

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

FABÍOLA TEIXEIRA ALVES

**Avaliação dos extratos total salino e de excreção e secreção de
Strongyloides venezuelensis em células trofoblásticas humanas infectadas
com *Toxoplasma gondii***

Uberlândia

2024

FABÍOLA TEIXEIRA ALVES

**Avaliação dos extratos total salino e de excreção e secreção de
Strongyloides venezuelensis em células trofoblásticas humanas infectadas
com *Toxoplasma gondii***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Parasitologia

Orientação: Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga

Coorientação: Prof. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Uberlândia

2024

FABÍOLA TEIXEIRA ALVES

**Avaliação dos extratos total salino e de excreção e secreção de
Strongyloides venezuelensis em células trofoblásticas humanas infectadas
com *Toxoplasma gondii***

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito para obtenção
do título de bacharel em Biomedicina

Uberlândia, 2 maio de 2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga (UFU)

Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes (UFTM)

Dra. Ester Cristina Borges Araujo (UFU)

Dedico este trabalho aos meus pais, Alberto e Irani, verdadeiras fontes de inspiração como pessoas e profissionais, a quem devo tudo o que sou hoje. Ao meu irmão, Filipi, por ser um verdadeiro amigo e sempre me apoiar. Em memória das minhas avós, Benedita e Idalina, exemplos de força, determinação e coragem.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre acreditarem na minha capacidade, até mesmo quando eu não acreditei. Obrigada por me apoiarem a seguir meus sonhos e por dar todo o suporte para que isso fosse possível. Vocês sempre serão meus maiores orientadores da vida.

Ao meu irmão, por me entender como ninguém, me apoiar e nunca soltar a minha mão. Desde pequena, te admiro e me inspiro em ti.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga pelo apoio, orientação e dedicação ao longo deste processo. Sua experiência, paciência e *insights* foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

À Prof. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, a coorientação foi fundamental nas etapas de definição e discussão dos experimentos.

Ao Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, de maneira geral, por me receberem, auxiliarem diante de diversas dificuldades e, acima de tudo, por depositarem confiança no projeto. Em especial, a Luana por ajudar em tudo que fosse preciso para que esse projeto desse certo.

À Dra. Priscila Silva Franco por sua paciência ao me ensinar todos os aspectos necessários para alcançar este ponto, desde o cultivo de células até a conclusão dos experimentos finais. Sua presença constante, confiança e valiosas dicas foram fundamentais em todos os momentos deste percurso.

Às minhas parceiras de projeto, Bhrenda, Maria Eduarda e Marina, do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, por estarem comigo diariamente e me auxiliarem em tantas atividades.

Aos meus amigos que estiveram comigo ao longo dessa caminhada, pelos momentos de descontração e acolhimento.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção cosmopolita causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. A transmissão vertical de mães infectadas, pode resultar na toxoplasmose congênita, uma condição com potenciais implicações graves para o feto. A estrogilodíase humana é uma parasitose intestinal causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* com distribuição mundial e predominância em áreas tropicais e subtropicais. Os helmintos durante a invasão no hospedeiro criam um ambiente propício para sua sobrevivência, modulando a resposta imunológica do hospedeiro. Produtos antigênicos de helmintos estão sendo explorados em coinfeções parasitárias. No entanto, apesar do crescente interesse na compreensão dos complexos efeitos da superposição de coinfeções, os estudos que investigam o impacto da coinfeção/coestimulação por antígenos de *Strongyloides* e *T. gondii* ainda são escassos. O objetivo deste estudo foi avaliar os estímulos dos extratos total salino (TS) e de excreção/secreção (ES) de *S. venezuelensis* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) infectadas com *T. gondii* quanto à viabilidade celular, à proliferação do parasito e à produção de citocinas. Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade do tratamento com o TS ou de ES de *S. venezuelensis* 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* em ensaio de proliferação pela reação de β-galactosidase. Neste ensaio, tratamos as células BeWo infectadas com *T. gondii* nas concentrações de 32, 8, 2, 0,5 e 0,125 µg/ml para ambos os estímulos. Constatou-se que o tratamento de diferentes concentrações dos extratos não afetou a proliferação, assim como, não foi observada diferença, entre as preparações antigênicas, nas mesmas concentrações, para a proliferação de *T. gondii*. Por fim, as citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e MIF foram medidas em sobrenadantes de cultura celular (TS + *T. gondii*) pelo imunoensaio enzimático ELISA. Na maior concentração testada de TS (32 µg/mL) há maior produção de IL-4 na célula infectada. O TS não alterou o padrão de diminuição da produção de IL-6 na infecção por *T. gondii*. A estimulação de BeWo com *S. venezuelensis* TS em diferentes concentrações induz níveis semelhantes de produção de MIF, independente da infecção por *T. gondii*. Nossos resultados, indicam que explicar os processos subjacentes a essas relações em doenças negligenciadas é essencial para uma compreensão mais completa das respostas e implicações do *Strongyloides* nas coinfeções por protozoários.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita. Estrogilodíase. *Toxoplasma gondii*. *Strongyloides venezuelensis*. Doenças tropicais negligenciadas.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a cosmopolitan infection caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. Vertical transmission can result in congenital toxoplasmosis, a condition with potentially serious implications for the fetus. Human strongyloidiasis is an intestinal parasitosis caused by the nematode *Strongyloides stercoralis* with worldwide distribution and predominance in tropical and subtropical areas. During an invasion of the host, helminths create an environment conducive to their survival, modulating the host immune response. Helminth antigen products are being explored in parasitic co-infections. However, despite the growing interest in understanding the complex effects of overlapping infections, studies investigating the impact of co-infection/co-stimulation by *Strongyloides* and *T. gondii* antigens are still scarce. The aim of this study was to evaluate the stimuli of total saline extracts (TS) and excretion/secretion (ES) antigens of *S. venezuelensis* in human trophoblastic cells (BeWo lineage) infected with *T. gondii* regarding to cellular proteins, parasite therapy and cytokine production. Initially, the cytotoxicity of treatment with TS or ES of *S. venezuelensis* at serial concentrations (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0.5; 0.25 and 0.125 µg/ml) was evaluated by MTT assay. The results revealed that the different concentrations of the compounds did not present toxicity when compared to the control. Subsequently, the intracellular replication index of *T. gondii* was evaluated by β-galactosidase presence. In this assay, we treated BeWo cells infected with *T. gondii* at concentrations of 32, 8, 2, 0.5, and 0.125 µg/ml for both stimuli. It was found the treatment with different concentrations of the extracts did not affect the cells, as well as no difference was observed between the antigenic preparations, at the same concentrations, for *T. gondii* proliferation. Finally, the cytokines IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and MIF were measured in cell culture supernatants (TS + *T. gondii*) by ELISA. At the highest concentration of TS tested (32 µg/mL) there is a greater production of IL-4 and no change in the pattern of decreased IL-6 production in TS + *T. gondii* infected cells. Stimulation with different concentrations of TS also induced similar levels of MIF production, independent of *T. gondii* infection. Our results, indicate explaining processes underlying these relationships in neglected diseases is essential for a more complete understanding of the responses and implications of *Strongyloides* in protozoa co-infection.

