da gestação. Sua responsabilidade inclui a adesão e invasão do blastocisto no endométrio receptivo, a nutrição do embrião e a formação da porção fetal da placenta (FITZGERALD et al., 2008). Além disso, o trofoblasto desempenha um papel ativo no diálogo na interface materno-fetal, por meio da produção de citocinas e mediadores químicos (CHALLIS et al., 2009; BARBOSA et al., 2014).

Para uma compreensão mais aprofundada do papel do trofoblasto no ambiente materno-fetal, especialmente na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*, diversos estudos *in vitro* têm sido conduzidos utilizando linhagens celulares pré-estabelecidas. Nesse contexto, este estudo adotou células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) como modelo para a investigação do trofoblasto humano, quando infectado pelo *T. gondii*. Essas células, isoladas em 1968 por Pattillo e Gey, mantêm características típicas do trofoblasto humano ao secretar

hormônios como gonadotrofina coriônica humana (Hcg), hormônio lactogênico placentário (hpl), progesterona e estradiol (WOLFE,2006).

1.4 *Strongyloides stercoralis*: estrogiloidíase e sua relação com o uso de corticosteroides

A estrogiloidíase humana é uma infecção parasitária causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*. A prevalência mundial em 2017 foi estimada em cerca de 600 milhões de pessoas infectadas (BUONFRATE et al., 2020). A Organização Mundial da Saúde, com base nisso, inclui o controle de *S. stercoralis* como objetivo *Neglected Tropical Diseases Roadmap to 2030*.

A transmissão para os seres humanos ocorre por meio da penetração das larvas infectantes L3 através da pele após o contato direto com o solo contaminado (BISOFFI et al., 2013). Uma vez dentro do hospedeiro, as larvas migram pelo sistema circulatório, alcançam os pulmões e sofrem uma muda, transformando-se em larvas L4. Em seguida, essas larvas L4 são transportadas até a faringe e deglutidas, retornando para o trato gastrointestinal, onde se desenvolvem em fêmeas adultas no intestino delgado. A peculiaridade do *S. stercoralis* reside na sua capacidade de autoinfecção, em que larvas resultantes dos ovos liberados pelas fêmeas adultas podem se desenvolver em larvas infectantes e seguir o ciclo autoinfeccioso interno – penetração da mucosa intestinal – ou externo – retornando à pele, mantendo ciclo. As larvas filarioides L3 são distintas dos demais estágios larvais devido às suas características morfológicas e comportamentais únicas (BUONFRATE et al., 2020).

Para fins de pesquisa relacionados à estrogiloidíase humana, o *Strongyloides venezuelensis*, uma espécie do mesmo gênero que parasita roedores, é frequentemente empregado. Isso se deve à semelhança em sua biologia e composição antigênica com o *S. stercoralis*, tornando-o uma fonte valiosa de antígenos para ensaios diagnósticos e experimentos destinados a aprofundar o entendimento dessa parasitose (COUTO et al., 2020). O extrato salino de *S. venezuelensis* é uma preparação essencial utilizada em estudos parasitológicos e pesquisas relacionadas a esse gênero de nematódeos parasitos (GONZAGA et al., 2011). Esse extrato é obtido a partir da cultura das fezes de animais experimentalmente infectados, seguida da coleta das larvas do terceiro estágio (L3) do parasito (NIMISATO et al., 2004).

Um tópico de crescente interesse na pesquisa sobre estrogiloidíase é a relação entre o uso de corticosteroides e a gravidade da infecção. Pacientes expostos a corticosteroides, como

a dexametasona (SILVA, 2012) e prednisolona (NIMISATO et al., 2004) podem desenvolver uma forma mais grave e disseminada da infecção. Isso ocorre devido à inibição da resposta imunológica do hospedeiro causada pelos corticosteroides, tornando-o mais suscetível às complicações associadas às síndromes de hiperinfecção (aumento do trânsito de larvas entre os sítios usuais do ciclo) e disseminação do parasito (migração das larvas do intestino para órgãos fora do ciclo) (BUONFRATE et al., 2015). Em alguns casos, a disseminação das larvas pode ocorrer em menos de 10 dias de tratamento com altas doses de corticosteroides. Portanto, é de suma importância identificar e tratar a estrogiloidíase em pacientes de áreas endêmicas para *Strongyloides* antes de iniciar qualquer terapia imunossupressora (KLEIN, GO & CUNHA, 2001).

Existem poucos estudos que abordam a prevalência da estrogiloidíase durante a gravidez. A literatura atual se limita a relatos de casos isolados e a incidência de formas graves da doença durante o período gestacional permanece desconhecida. No entanto, mesmo com dados escassos, a infecção por esse helminto tem sido associada a deficiências no desenvolvimento fetal e anemia em gestantes. Além disso, casos de hiperinfecção e disseminação podem levar à morte tanto da mãe quanto do neonato. É importante notar que medicamentos frequentemente utilizados durante a gravidez, como corticosteroides para indução do trabalho de parto prematuro, podem potencialmente agravar a condição (WIKMAN-JORGENSEN, REQUENA-MÉNDEZ & LLENAS-GARCÍA, 2021).

Para preencher as lacunas no conhecimento científico sobre essa doença durante a gravidez, são necessários estudos *in vitro*, como nos modelos de experimentação na interface materno fetal. Tais pesquisas poderão gerar dados que, por sua vez, servirão de base para diretrizes de cuidados baseadas em evidências em relação às gestantes afetadas por *Strongyloides*, um grupo de pacientes que, até então, tem sido negligenciado.

1.5 Efeitos da prednisolona na infecção por *Toxoplasma gondii* e *Strongyloides stercoralis*

A prednisolona pertence ao grupo de medicamentos denominados corticosteroides e é amplamente empregada no tratamento de diversas condições médicas, especialmente aquelas associadas aos processos inflamatórios e imunológicos. O mecanismo de ação deste corticosteroide envolve a inibição de múltiplas etapas da resposta, o que inclui a redução da liberação de células do sistema imunológico para áreas inflamadas do organismo.

Adicionalmente, a prednisolona desempenha um papel significativo na regulação da expressão de genes e no controle da produção de anticorpos (RHEN & CIDLOWSKI, 2005).

A terapia convencional para a toxoplasmose geralmente envolve medicamentos como a pirimetamina e sulfadiazina (ARRANZ-SOLÍS et al., 2020). No entanto esses medicamentos podem causar efeitos colaterais significativos e nem sempre são bem tolerados pelos pacientes. Portanto, a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras é de extrema importância; nesse âmbito, destacam-se regimes que incluem os corticosteroides, como na toxoplasmose ocular.