Keywords: Toxoplasmosis. Congenital. Strongyloidiasis. *Toxoplasma gondii*. *Strongyloides venezuelensis*. Neglected tropical diseases.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose.....	10
1.2 <i>Strongyloides</i> e estrogiloidíase.....	15
1.3 Coinfecções parasitárias.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Obtenção das larvas de <i>S. venezuelensis</i>	23
4.2 Cultura de células BeWo.....	24
4.3 Manutenção de <i>T. gondii</i>	24
4.4 Ensaio de viabilidade celular.....	24
4.5 Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo.....	25
4.6 Dosagem de citocinas por ELISA indireto.....	26
4.7 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1 Os extratos total salino e de excreção/secreção de <i>S. venezuelensis</i> não reduziram a viabilidade das células BeWo.....	28
5.2 Os extratos total salino e de excreção/secreção de <i>S. venezuelensis</i> em diferentes concentrações não afetaram a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo.....	30
5.3 Avaliação de citocinas produzidas pela BeWo na infecção por <i>T. gondii</i> e coestímulo com o extrato total salino de <i>S. venezuelensis</i>	32
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa e capaz de infectar uma variedade de células e tecidos de diversos hospedeiros, incluindo aves e mamíferos. Estimativas apontam que cerca de um terço da população mundial esteja infectada pelo *T. gondii*, com taxas de incidência mais acentuadas na América do Sul, no Sudoeste Asiático e na África (Pappas; Roussos; Falagas, 2009; Yan *et al.*, 2016). Essa capacidade e sua distribuição global, entre outros fatores, conferem-lhe a posição de um dos protozoários mais bem-sucedidos, o que causa uma preocupação significativa em termos de saúde pública (Dubey, 2010; Zeinali *et al.*, 2023).

Estruturalmente, o *T. gondii* possui o complexo apical, uma região constituída por organelas especializadas, como micronemas, grânulos densos, roptrias, conoide e apicoplasto. Essas estruturas desempenham um papel crucial nos processos de fixação, invasão e sobrevivência nas células hospedeiras e estão presentes nas três formas infectantes do parasito: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Carruthers; Boothroyd, 2007; Souza *et al.*, 2010).

Os taquizoítos caracterizam a fase aguda da infecção e são conhecidos pela sua rápida proliferação. Além disso, morfologicamente, assemelham-se com o formato de um arco, com uma extremidade arredondada e outra mais delgada (Souza *et al.*, 2010; Blader *et al.*, 2015). Os bradizoítos surgem durante a fase crônica da infecção e, em termos morfológicos, compartilham semelhanças com os taquizoítos. Eles se localizam no interior de pseudocistos teciduais de replicação lenta, os quais apresentam elevada resistência ao suco gástrico e ao sistema imunológico, permitindo sua permanência prolongada no organismo do hospedeiro. Contudo, em situações de imunocomprometimento, a infecção pode ser reativada, com a conversão dos bradizoítos de volta para a forma taquizoítica (Blader *et al.*, 2015; Jeffers *et al.*, 2018). Os esporozoítos estão presentes dentro de estruturas íntegras chamadas oocistos, os quais se desenvolvem no intestino do hospedeiro definitivo felino e são liberados nas fezes em estágio imaturo. Os oocistos permanecem viáveis por períodos prolongados no ambiente, devido à presença de uma parede rígida composta

por várias camadas. Tornam-se infectantes, quando em condições favoráveis, após o processo de esporulação, que origina dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (Montoya; Liensenfeld, 2004).

O ciclo de vida do *T. gondii* inclui uma fase assexuada e outra sexuada. Os hospedeiros definitivos são os felídeos e os intermediários as aves e mamíferos, inclusive o homem (Dubey, 2020). A etapa sexuada tem início quando os felinos ingerem, por exemplo, carne/vísceras com cistos de bradizoítos. Esse processo resulta na liberação de parasitos na mucosa gástrica, que migram para o epitélio intestinal, onde se reproduzem por meio de esquizogonia. O núcleo dos esquizontes gradualmente se individualiza pela divisão da membrana plasmática e formam os merozoítos. Estes, por sua vez, podem gerar gametas que, ao se fertilizarem, originam oocistos. Os oocistos são liberados no meio ambiente junto com as fezes dos felinos, sofrem esporulação e tornam-se infectantes (Montoya; Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux; Dardé, 2012). A ingestão de alimentos contaminados, contendo tanto cistos quanto oocistos, pode resultar na infecção de hospedeiros intermediários, os quais, liberam bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, que se transformam em taquizoítos capazes de invadir e se disseminar nas células do indivíduo, conduzindo à fase assexuada por endodiogenia (Montoya; Liesenfeld, 2004).

A transmissão para o homem pode ocorrer por várias vias. Além das citadas rotas de transmissão que envolvem a ingestão de carnes malcozidas contendo cistos com bradizoítos; ou a de vegetais mal higienizados, outros alimentos, água ou solo contaminados com oocistos maduros há também a transmissão que envolve os taquizoítos. Os taquizoítos podem ser transmitidos por meio de fluídos corpóreos e, principalmente, da mãe para o feto durante a gravidez, conhecida como transmissão transplacentária ou vertical (Zhao; Ewald, 2020; Khan; Moretto, 2022).

Os sintomas da toxoplasmose podem variar de acordo com a fase da doença. A fase aguda pode cursar assintomática, na maioria dos casos, ou manifestar-se com febre, dores musculares, dores de cabeça e alterações na visão devido à presença de parasitos na retina. Além disso, há uma elevada concentração de parasitos no sangue, resultando em uma disseminação significativa pelo organismo. Este estágio da doença pode representar um risco significativo para indivíduos imunodeficientes e para o feto durante a gestação.

Em indivíduos imunocompetentes, o sistema imunológico atua controlando a infecção, induzindo os taquizoítos a formarem cistos com bradizoítos, típicos da fase crônica da doença, que geralmente é assintomática (Montoya; Liesenfeld, 2004). Outros fatores que influenciam as manifestações clínicas da doença incluem a carga parasitária, a virulência da cepa envolvida e fatores específicos do hospedeiro, tais como comorbidades e seu histórico genético (Weiss; Dubey, 2009).

A infecção causada pelo *T. gondii* desencadeia, classicamente, uma resposta imunológica do tipo Th1, e requer componentes da imunidade inata e adaptativa, que envolve interações entre parasito, monócitos, linfócitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e células natural killers (NKs) (Yarovinsky, 2014; Khan; Moretto, 2022). As células da imunidade inata apresentam receptores semelhantes a Toll (TLRs), os quais têm a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Esse reconhecimento desencadeia a ativação do sistema imune, com consequente produção de interleucina-12 (IL-12) por células dendríticas (Fisch; Clough; Frickel, 2019).

A síntese e liberação de IL-12 por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos têm como resultado a indução da síntese de interferon gama- γ (IFN- γ) pelas células NKs (Gigley, 2016). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) atua em conjunto com a IL-12 para otimizar a produção de IFN- γ por essas células (Gazzinelli *et al.*, 1993). A produção dessas citocinas pró-inflamatórias está associada a ativação da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos TCD4+ (perfil Th1) e TCD8+ (citotóxicos), que, por sua vez, geram e secretam diversos mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), que contribuem para um aumento ainda mais pronunciado nos níveis de IL-12 e IFN- γ (Miller *et al.*, 2009a; Melo *et al.*, 2011). O IFN- γ desempenha um papel crucial na ativação das células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, com resultados na redução ou eliminação do parasito (Nast *et al.*, 2020). Quando os macrófagos são estimulados pelo IFN- γ , produzem NO, desencadeando uma ação tóxica contra o parasito (Mukhopadhyay, Saeji, 2020; Dupont, Christian, Hunter, 2012). Além do IFN- γ e da IL-12, outras citocinas pró-inflamatórias são importantes no combate a infecção por *T. gondii*. Entre elas, destacam-se a interleucina-6 (IL-6) e o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF). O MIF, produzido por diferentes tipos de células, participa da maturação das células dendríticas e atua

na produção de IL-1 β , IL-12 e TNF na presença de *T. gondii* (Costa *et al.*, 2021). A IL-6 está principalmente ligada ao desenvolvimento precoce da resposta de fase aguda, à manutenção da hematopoiese e às barreiras imunológicas oculares, além de ser relevante na toxoplasmose cerebral. Ela promove o aumento da atividade citotóxica das células NK e participa da maturação de linfócitos B secretores de anticorpos, bem como da diferenciação de linfócitos T (Sana *et al.*, 2022).