A ‘terapia clássica’ para a toxoplasmose ocular compreende uma combinação de pirimetamina, sulfadiazina e prednisolona (aplicações tópicas e administração sistêmica (NATH et al., 2009). Na verdade, ainda é controverso se, quando e como os corticosteroides devem ser usados para tratar a toxoplasmose ocular (JAFARI et al., 2023). Questionamentos acerca do aumento da eficácia de corticosteroides como agente adjuvante, em comparação com o uso isolado na terapia antiparasitária; se devem ser administrados precocemente ou em período tardio; e qual o regime de doses e duração do uso, permanecem abertos (JASPER et al., 2017). Deve-se considerar o uso de outros antimicrobianos, como clindamicina e azitromicina, especialmente na toxoplasmose ocular gestacional.

Embora raramente relacionada com a transmissão congênita, as lesões oculares têm risco elevado de reativação durante a gestação. As diretrizes são vagas quanto aos regimes mais adequados para o tratamento da toxoplasmose ocular, assim ainda há dúvida na escolha de uma estratégia de tratamento apropriada para pacientes grávidas (NATH et al., 2009). Mulheres grávidas com infecção aguda confirmada em conjunto com retinite aguda devem ser tratadas, em regimes incluindo os corticosteroides, para as lesões oculares e para prevenir a transmissão vertical. Mulheres grávidas com infecção crônica por *T. gondii* adquirida antes da gestação e retinite concomitante por reativação devem ser tratadas para a retinite e monitoradas para transmissão vertical (CORTÉS et al., 2019).

A prednisolona desempenha ainda um papel complementar em situações específicas da toxoplasmose, como quando há envolvimento do sistema nervoso central ou manifestações inflamatórias significativas. Sua aplicação tem como objetivo reduzir a resposta inflamatória e imunológica exacerbada associada à infecção, aliviando sintomas neurológicos e minimizando danos ao sistema nervoso central. Sua administração em combinação com os medicamentos antiparasitários pode ser uma estratégia eficaz (SILVA et al., 2021).

O uso de corticosteroides em animais infectados experimentalmente com *T. gondii* resultou na morte da maioria dos casos agudos e os infectados cronicamente reativaram a

infecção (HEGAB & AL-MUTAWA, 2003). Em estudo com camundongos fêmeas com toxoplasmose crônica, tratadas com acetato de cortisona, houve indução da transmissão congênita de *T. gondii* (CHINCHILLA et al., 1992). Além disso, a prednisolona já foi utilizada para imunossuprimir camundongos, antes da infecção por *T. gondii*, e auxiliar na propagação de cepas (PUVANESUARAN et al., 2012).

Em humanos, há relato descrevendo toxoplasmose congênita recorrente – em mais de uma gestação – em gestante com sistema imunológico comprometido por lúpus, esplenectomia e corticoterapia com prednisolona (D'ERCOLE et al., 1995). Assim, mesmo quando a infecção prévia à gestação é confirmada, deve-se orientar a gestante em relação às medidas de prevenção primárias da toxoplasmose, mesmo os guias afirmando ser baixo o risco de transmissão para o feto. É possível haver reinfecção materna com genótipos diferentes de *T. gondii* e, no caso de gestantes imunossuprimidas, há o risco suplementar de uma possível reativação e é possível haver transmissão na interface materno-fetal (SES-SC, 2022; BRASIL, 2012).

A prednisolona é frequentemente prescrita para tratar condições inflamatórias, alérgicas e autoimunes em mulheres grávidas. Sua capacidade de suprimir a resposta imunológica pode ser benéfica no tratamento de doenças e na prevenção de rejeição de transplantes de órgãos. A exposição fetal à prednisolona não é isenta de preocupações. O uso crônico de corticosteroides durante a gravidez pode aumentar o risco de complicações, incluindo parto prematuro, restrições de crescimento fetal e baixo peso ao nascer (LEVY, 2005). Portanto, a decisão do uso da prednisolona durante a gestação deve ser feita de forma individualizada, pesando os benefícios potenciais no controle de doenças maternas contra os possíveis riscos para o desenvolvimento fetal. C

Na estrogiloidíase, os corticosteroides ao serem metabolizados, aumentam as substâncias semelhantes a ecdisteróides, que atuam como sinais de ecdise das larvas e, conseqüentemente ao aumento dos estádios infectantes e da carga parasitária (VADLAMUDI et al., 2006). Os estudos em modelos experimentais murinos, como o de Couto et al. (2020), com *Strongyloides* com os medicamentos imunossupressores trazem evidências da ação da prednisolona na alteração de parâmetros parasitológicos – aumento da eliminação de ovos e do número de fêmeas recuperadas do intestino – e imunológicos – não aumento da produção de IgG subclasses pós imunossupressão por via subcutânea. Na população humana, uma revisão sobre estrogiloidíase grave concluiu que 67% dos casos ocorreram em pacientes em uso de corticosteroide, com taxa de mortalidade de cerca de 63%; no entanto, o estudo não foi capaz de relatar a dosagem cumulativa e o duração do tratamento com corticosteroides (BUONFRATE et al., 2013). A administração de ivermectina – o anti-helmíntico de escolha -

representa uma abordagem, custo-efetiva em pacientes com alto risco de estrogiloidíase (MALPICA; MOLL, 2020) – por exemplo, como os habitantes de áreas hiperendêmicas e endêmicas em uso de corticosteroides.

Os estudos com toxoplasmose e estrogiloidíase são escassos. Infecções por *S. stercoralis* e *T. gondii* coexistem em hospedeiros, particularmente em locais pobres e com recursos limitados, como em pacientes com HIV na Índia, mas a coinfeção dupla causada é raramente relatada (SRIVASTAVA et al., 2022). Em modelo experimental murino, observou-se que o tratamento com antígenos de *S. venezuelensis* aumentou as taxas de sobrevivência, reduziu a carga parasitária nos pulmões e intestino e teve papel anti-inflamatório em camundongos infectados por *T. gondii* (ARAUJO et al., 2021). Não se tem registro na literatura de ensaios que envolvam a prednisolona em contextos de coestímulos ou coinfeções de *T. gondii* e *Strongyloides* sp. em modelos da interface materno-fetal. O presente trabalho justifica-se pelos dados em modelo experimental que contribuam no entendimento da interface materno fetal, frente ao estímulo de antígenos de *S. venezuelensis* a prednisolona e infecção por *T. gondii*. Tal cenário mais complexo certamente é comum nas regiões endêmicas dos parasitos.

2. OBJETIVO

Avaliar os estímulos do extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e do corticosteroide prednisolona durante a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo).

2.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do extrato salino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* e da prednisolona na viabilidade celular de células BeWo.