A produção de citocinas com perfil Th1 é eficaz no combate ao parasito, porém, pode ser prejudicial ao hospedeiro, devido à elevada geração de IFN- γ , que pode causar danos aos tecidos infectados. Portanto, é importante que tenha um balanço entre um perfil das respostas Th1 e Th2, mediado pela produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1). Essas citocinas atuam reduzindo a produção de NO nos macrófagos, a atividade citotóxica das células NK e a maturação das células dendríticas. Além disso, as citocinas exercem efeitos inibitórios sobre a síntese de IFN- γ pelas células NK e pelos linfócitos T CD4+ com perfil Th1 (Wille, et al 2001).

Assim, a resposta contra a infecção por *T. gondii* envolve a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a produção de anticorpos e a ação coordenada das células efetoras, tanto do sistema imunológico inato quanto adaptativo (Miller *et al.*, 2009b). Contudo *T. gondii* possui a capacidade de evadir a resposta imune do hospedeiro. Dessa forma, o sucesso da infecção e a capacidade de combate ao parasito estão intrinsecamente ligados ao equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de evasão empregados por *T. gondii* (Melo *et al.*, 2011).

Na toxoplasmose congênita as formas taquizoítas alcançam a circulação e os tecidos fetais. Isso pode gerar consequências prejudiciais para o desenvolvimento fetal. A variedade de anormalidades que engloba alterações do volume craniano (micro ou hidrocefalia), retardo psicomotor, lesões na retina, além de aumentar o risco de prematuridade, baixo peso ao nascer, abortos e natimortos (Fallahi *et al.*, 2018). É importante destacar que além dos fatores citados, o trimestre da gestação em que a infecção ocorre ou reagudiza também impacta nas apresentações da forma congênita (Borges *et al.*, 2018; Ahmed; Sood; Gupta, 2020).

Durante o primeiro trimestre de gestação, há aproximadamente um risco de infecção fetal de 10%, contudo, o comprometimento do feto é grave, podendo resultar em aborto (Fallahi *et al.*, 2018). À medida que se avança para o segundo trimestre, as chances de transmissão aumentam para cerca de 30%; e no terceiro trimestre, variam entre 60% e 90%. É relevante observar que, neste último trimestre, o comprometimento fetal geralmente é menos grave (Dunn *et al.*, 1999; Mcleod *et al.*, 2009; Garcia-Méric *et al.*, 2010). Recém-nascidos que contraem toxoplasmose durante o terceiro trimestre da gestação, geralmente, apresentam-se fisicamente normais, mas estão sujeitos ao risco de manifestar sintomas mais tardiamente, como hepatoesplenomegalia, icterícia e danos neurológicos e oculares. Tais diferenças entre os trimestres gestacionais têm relação com vários pontos, entre eles a idade e estrutura da placenta ao longo da gestação, inclusive do trofoblasto (Jones *et al.*, 2003).

O trofoblasto, uma célula de origem fetal, desempenha funções cruciais para o sucesso gestacional. Tem 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). É responsável pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio receptivo, pela nutrição do embrião e pela formação da porção fetal da placenta (Fitzgerald *et al.*, 2008).

Para aprofundar a compreensão do papel do trofoblasto no ambiente materno-fetal, especialmente na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*, diversos estudos *in vitro* utilizam linhagens celulares pré-estabelecidas. Nesse contexto, este trabalho utilizou células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) como modelo de estudo do trofoblasto humano. Essas células, isoladas em 1968 por Pattillo e Gey, mantêm muitas características típicas do trofoblasto humano, incluindo a secreção de hormônios como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênico placentário (hPL), progesterona e estradiol (Wolfe, 2006).

Durante a gestação, a placenta assume o papel de facilitar a comunicação predominante entre a mãe e o feto, provocando alterações na imunidade e fisiologia maternas para garantir o sucesso da gestação (Faral-Tello 2023). A implantação do embrião, tem início com a aposição do blastocisto ao endométrio uterino, seguida pela sua fixação ao epitélio da superfície endometrial. Esse estágio é marcado por uma resposta pró-inflamatória significativa (Dekel *et al.*,

2010). Durante o segundo trimestre de gestação, ocorre a síntese elevada de IL-10 pelo trofoblasto, predominando uma resposta anti-inflamatória, a qual promove a tolerância materna em relação ao feto em desenvolvimento. Enquanto no terceiro trimestre estes níveis diminuem, o que é importante para preparar o organismo materno na contração uterina, parto e subsequente expulsão da placenta (Rezende-Oliveira *et al.*, 2012).

Logo, o sucesso da gestação está vinculado à capacidade do sistema imunológico materno de proteger o feto contra danos externos, ao mesmo tempo em que permite a passagem de nutrientes essenciais para seu desenvolvimento. Qualquer desequilíbrio nessa tolerância imunológica pode resultar em complicações gestacionais, como pré-eclâmpsia e aborto (Mor-Cardenaz, 2011). Ademais, embora o perfil anti-inflamatório seja crucial para a tolerância materna, pode predispor a infecções, como a causada por *T. gondii*, aumentando os riscos de problemas durante a gestação (Arranz-Solis *et al.*, 2021).

1.2 *Strongyloides* e estrogiloidíase

Os nematódeos pertencentes ao gênero *Strongyloides* são classificados na classe Chromadorea, na ordem Rhabditida e na família Strongyloididae (Blaxter *et al.*, 1998; Thamsborg *et al.*, 2017). Cerca de 60 espécies estão agrupadas neste gênero, comumente parasitando mamíferos, além de também afetar aves, répteis e anfíbios (Viney; Lok, 2015). Levantamentos epidemiológicos demonstram que a estrogiloidíase humana afeta, aproximadamente, 600 milhões de pessoas em todo o mundo. É endêmica nas regiões tropicais e subtropicais, com focos de infecção em países, como Japão, Austrália e Itália (Chan; Thaenkham, 2023; Buonfrate *et al.*, 2023a).