Avaliar o efeito do extrato salino de *S. venezuelensis*, da prednisolona e da combinação do extrato com o corticosteroide na proliferação de *T. gondii* em células BeWo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fontes do extrato salino de *Strongyloides venezuelensis* e da prednisolona

O extrato salino de *Strongyloides venezuelensis* utilizado neste estudo foi obtido a partir da manutenção experimental da espécie em ratos (Protocolo CEUA 075-2008). O laboratório de Diagnóstico de Parasitoses (LADIPAR), do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) dispõe de estoque de larvas e extrato salino. O extrato salino foi obtido conforme o protocolo descrito por Gonzaga e colaboradores (2011). Para a realização dos experimentos foi utilizado um único lote, filtrado em dupla membrana para remover bactérias contaminantes.

A concentração proteica do extrato salino de *S. venezuelensis*, após a filtração, foi feita pelo método de Lowry e colaboradores (1951), modificado para microplacas. Uma curva padrão foi construída, utilizando albumina sérica bovina (BSA), nas concentrações de 500 a 15,62 µg/ml em diluição dupla seriada. Além disso, quatro soluções são preparadas: a solução A consiste em sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 1% em água destilada; a solução B é constituída de tartarato de sódio e potássio a 2% em água destilada; a solução C é uma mistura de carbonato de sódio a 2% em hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M; e, por fim, a solução D, que é o Reativo de Folin-Ciocalteu (comercial) puro (LOWRY et al., 1951). O procedimento consiste na preparação de uma mistura de amostra, com a adição de 40 µl da amostra, após a devida diluição em solução salina tamponada com fosfato (PBS), 200 µl da mistura 1, composta por volumes iguais de soluções A e B, e 100 vezes o volume da solução C, e a incubação da mistura 2, que consiste na diluição da solução D em água destilada na proporção de 1:2, são adicionadas a cada tubo, e a incubação é prolongada por mais 30 minutos a temperatura ambiente. O volume final é de 260 µl, dos quais 250 µl são aplicados em uma microplaca por poço, lida em um espectrofotômetro a 660 nm (Leitora BioTek, 800 TS) (Winooski, Vermont, EUA). Utilizando um software adequado, como o Microplate Manager 4.0, uma curva de regressão linear é construída com base nos dados da curva padrão com BSA, permitindo a determinação da concentração da proteína nas amostras-teste, expressa em µg/ml.

A prednisolona utilizada neste experimento foi adquirida comercialmente na forma de fosfato sódico de prednisolona (11 mg/ml; Lote 827572, F: 12/2022, V. 12/2024 Eurofarma, Brasil).

3.2 Cultura de células BeWo e *Toxoplasma gondii*

Células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) foram adquiridas do “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, ICBIM, UFU.

O meio de cultivo utilizado para as células BeWo foi preparado de acordo com o protocolo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Cultilab, SP, Brasil) e suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) e antibióticos (10.000U/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina).

As células BeWo foram descongeladas e submetidas a lavagem e ressuspensão, semeadas em frascos de cultura estéreis de 25cm² ou 75cm² contendo o meio de cultivo preparado com RPMI, SFB e antibióticos. Após isso, os frascos foram incubados em uma estufa de cultura a 37°C e 5% de CO₂ para permitir o crescimento das células. O meio de cultivo foi trocado a cada 24 horas para manter a viabilidade celular.

Taquizoítos da cepa RH (clone 2F1) de *T. gondii*, expressando a enzima β-galactosidase, foram mantidos nas células BeWo cultivadas em meio RPMI 2% SFB a 37°C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2014).

De acordo com o Comunicado N°13/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFU (CEP) declarou que projetos de pesquisa que envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para avaliar o efeito do extrato salino de *S. venezuelensis* e da prednisolona nas células BeWo infectadas por *Toxoplasma gondii*, seguindo o protocolo de Mosmann (1983). Este ensaio é baseado na conversão do sal de tetrazólio, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em formazan, insolúvel por mitocôndrias celulares viáveis.

As células BeWo foram semeadas em placas de cultura contendo 96 poços na densidade de 3x10⁴ células por poço, e acrescido 200 µl de meio RPMI 10% SFB. Após 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, as células foram tratadas em diluição seriada (1:2) com concentrações decrescentes de extrato salino de *S. venezuelensis* ou prednisolona (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/ml) durante 24 horas. Como controle de viabilidade, células BeWo foram tratadas somente com meio RPMI 10% SFB.

Após 24 horas de tratamento, as células foram incubadas com 10 µL de MTT (5mg/ml) acrescido de 90 µL de meio RPMI 10% SFB em estufa durante 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de solução contendo SDS 10% e N, N-dimetil formamida 50% (MOSMANN, 1983).

A absorbância foi medida, após 30 minutos de incubação, através da leitura da densidade óptica (DO) em um leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) a comprimento de onda de 570 nm.

3.4 Ensaio de proliferação

O ensaio de proliferação foi realizado para avaliar a capacidade de proliferação do *T. gondii* após o tratamento com o extrato salino de *S. venezuelensis*, a prednisolona e a combinação dos dois estímulos. Este ensaio é baseado na expressão do gene B-galactosidase (Bgal), que é um marcador de proliferação celular no parasito modificado. Células BeWo (3×10^4 células/poço) foram plaqueadas em 200 µL de meio RPMI 10% SFB em placas de cultura de 96 poços.

Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, na proporção de 3 parasitos por célula (3:1), em meio RPMI 10% SFB. Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas com meio de cultura incompleto (sem SFB), para remoção dos parasitos extracelulares, e tratadas ou não em diluição seriada (1:2) com concentrações não citotóxicas do extrato salino de *S. venezuelensis*, prednisolona e a combinação dos dois tratamentos durante 24 horas.

Adicionalmente, células BeWo infectadas também foram tratadas com sulfadiazina (SDZ) + pirimetamina (PIR; 200+8 µg/ml, respectivamente). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de β-galactosidase. O ensaio se baseia na clivagem do substrato clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo (CPRG) pela enzima β-galactosidase, levando a formação de galactose e do cromóforo vermelho de clorofenol, de coloração avermelhada, que é detectável por espectrofotometria a 570 nm (TONINI & STEIDEL, 2013).

Após as 24 horas de tratamento, as placas foram centrifugadas e, em seguida, foi adicionado 100 µL de tampão de lise RIPA por poço [50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7.5] por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 160 µL de tampão de

ensaio (100mM de tampão fosfato, pH 7,3, 102mM de β -mercaptoetanol, 9mM de $MgCl_2$) e 40 μ L do substrato CPRG (Roche, EUA).

Por fim, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, a atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada pela DO a 570 nm usando leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLan, EUA).

A proliferação intracelular de *T. gondii* (número de taquizoítos) foi obtida de acordo com uma curva de referência contendo taquizoítos livres (de 1×10^6 a $15,625 \times 10^3$). Os dados foram expressos como número de parasitos. A DO da condição experimental foi subtraída do branco e utilizada na curva de referência.