As espécies do gênero *Strongyloides* têm um ciclo de vida complexo com duas gerações: uma fase de vida livre e outra fase parasitária. Seis formas evolutivas diferentes são identificáveis morfologicamente: fêmeas parasitas partenogênicas e de vida livre, machos de vida livre, ovos e larvas rhabditoides e filarioides (Costa-Cruz, 2011). Na primeira fase do ciclo, machos e fêmeas de vida são responsáveis pela reprodução sexuada, enquanto na segunda fase,

apenas as fêmeas estão presentes e realizam reprodução assexuada por partenogênese (Castelletto *et al.*, 2023).

O *S. stercoralis* é o principal agente causador da estrogiloidíase humana, enquanto, o *S. venezuelensis*, parasita roedores e é frequentemente utilizado como modelo experimental. Isso é possível devido à sua biologia e composição antigênica semelhantes ao *S. stercoralis*, tornando-o uma fonte valiosa de antígenos para testes diagnósticos e experimentos destinados a aprofundar o conhecimento sobre essa parasitose (Couto *et al.*, 2020).

Os seres humanos são infectados por meio da penetração das larvas infectantes filarioides L3 através da pele, após o contato direto com o solo contaminado. No local de penetração, pode-se observar uma lesão em forma de traço serpiginoso, muitas vezes acompanhada de prurido. As larvas entram na circulação, migram para o coração e pulmões, depois chegam à árvore traqueobrônquica e sofrem uma muda, transformando-se em larvas L4. Posteriormente, são expelidas pelo reflexo de tosse e parte delas deglutida. No trato gastrointestinal, passam por mudanças e se desenvolvem em fêmeas partenogenéticas. As fêmeas ficam nas criptas da mucosa intestinal, especialmente no duodeno. As fêmeas adultas produzem ovos larvados. Os ovos eclodem no intestino e as larvas rabditoides são eliminadas nas fezes (Luvira *et al.*, 2022). Há também a possibilidade de autoinfecção que ocorre quando larvas rabditoides se tornam larvas filarioides invasivas no percurso intestinal até a eliminação nas fezes. A infecção ocorre quando as larvas filarioides penetram na mucosa intestinal (autoinfecção interna) ou na pele da região perianal (autoinfecção externa). Esse ciclo singular de autoinfecção permite que *S. stercoralis* cause infecção crônica persistente (Buonfrate, *et al.*, 2020; Luvira *et al.*, 2022).

Strongyloides stercoralis pode causar um amplo espectro de apresentações clínicas, dependendo, dentre outros fatores, da imunidade do hospedeiro e da carga parasitária. Indivíduos afetados pela estrogiloidíase podem desenvolver tanto a forma aguda quanto a crônica da doença (Veloso *et al.*, 2008). Na forma aguda os sintomas, quando presentes, incluem inflamações cutâneas como urticárias e lesões palpáveis, além do sintoma característico conhecido como larva *currens*. A migração pulmonar de parasitos pode resultar em tosse seca e chiado no peito ou mesmo na clássica síndrome do tipo Loeffler.

Por último, os sintomas gastrointestinais começam quando os parasitos atingem o intestino, dentre eles, dor epigástrica e diarreia (Luvira *et al.*, 2022; Buonfrate *et al.*, 2023b). Por outro lado, as manifestações crônicas da doença surgem à medida que o ciclo de vida patogênico no hospedeiro avança. Essas manifestações podem variar de leves a graves: na forma leve pode não apresentar sintomas visíveis, enquanto as formas moderadas e graves podem causar, entre outras manifestações, tosse, dor abdominal, síndromes desintéricas e vômitos, dependendo da intensidade dos sintomas (Vadlamudi *et al.*, 2006).

Em determinados casos pode ocorrer hiperinfecção, caracterizada pelo aumento significativo do número de larvas filarioides no hospedeiro nos sítios usuais do ciclo (pulmões e intestino). Adicionalmente, existe a possibilidade de infecção disseminada, na qual, as larvas migram para outros órgãos e podem ser encontradas em lugares ectópicos, incluindo, pele, fígado, cérebro, coração e trato urinário. É de suma importância intensificar o monitoramento da infecção em pacientes imunocomprometidos, pois a fragilidade do sistema imunológico nesses casos pode predispor à ocorrência dos quadros de síndromes graves, e muitas vezes fatal, da estrogiloidíase (Buonfrate *et al.*, 2020).

Outra condição em que a resposta imunológica é modificada e pode intensificar os sintomas da estrogiloidíase é quando a infecção ocorre durante a gravidez. Nesse cenário, argumenta-se que há uma certa supressão do sistema imunológico, embora ainda não esteja completamente compreendido como isso influencia os aspectos clínicos e a progressão da infecção. Além disso, não está claro como o *S. stercoralis* afeta tanto o sistema imunológico da mãe quanto o do feto, devido, principalmente, a escassez de estudos que investiguem a estrogiloidíase durante a gestação. Apesar dessa lacuna, a infecção por esse helminto tem sido associada a problemas no desenvolvimento fetal e anemia em mulheres grávidas. Ademais, em casos de hiperinfecção e disseminação podem resultar na morte tanto da mãe quanto do recém-nascido (Wikman-Jorgensen; Requena-Méndez; Llenas-García, 2021).

Espécies do gênero *Strongyloides* induzem a resposta imune do tipo Th2, com produção de, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, anticorpos IgM, IgG, IgA, IgE, bem como a ação de mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos B (Marcos *et al.*, 2010; Breloer; Abraham, 2016). De início, há a mobilização de neutrófilos,

macrófagos e eosinófilos, que atuam diretamente contra as larvas por meio da resposta imune inata. Os eosinófilos desempenham um papel fundamental na ativação da resposta imune adaptativa, especialmente na liberação de citocinas necessárias para a produção de IgM (Bonne-Année; Hess; Abraham, 2011).

Na resposta imune adaptativa, observa-se a influência de diversas citocinas. A IL-5 desempenha um papel na ativação dos eosinófilos e na produção de IgA. A IL-4 estimula a migração e adesão dos eosinófilos e, em conjunto com a IL-13, promove a produção de IgE e IgG pelos linfócitos B. A IL-6 estimula os granulócitos, bem como as células B e T. Por outro lado, a IL-10 e a IL-13 exercem uma regulação negativa sobre a ativação das células Th1 (Toledo; Muñoz-Antoli; Esteban, 2015).

Devido ao ciclo do parasito abranger as mucosas pulmonar e intestinal, o hospedeiro tem a capacidade de desenvolver uma resposta local e sistêmica mediada por IgA. Os anticorpos IgA são importantes na regulação da eliminação das larvas, principalmente ao reduzir a fecundidade das fêmeas e a viabilidade dos ovos. (Genta; Frei; Linke, 1987; Mota-Ferreira *et al.*, 2009).

Os helmintos causam danos significativos durante sua invasão no hospedeiro, migração pelos tecidos e consumo de células hospedeiras, podendo persistir por longos períodos. Eles criam um ambiente propício para sua sobrevivência e ao mesmo tempo limitam o dano aos tecidos, evitando e modulando a resposta imunológica do hospedeiro (Wilbers *et al.*, 2018)

Assim, tanto o extrato total salino quanto os produtos de excreção e secreção de *Strongyloides* desempenham um papel essencial nesse contexto, sendo amplamente utilizados como ferramentas em pesquisas parasitológicas e estudos relacionados a este grupo de nematódeos (Gonzaga *et al.*, 2011; Wilbers *et al.*, 2018). Embora certamente compartilhem antígenos, esses extratos possuem diferentes propriedades antigênicas. O extrato salino é obtido por meio da cultura de fezes de animais infectados experimentalmente, seguida pela coleta das larvas (L3) do parasito e posterior maceração e solubilização, ou seja, são derivados de cutícula e estruturas internas do parasito (Gonzaga *et al.*, 2011). Por outro lado, o extrato de excreção e secreção é produzido com o estágio vivo do parasito. As larvas são mantidas em meio de cultura e, neste período, produzem substâncias que foram excretadas ou secretadas. Tais componentes, geralmente, estão associados a uma indução de resposta mais

evidente, direcionada e, até mesmo, danos específicos ao hospedeiro (Soblik *et al.*, 2011). Essas diferenças na detecção da resposta imune das preparações já foram observadas em trabalho, como o de Carvalho, 2019, no qual foi visto que os polipeptídeos presentes nos produtos excreção/secreção apresentam desempenho diagnóstico superior ao extrato total salino. Porém, ambos os produtos podem influenciar a apresentação de antígenos suprimindo a ativação de células do perfil Th1 ou Th17 e promovendo o desenvolvimento de células do perfil Th2 (Harnett, 2014; Araujo *et al.*, 2020).

1.3 Coinfecções parasitárias

A presença simultânea de múltiplas espécies de parasitos é comumente observada em diversos sistemas biológicos, inclusive em comunidades humanas com recursos médicos limitados. Embora as interações entre muitos desses parasitos e patógenos sejam pouco compreendidas, a investigação sobre coinfecção é amplamente realizada no estudo de doenças. A análise da coinfecção é fundamental, pois pode afetar tanto o tratamento quanto a susceptibilidade à infecção. Além disso, a exposição a múltiplos agentes patogênicos é uma ocorrência natural e mais de um sexto da população mundial é afetado. A interação entre dois ou mais parasitos pode ter várias consequências, podendo agravar ou melhorar a fisiopatologia de uma infecção ao modificar o perfil imunológico e as interações parasitárias (Enas *et al.*, 2023).

As infecções parasitárias afetam dezenas de milhões de mulheres grávidas em todo mundo anualmente. Uma das razões para a elevada incidência de infecções parasitárias em gestantes está relacionada à imunomodulação que ocorre durante a gestação, visando evitar a rejeição do feto. Esse processo de regulação do sistema imunológico, que envolve hormônios, citocinas e neurotransmissores, acaba por criar um ambiente favorável para a instalação e reprodução dos parasitos (Vargas-Villavicencio; León-Nava; Morales-Montor, 2009).