Para representar o ensaio de proliferação foi feito o experimento em lamínulas para posterior coloração e obtenção das imagens. Lamínulas de microscopia foram preparadas previamente, submetendo-as à esterilização por exposição à luz ultravioleta. O procedimento foi iniciado com o cultivo das células BeWo em meio de cultura, conforme citado, permitindo que elas atingissem a densidade desejada para análise. Após o a realização do experimento, em condições semelhantes às descritas, as células foram fixadas com uma solução de formaldeído a 4% por 2 horas, para preservar a estrutura celular. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS para remover os resíduos de meio de cultura e fixador. Em seguida, o azul de toluidina a 0,1% em PBS foi adicionado às células e, após a coloração, as células foram lavadas suavemente com PBS para remover o excesso do corante. Finalmente, as lamínulas com as células coradas foram montadas em lâminas de vidro usando uma solução de Entellan. O exame microscópico subsequente permitiu a visualização e a obtenção das imagens. Todas as imagens foram obtidas através do Scanscope AT, em aumento de 60 un.

3.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com teste de identificação de *outliers* pelo método de ROUT, para todos os possíveis valores, com $Q=10\%$. Posteriormente, foram submetidos ao teste de verificação de distribuição normal. Quando paramétricos, foram posteriormente analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido de testes t com correção de Bonferroni-Holm. As condições comparadas foram: a) prednisolona isolada, b) extrato salino de *S. venezuelensis* isolado, c) combinação dos dois estímulos e d) estímulos nas concentrações de 32, 8 ou 2 μ g/ml e os respectivos controles. A comparação entre a condição controle negativa e o controle positivo foi feita pelo teste t. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão

(SD). A análises foram feitas no programa GraphPad Prism[®] Version 8 (GraphPad Software, Inc., EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 A prednisolona e o extrato salino de *Strongyloides venezuelensis* não reduziram a viabilidade das células BeWo

O ensaio de viabilidade celular (MTT) foi conduzido com o propósito de avaliar a potencial citotoxicidade associadas ao uso da prednisolona e do extrato salino de *S. venezuelensis* em células da linhagem BeWo, em uma ampla gama de concentrações (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 $\mu\text{g/ml}$). Observou-se que, em todas as concentrações testadas, ambos os estímulos não demonstraram qualquer diferença significativa na viabilidade das células BeWo em comparação com o grupo controle, constituído pelas células não tratadas (Figura 1).

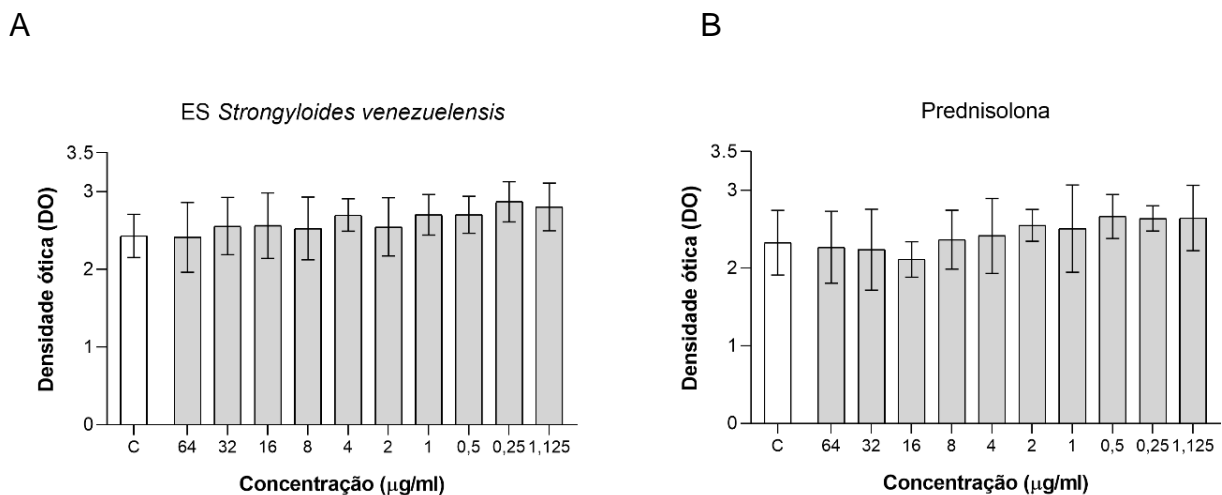


Figura 1. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células BeWo tratadas com extrato salino (ES) de *Strongyloides venezuelensis* e prednisolona. Células BeWo foram tratadas por 24 horas em diluições seriadas (variando de 64 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$) com A) ES de *S. venezuelensis* e B) prednisolona. Em relação ao controle experimental, meio a 10% foi adicionado às células BeWo. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Comparação entre células não tratadas (controle) e células tratadas feita por One-way ANOVA. Os dados são expressos em densidade óptica (OD).

4.2 Extrato salino de *S. venezuelensis* em conjunto com a prednisolona em determinada concentração reduziram a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo

Células da linhagem BeWo foram submetidas à infecção e, após 3 horas, foram tratadas por um período adicional de 24 horas, com as soluções de extrato salino de *S. venezuelensis*, prednisolona e uma combinação dos dois estímulos, nas concentrações de 32, 8 e 2 µg/ml (Figura 2). A avaliação da taxa de proliferação do parasito *T. gondii* foi efetuada por meio da quantificação da atividade da enzima β-galactosidase. A combinação sulfadiazina + pirimetamina (SP; 200 + 8 µg/ml, respectivamente) destinada ao tratamento da toxoplasmose congênita, utilizada como controle positivo, reduziu a replicação do parasito em comparação com o grupo controle negativo. Constatou-se que o tratamento com a combinação de prednisolona com o ES de *S. venezuelensis*, na concentração de 32 µg/ml, resultou em uma significativa redução na taxa de proliferação intracelular do *T. gondii* quando comparado com as células não tratadas (grupo controle) e entre as outras concentrações menores do estímulo conjunto (8 e 2 µg/ml). A figura 3 apresenta imagens representativas do ensaio nas condições controle e da concentração 32 µg/ml. No controle negativo é possível observar grande número de parasitos nos vacúolos parasitóforos, apontados por setas. No tratamento com SP e tratamento com a combinação de prednisolona com o ES de *S. venezuelensis*, na concentração de 32 µg/ml, observamos uma redução no número de parasitos.

Por outro lado, os resultados obtidos revelaram que o tratamento com o extrato salino de *S. venezuelensis* e a prednisolona de forma isolada, bem como a combinação de ambos, nas demais concentrações (8 e 2 µg/ml), não diminuíram a proliferação intracelular do *T. gondii* nas concentrações analisadas (32, 8 e 2 µg/ml).

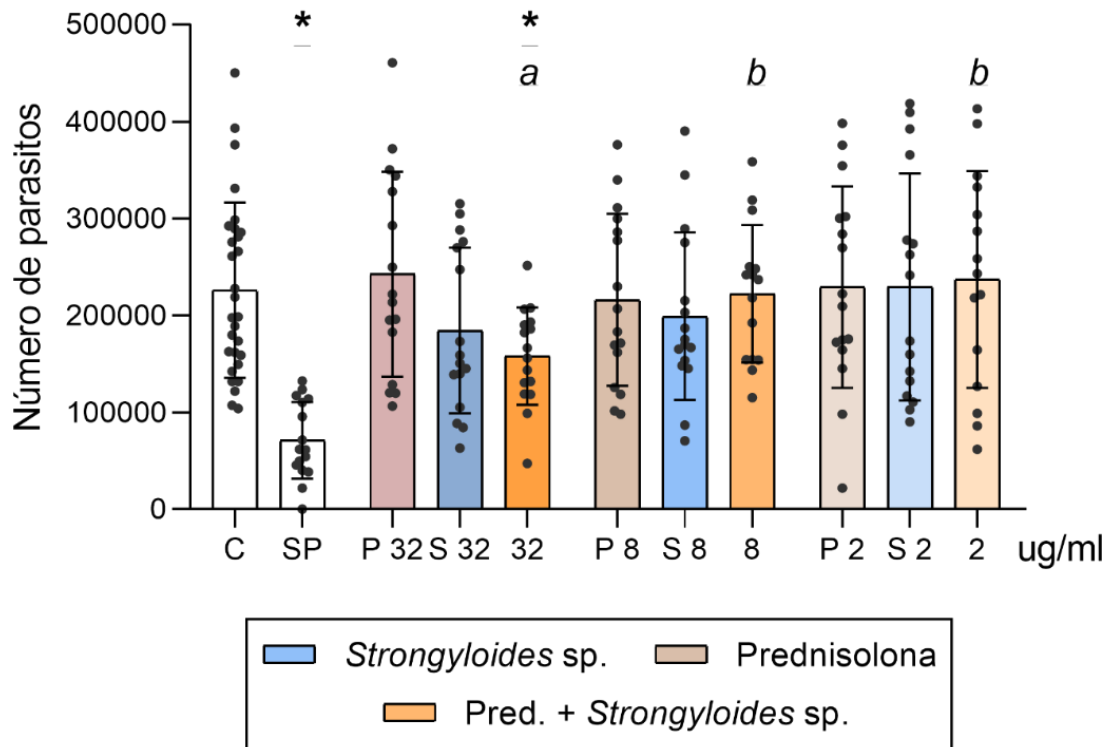


Figura 2. Proliferação de *Toxoplasma gondii*: quantificação de taquizoítos intracelulares pela reação enzimática da atividade da β -galactosidase. Células BeWo infectadas por *T. gondii* foram tratadas por 24 horas com extrato salino de *Strongyloides venezuelensis* (S), prednisolona (P) e com a combinação de ambos os tratamentos, em concentrações de 32, 8 e 2 $\mu\text{g/ml}$. Com relação aos controles experimentais, células BeWo infectadas foram tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle negativo) e com a combinação sulfadiazina + pirimetamina (SP; 200+8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. *Comparação dos grupos com o controle negativo, com diferença significativa das médias. Letras diferentes (a, b) representam diferenças entre as concentrações nas comparações das concentrações do mesmo estímulo. Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla t de Student com correção de Bonferroni-Holm. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