As consequências dessas infecções abrangem desde anemia leve até eventos como a morte fetal e materna. Alguns parasitos têm preferência pela infecção da placenta, enquanto outros acometem o feto, e há também aqueles

que causam doenças maternas graves. Em vista disso, coinfeções entre helmintos e protozoários também não são incomuns na gravidez. Estudos mostram que mulheres grávidas coinfectadas por helmintos e *Plasmodium falciparum*, por exemplo, aumentam significativamente o risco de anemia, baixo peso ao nascer e bebês pequenos para a idade gestacional quando comparado apenas com infecções por helmintos (Dotters-Katz; Kuller; Heine, 2011; Straubinger; Costa, 2014).

Há uma escassez de estudos sobre a relação entre toxoplasmose e estrogiloidíase. Os casos de coinfeções por *T. gondii* e *S. stercoralis* ocorrem em hospedeiros, particularmente em regiões pouco desenvolvidas com extrema pobreza e recursos limitados, como é o caso na Índia, especialmente em pacientes com HIV (Srivastava *et al.*, 2022). Após experimento realizado em camundongos, foi observado que a administração de antígenos de *S. venezuelensis* resultou em aumento das taxas de sobrevivência, redução da carga parasitária nos pulmões e intestino delgado, além de desempenhar um papel anti-inflamatório em camundongos infectados por *T. gondii* (Araujo *et al.*, 2020). Além disso, já foi demonstrado por nosso grupo que a combinação do corticoide prednisolona e do extrato total salino de *S. venezuelensis* é capaz de diminuir a proliferação do *T. gondii*, sem provocar toxicidade as células BeWo (Oliveira, 2023)

2. JUSTIFICATIVA

A estrogiloidíase e a forma congênita da toxoplasmose são doenças negligenciadas que afetam milhões de pessoas. A coinfeção entre helmintos intestinais e o protozoário *T. gondii* é um fenômeno comumente observado na prática. No entanto, apesar do crescente interesse na compreensão dos complexos efeitos da superposição de infecções, os estudos que investigam o impacto da coinfeção/coestimulação por antígenos de *Strongyloides* e *T. gondii* ainda são escassos.

Dessa forma, visto que não há dados na literatura que avaliem o papel dos extratos total salino e de excreção e secreção de larvas de *S. venezuelensis* como moduladores da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo), faz-se necessário verificar o impacto desse parasito na modulação da resposta imune, assim como na proliferação e viabilidade das células BeWo. Esses resultados, podem contribuir para o entendimento do papel dos extratos antigênicos de *S. venezuelensis* na infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal, como também, para o desenvolvimento de uma ferramenta de controle para infecção por *T. gondii*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do extrato total salino e de excreção e secreção de larvas filarioides de *S. venezuelensis* durante a infecção por *T. gondii* e resposta imune em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do extrato salino e de excreção e secreção de *S. venezuelensis* na viabilidade celular em células BeWo;
- Avaliar o efeito do extrato salino e de excreção e secreção de *S. venezuelensis* na proliferação intracelular de *T. gondii* em célula BeWo;
- Avaliar o efeito do extrato total salino na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em células BeWo infectadas ou não por *T. gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de larvas de *S. venezuelensis*

As larvas de *S. venezuelensis* utilizadas neste estudo foram obtidas a partir da manutenção experimental da espécie em ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) (Protocolo CEUA/UFU – nº 075/2008). O Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses (LADIPAR), do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), dispõe de estoque de extrato de excreção e secreção de *S. venezuelensis* e de larvas para a produção do extrato total salino.

O extrato total salino (TS) foi obtido conforme o protocolo descrito por Gonzaga e colaboradores (2011). O extrato total salino foi produzido a partir de alíquotas com aproximadamente 250.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis*. As larvas foram descongeladas e ressuspensas em PBS. Coquetel de inibidores de proteases foi adicionado e consistiu em 100 µL/mL de extrato de cOmplete ULTRA (Tablets, Mini, EASYpac, Roche, Alemanha). Posteriormente, as larvas foram rompidas por criólise em banhos de nitrogênio líquido e maceração em almofariz. Após esse procedimento, larvas inteiras não devem ser visualizadas em microscópio. O preparado foi incubado sob agitação lenta por 2 h a 4 °C e, em seguida, centrifugado a 12.400 g por 30 min a 4 °C. A concentração proteica do extrato salino, após a filtração, foi feita pelo método de Lowry e colaboradores (1951), modificado para microplacas. O resultado foi expresso em µg/mL.

As culturas de *S. venezuelensis* para a obtenção do extrato de excreção e secreção (ES) foram realizadas segundo Soblik e colaboradores (2011), com modificações. As larvas filarioides recolhidas e lavadas foram suspensas em meio de cultura estéril, na capela de fluxo laminar. O meio de cultura foi composto por RPMI 1640 (meio Roswell Park Memorial Institute 1640) suplementado com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 mg/ml estreptomicina) e HEPES [ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico] 10 mM. As larvas foram incubadas em placas de cultura com 24 poços, em uma concentração aproximada de 30.000 larvas / mL de meio de cultura (RPMI 1640), com um volume de 1 mL por poço, e mantidas a 37°C com tensão de CO₂ a 5%

em estufa de cultura. A cada 24h a motilidade das larvas era observada, sendo interrompida a cultura caso aproximadamente 80% das larvas estivessem imóveis. Para padronização do protocolo, o período máximo de cultura estipulado foi de 72h. A cada 24h o sobrenadante da cultura era recuperado e armazenado a -20°C e a cultura repostada com novo meio de cultura. Todos os sobrenadantes de cultura foram suplementados com inibidores de protease (ULTRA Minicomplete, Roche, Alemanha) e concentrados utilizando sistema de filtração com membrana Amicon® Ultra-15 10K (Merck Millipore, Irlanda). O volume de entrada do sobrenadante foi de 15 mL e a saída foi de 500 mL. O produto de E/S foi dosado pelo método Lowry e outros (1951).