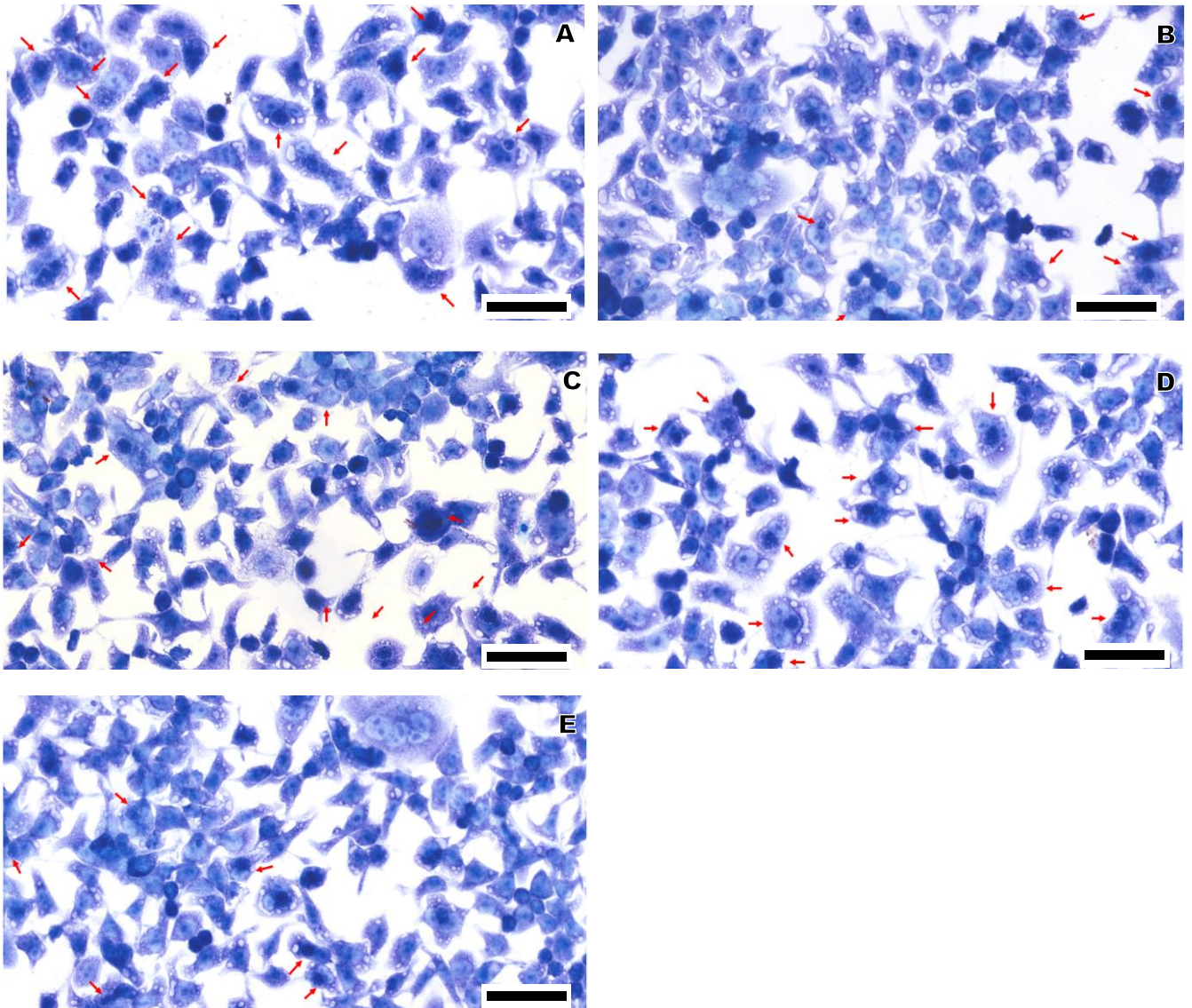


Figura 3. Ensaio de proliferação de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas BeWo. **A.** Controle negativo, não tratadas. **B.** Tratadas com a combinação de SDZ+PIR na concentração de 200+8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. **C.** Tratadas com prednisolona na concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$. **D.** Tratadas com extrato salino (ES) de *Strongyloides venezuelensis* na concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$. **E.** Tratadas com a combinação de prednisolona e ES de *S. venezuelensis*, ambos na concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$. Vacúolos parasitóforos apontados pelas setas (\rightarrow). Fotomicrografias ilustrativa da colorimetria de lâminulas com azul de toluidina. Detalhes do experimento na seção de Material e Métodos. Escala da barra – 60 μm .

5. DISCUSSÃO

Pacientes imunossuprimidos, devido ao comprometimento do sistema imunológico, estão suscetíveis a uma variedade de infecções por fungos, protozoários e helmintos que apresentam sérios desafios clínicos. Isso inclui patógenos como *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii* e *Strongyloides stercoralis* (KLEIN, GO & CUNHA, 2001). A toxoplasmose congênita representa uma das manifestações mais graves da infecção provocada pelo parasito *T. gondii* (CARLIER et al., 2012). A transmissão vertical deste parasito pode resultar em eventos adversos como aborto espontâneos e complicações graves para o feto, incluindo malformações, distúrbios neurológicos e oculares (OLARIU et al., 2011; KIEFFER & WALLON, 2013). A estrongiloidíase, no mesmo contexto, pode persistir de forma assintomática por longos períodos, mas em indivíduos com o sistema imunológico comprometido, a infecção pode se disseminar, ao ter dispersão de larvas para sítios não usuais do ciclo ou causar a síndrome da hiperinfecção, caracterizada por uma replicação maciça do parasito *S. stercoralis*, resultando em uma carga parasitária elevada nos pulmões e no trato gastrointestinal (BISOFFI et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2022).

A resposta imune contra *T. gondii* é predominantemente de natureza celular, já a resposta contra *S. venezuelensis* é de ordem humoral, especialmente com a produção de anticorpos. Conforme destacado por Lannes-Vieira (2014), é importante observar que tal resposta não é capaz de erradicar completamente o parasitismo, com a formação de pseudocistos teciduais na toxoplasmose e com a persistência, possivelmente, durante toda a vida do indivíduo, pelos mecanismos de autoinfecção, na estrongiloidíase. Consequentemente, em situações específicas – como em pacientes imunocomprometidos e gestantes infectadas – o uso de medicamentos se torna essencial para controlar as infecções. No entanto é crucial reconhecer que o uso de corticosteroides durante a gravidez está associado a uma série de riscos para o feto, incluindo o retardo no crescimento intrauterino, malformações congênitas, prematuridade e até mesmo riscos e danos à mãe (LI et al., 2014).

Neste sentido, o presente estudo investigou os estímulos do corticoesteróide prednisolona e do extrato salino de *Strongyloides venezuelensis* nas células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) infectadas por *Toxoplasma gondii*. Para investigar o impacto da prednisolona e do extrato salino de *S. venezuelensis*, inicialmente, verificamos a viabilidade das células tratadas com diferentes concentrações. Para tal propósito, empregou-se o ensaio de MTT, a fim de identificar concentrações que não causassem alterações significativas na viabilidade das células. As concentrações empregadas foram diversas, uma vez que a literatura

não tem padronizada uma referência; assim, optamos por testar uma amplitude considerável de concentrações. Os resultados obtidos revelaram que as células submetidas ao tratamento não manifestaram modificações significativas em sua viabilidade. Considerando a não toxicidade dos estímulos, seguimos com os experimentos.

Procedemos ao tratamento das células BeWo previamente infectadas com *T. gondii*, realizando um período de exposição de 24 horas a diferentes concentrações de prednisolona e extrato salino de *S. venezuelensis*. Em virtude do teste de MTT não ter demonstrado alteração na viabilidade celular em nenhuma concentração testada, escolhemos três delas para a realização do teste de proliferação, uma mais alta, uma mediana e uma mais baixa. Durante a análise, observou-se que a combinação entre a prednisolona e o extrato salino de *S. venezuelensis* demonstrou diminuição do número de parasitos em comparação ao controle, embora não tenha ocorrido redução semelhante à obtida com o tratamento utilizando sulfadiazina e pirimetamina.

Primeiramente, os estudos envolvendo a combinação de coinfeção/estímulos entre *T. gondii*, helmintos e corticosteroides são escassos. Em estudo com células HeLa, a betametasona aumentou a proliferação de taquizoítos, com mais interferência na viabilidade celular após a adição da substância à cultura infectada. Enquanto a betametasona isolada não teve efeito na estrutura da cultura celular não infectada (GHAFARIFAR et al., 2006). Os mecanismos subjacentes a essas variações devem ser investigados, assim como no nosso modelo, e a resposta a diferentes corticosteroides devem ser exploradas em maior detalhamento.

O estudo realizado por Araújo e colaboradores (2020) revelou importantes descobertas no contexto da interação entre os antígenos de larvas de *S. venezuelensis* e a infecção por *T. gondii*, utilizando um modelo experimental murino. Os pesquisadores observaram uma significativa redução nos índices de parasitismo nos pulmões e intestino delgado, bem como uma diminuição nas lesões inflamatórias no intestino delgado, quando o extrato salino de *S. venezuelensis* foi administrado após a infecção por *T. gondii*. Além disso, os níveis intestinais e séricos de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e IL-6, apresentaram redução, sugerindo um efeito modulador do extrato salino nessas respostas imunológicas. No entanto, ao considerar os resultados obtidos a partir do nosso modelo *in vitro* de infecção congênita, notou-se uma diferença marcante: contrariamente à redução do parasitismo observada no estudo *in vivo*, os resultados do modelo *in vitro* não indicaram uma diminuição do parasitismo nas células trofoblásticas pós-estímulo com antígenos de *S. venezuelensis*. Essa discrepância ressalta a complexidade da interação entre o helminto e o protozoário, evidenciando que as condições experimentais podem influenciar significativamente os resultados. A elucidação dos

mecanismos subjacentes a essas interações em diversos cenários é crucial para uma compreensão abrangente das respostas na estrogiloidíase e suas implicações potenciais na infecção por *T. gondii*. Portanto, propõe-se que futuras investigações se concentrem na caracterização mais detalhada dessas interações.

É relevante salientar que tanto o extrato salino quanto a prednisolona, isoladamente ou em conjugação e em concentrações menores, não apresentaram uma diminuição significativa no controle da proliferação intracelular dos parasitos, quando comparados aos demais tratamentos. Este resultado suscita reflexões sobre o controle da infecção por *T. gondii*, um protozoário parasitário intracelular obrigatório com a capacidade intrínseca de infectar uma ampla variedade de células nucleadas (DUBEY et al., 2012). A habilidade de *T. gondii* em invadir e proliferar dentro das células hospedeiras é essencial para o estabelecimento da infecção no hospedeiro, uma vez que sua sobrevivência e disseminação dependem desses processos. Surge, assim, uma indagação fundamental: quais são os estímulos e as vias de sinalização que podem ser afetados pelos tratamentos com prednisolona e o extrato salino de *S. venezuelensis* nas células trofoblásticas infectadas por *T. gondii*? O que torna essa questão particularmente relevante é a potencial aplicação clínica desses tratamentos, especialmente em gestantes e pacientes imunocomprometidos, onde o controle da infecção pelo *T. gondii* é crucial para evitar complicações graves, como a toxoplasmose congênita e as síndromes graves da estrogiloidíase.

Outro ponto importante a ser considerado é a necessidade de traduzir esses achados em modelos animais e, eventualmente, em ensaios clínicos em pacientes humanos. Embora o estudo conduzido por Silva (2012) não tenha relatado mortalidade ou alterações comportamentais significativas em ratos Wistar infectados por *S. venezuelensis* e tratados com dexametasona, a extrapolação desses resultados para a prática clínica em seres humanos requer cautela. Couto e colaboradores (2020) observaram diferenças nos parâmetros parasitológicos e na resposta de anticorpos na infecção por *S. venezuelensis* de acordo com a via de administração da prednisolona em ratos infectados experimentalmente. A tradução de descobertas de pesquisas em modelos animais para a prática clínica envolve diversos desafios, incluindo a diferença entre espécies, respostas imunes variáveis e a complexidade do ambiente clínico.

Os testes realizados neste estudo apresentam pontos que contribuem para o avanço do conhecimento na área de pesquisa sobre toxoplasmose e estrogiloidíase. Primeiramente, a escolha da linhagem celular BeWo, representante de células trofoblásticas humanas, como modelo de célula hospedeira têm relevância, uma vez que está envolvida diretamente na transmissão vertical da toxoplasmose. Outro ponto positivo é a análise da combinação de

estímulos em diferentes concentrações, permitindo uma abordagem mais ampla sobre os efeitos potenciais dos coestímulos nas células infectadas, simulando uma situação possível no hospedeiro-coinfecção e uso de corticosteroides. Os resultados obtidos nesta pesquisa revelam que a combinação de prednisolona e extrato salino de *S. venezuelensis*, especialmente na concentração de 32 µg/ml, demonstrou a capacidade de reduzir eficazmente a taxa de proliferação intracelular do *T. gondii* em células BeWo. A identificação dessa combinação específica e sua capacidade de inibir a proliferação do parasito ressaltam a importância de entender os mecanismos subjacentes a essa inibição (por exemplo, testar concentrações da combinação entre 32 e 8 µg/ml).

Essas investigações podem fornecer informações cruciais sobre os processos celulares e moleculares envolvidos na interação entre o sistema imunológico do hospedeiro, os tratamentos farmacológicos e *T. gondii*, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras, especialmente em pacientes imunocomprometidos e gestantes.

6. CONCLUSÃO

A prednisolona, em combinação com o extrato salino de *Strongyloides venezuelensis* em concentração de 32 µg/ml demonstrou diminuição da proliferação do *Toxoplasma gondii*, sem provocar toxicidade nas células BeWo.

REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D. et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Toxoplasmosis in Immunocompromised Patients and Correlation with Clinical Findings. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 199, n. 8, p. 1155–1167, 2009.
- AJZENBERG, D. et al. *Toxoplasma gondii* – a timid parasite? **Journal of Experimental Biology**. v. 221, p. 1–2, 2018.
- ALMEIDA, M. de A. et al. The occurrence of toxoplasmosis in Brazil: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 86, p. 147–156, 2019.
- ARAÚJO, E. C. B. *Heme oxigenase-1 na infecção por Toxoplasma gondii: funções divergentes no controle do parasitismo in vitro e in vivo*. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2011.
- ARAÚJO, E. C. B. et al. Beneficial effects of *Strongyloides venezuelensis* antigen extract in acute experimental toxoplasmosis. **Parasite Immunology**. v. 43, n. 4, p. 12811, 2021
- ARRANZ-SOLÍS, D., MUKHOPADHYAY, D., SAEJI, J. P. Toxoplasma effectors that affect pregnancy outcome. **Trends in Parasitology**. v. 37, n. 4, p. 283–295, 2020.
- BARBOSA, H.S., MUNO, R.M., MOURA, M.A. O Ciclo Evolutivo. In: SOUZA, W., BELFORT JR., R. **Toxoplasmose & Toxoplasma gondii**. Editora Fiocruz: Rio de Janeiro. v.10, n. 978, p. 33–45, 2014.
- BICHARA, C. C., ANDRADE, G. M. Q., LAGO, E. G. Toxoplasmose Congênita. In: SOUZA, W., BELFORT JÚNIOR., R. **Toxoplasmose & Toxoplasma gondii**. Editora Fiocruz: Rio de Janeiro. v. 10, n. 978, p. 137–155, 2014.
- BISOFFI, Z. et al. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, n. 5, p. 2214, 2013.
- BLADER, I. J., SAEJI, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 117, n. 5–6, p. 458–476, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. *Gestação de alto risco: manual técnico*. 5. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2012. 302 p.

BUONFRATE, D. et al. The Global Prevalence of *Strongyloides stercoralis* Infection. **Pathogens**. v. 9, n. 6, p. 468, 2020.

BUONFRATE, D. et al. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. **BMC Infectious Diseases**. v. 13, n. 78, 2013.

BUONFRATE, D. et al. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. **Epidemiology and Infection**. v. 143, n. 3, p. 452–460, 2015.

CAPOBIANGO, J. D. et al. Toxoplasmose adquirida na gestação e toxoplasmose congênita: uma abordagem prática na notificação da doença. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 25, n. 1, 2016.

CARDOSO, A. C. G. et al. Tecnologia educacional sobre toxoplasmose para gestantes do pré-natal de alto risco. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**. v. 11, n. 1, 2019.

CARLIER, Y. et al. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**. v. 121, p. 55–70, 2012.

CHALLIS, J. R.; LOCKWOOD, C. J.; MYATT, L.; NORMAN, J. E.; STRAUSS III, J. F.; PETRAGLIA, F. Inflammation and pregnancy. **Reproductive Sciences**. [s. l.], v. 16, p. 206–215, 2009.

CHAUDHRY, S. A., GAD, N., KOREN, G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Canadian Family Physician**. v. 60, n. 4, p. 334–336, 2014.

CHINCHILLA, M., et al. Efecto de los corticosteroides en la transmisión congénita de toxoplasmosis experimental. **Revista de biología tropical**. v. 40, n. 1, 135–137, 1992.

CORTÉS, J. A. et al. Approach to ocular toxoplasmosis including pregnant women. **Current Opinion in Infectious Diseases** v. 32, n. 5, p. 426–434, 2019.

COUTO, B. P. et al. Parasitological and immunological aspects of oral and subcutaneous prednisolone treatment in rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Acta tropica**. v. 204, p. 105349, 2020.

D'ERCOLE, C. et al. Recurrent congenital toxoplasmosis in a woman with lupus erythematosus. **Prenatal Diagnosis**. v. 15, n. 12, p. 1171–1175, 1995.

DUBEY, J. P., JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**. v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008.

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. v. 139, p. 1375–1424, 2012.

FARAL-TELLO, P., et al. Modeling the human placental barrier to understand *Toxoplasma gondii*'s vertical transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 13, p. 1130901, 2023.

FITZGERALD, J. S.; POEHLMANN, T. G.; SCHLEUSSNER, E.; MARKET, U. R. Trophoblasti invasion: the role of intracellular cytokine signaling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Human Reproduction Update**. [s. l.], v. 14, p. 335-344, 2008.

FRANCO, P. S. et al. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**. v. 32, p. 838–844, 2011.

GHAFFARIFAR, F. et al. The Effect of Betamethasone and IFN- γ on Replication of *Toxoplasma gondii* (RH Strain) and Nitric Oxide Production in HeLa Cell Culture. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**. v. 5, n. 2, p. 75–78, 2006.

GONZAGA, H. T., RIBEIRO, V. da S., CUNHA-JÚNIOR, J. P., UETA, M. T., COSTA-CRUZ, J. M. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2011;70(1):78-84.

HEGAB, S. M., AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and experimental medicine**. v. 3, n. 2, p. 84–105, 2003.

HOLEC-GASIOR, L., SOLOWINSKA, K. Detection of *Toxoplasma gondii* Infection in Small Ruminants: Old Problems, and Current Solutions. **Animals**. v. 13, n. 17, p. 2696, 2023.

JAFARI, M. M. et al. Immune system roles in pathogenesis, prognosis, control, and treatment of *Toxoplasma gondii* infection. **International Immunopharmacology**. v. 124, p. 110872, 2023.

JASPER, S. et al. Corticosteroids as adjuvant therapy for ocular toxoplasmosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 1, n. 1, 2017.

KIEFFER, F., WALLON, M. Congenital toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**. v. 112, p. 1099–1101, 2013.

KLEIN, N. C., GO, C. H. U., CUNHA, B. A. Infections associated with steroid use. **Infectious Disease Clinics**. v. 15, n. 2, p. 423–432, 2001.

LANNES-VIEIRA, J., SOUZA, W., BELFORT, J. R. Resposta Imune na Infecção por *Toxoplasma gondii*: desafios e oportunidades. In: SOUZA, W., BELFORT JÚNIOR, R. **Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 83–98, 2014.

LEVY, R. A. Use of Anti-Rheumatic Drugs during Pregnancy. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 45, n. 3, p. 124–123, 2005.

LI, X. L. et al. A meta analysis on risks of adverse pregnancy outcomes in *Toxoplasma gondii* infection. **PloS ONE**. v. 9, n. 5, p. 97775, 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, n.1, p. 265–275, 1951.

MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NATH, R. et al. Toxoplasma retinochoroiditis in pregnancy: Using current evidence to inform management. **Clinical Ophthalmology**. v. 3, 657–661, dez. 2009.

NIMISATO, S. et al. Pulmonary strongyloidiasis in a patient receiving prednisolone therapy. **Internal medicine**. v. 43, n. 8, p. 731–736, 2004.

OLARIU, T. R. et al. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 30, p. 1056–1061, 2011.

PUVANESUARAN, V. R. et al. Use of prednisolone to aid propagation of *Toxoplasma gondii* in mice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 16, p. 1028–1032, 2012.

RHEN, T., CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. **The New England Journal of Medicine**. v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.

ROBERT-GANGNEUX, F., DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, p. 264–296, 2012.

ROJAS-PIRELA, M. et al. Congenital transmission of Apicomplexan parasites: a review. **Frontiers in Microbiology**. v. 12, p. 751648, 2021.

ROVIRA-DIAZ, E. et al. The impact of helminth coinfection on innate and adaptive immune resistance and disease tolerance during toxoplasmosis. **The Journal of Immunology**. v. 209, n. 11, p. 21602171, 2022.

Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Santa Catarina (SES-SC), 2022. Manual técnico de orientações sobre o manejo da toxoplasmose. Disponível em: <https://dive.sc.gov.br/phocadownload/doencas-agravos/Toxoplasmose/Publica%C3%A7%C3%B5es/Manual-Toxoplasmose-Agosto-2022-2.pdf>. Acesso em novembro de 2023.

SILVA, A. C. T. et al. Prednisolone associated with doxycycline on the hematological parameters and serum proteinogram of dogs with ehrlichiosis. **Ciência Rural**. v. 51, p. 20200335, 2021.

SILVA, A. C. T. *Alterações das vias aéreas distais no ciclo pulmonar do Strongyloides venezuelensis em ratos Wistar: efeitos da dexametasona*. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2012.

SRIVASTAVA, S. et al. A Case of *Toxoplasma gondii* and *Strongyloides stercoralis* Coinfection in an Immunocompromised Patient. **Infectious Disorders-Drug Targets**. v. 22, n. 5, p. 109–111, 2022.

TONINI, M. L., STEINDEL, M. *Desenvolvimento de um teste colorimétrico para triagem da atividade de compostos utilizando Leishmania amazonensis expressando a enzima beta-galactosidase*. Tese de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. 2013.

VADLAMUDI, R. S., CHI, D. S., KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 4, n. 8. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-4-8>.

WIKMAN-JORGENSEN, P., REQUENA-MÉNDEZ, A., LLENAS-GARCÍA, J. A Review on Strongyloidiasis in Pregnant Women. **Res Rep Trop Med**. v. 12, p. 219–225, 2021.

WOLFE, M. W. Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. **Methods in Molecular Medicine**. [s. l.], v. 121, p. 229-239, 2006.