Para a realização dos experimentos foi utilizado um único lote de cada extrato, filtrado em dupla membrana para eliminar contaminação bacteriana.

4.2 Cultura de células BeWo

As células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo - ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) e antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical Co, EUA) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

4.3 Manutenção de *T. gondii*

Os taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* 2F1, que expressam constitutivamente o gene da β-galactosidase, foram mantidos em células BeWo em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% SFB a 37°C e 5% de CO₂.

4.4 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células BeWo frente ao tratamento com os extratos total salino e de excreção/secreção foi verificada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT, seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983) com modificações.

Células BeWo (3×10^4 /200 µl) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio com 10% de SFB por 18 h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Em seguida,

as células foram tratadas em diluição seriada (1:2), com concentrações decrescentes de TS ou de ES (64; 32; 26; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/ml), durante 24 h. Como controle, as células foram tratadas somente com meio 10% de SFB.

Posteriormente, as células foram incubadas com 10 µl de MTT (5 mg/mL) acrescido de 90 µL de meio a 10% de SFB em estufa durante 4 h. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de solução contendo SDS a 10% e N, N-dimetil formamida a 50%. Após 30 min de incubação, foi obtida a densidade 20 óptica a 570 nm em leitor de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, EUA). Foi realizado um experimento em triplicata.

4.5 Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo

A proliferação de *T. gondii* em células BeWo em relação ao tratamento com o extrato total salino e o extrato de excreção e secreção foi verificada através do ensaio de β-galactosidase segundo Silva (2017) com modificações. Células BeWo (3×10^4 /200 µl) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio RPMI com 10% de SFB por 24 h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) por 3 h em meio com 2% de SFB. Após o tempo, os poços foram lavados com PBS para remoção de parasitos extracelulares, e as células foram tratadas em diluição seriada (1:2) separadamente com TS e ES em meio 10% por adicionais 24 h, e submetidas ao ensaio de β-galactosidase. Adicionalmente, células BeWo infectadas também foram tratadas com sulfadiazina (SDZ) + pirimetamina (PIR; 200+8 µg/ml, respectivamente), para o controle positivo. Como controle negativo, as células foram infectadas e não tratadas.

Em resumo, as placas foram centrifugadas e em seguida foram adicionados às células 100 µL de tampão de lise RIPA por 15 min (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), 160 µL de tampão de ensaio (100 mM de tampão fosfato, pH 7,3, 102 mM de β-mercaptoetanol, 9 mM de MgCl₂) e 40 µL do substrato CPRG (clorofenol red-β-D-galactopiranosídeo; Roche) e incubadas por 30 min à temperatura ambiente, no escuro.

Posteriormente, a atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada a 570 nm usando leitor de placas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, 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 previamente preparadas mediante esterilização por exposição à luz ultravioleta. O procedimento começou com o cultivo das células BeWo em meio de cultura, como mencionado anteriormente, para alcançar a densidade necessária para análise. Após a conclusão do experimento, seguindo condições semelhantes às descritas, as células foram fixadas com formaldeído a 4% por 2 horas, a fim de manter a integridade celular. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para remover os resíduos do meio de cultura e do fixador. Posteriormente, foi adicionado azul de toluidina a 0,1% em PBS às células e, após a coloração, elas foram delicadamente lavadas com PBS para eliminar o excesso do corante. Por fim, as lamínulas contendo as células coradas foram montadas em lâminas de vidro utilizando Entellan. A análise microscópica subsequente permitiu a visualização e a captura das imagens. Todas as imagens foram adquiridas através do Scanscope AT, com um aumento de 60 vezes.

4.6 Dosagem de citocinas por ELISA indireto

As citocinas humanas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e MIF foram mensuradas nos sobrenadantes coletados de cultura de células BeWo, pelo teste imunoenzimático ELISA, de acordo com as instruções dos fabricantes (BD Biosciences; R&D Systems).

As células BeWo (1×10^5 /300 μ l) foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio RPMI com 10% de SFB por 24 h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas ou não com *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por células (3:1) por 3 h em meio com 2% de SFB. Após o tempo, os poços foram lavados com PBS, para remoção de parasitos extracelulares, e as

células foram tratadas nas concentrações 32, 8 e 2 µg/ml com TS em meio 10% por 24 h. Como controle positivo, células BeWo infectadas também foram tratadas com sulfadiazina (SDZ) + pirimetamina (PIR; 200+8 µg/ml, respectivamente); e como controle negativo, as células foram infectadas e não tratadas. Após o período de tratamento/estímulo o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C para posterior realização do ELISA.

Brevemente, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-8 e anti-IL-10 (BD Biosciences) overnight a 4°C e anti-MIF (R&D Systems) overnight a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS Tween 0,05% para posterior bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS a 10% de SFB (IL 4, IL-6, IL-8, IL-10) e PBS a 1% de soro albumina bovina (BSA) para MIF. Após 1 h, as placas foram novamente lavadas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas e incubadas por mais 2 h a temperatura ambiente. As placas foram submetidas a consecutivas lavagens e em seguida os anticorpos de detecção anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-8 e anti-IL-10 conjugados com estreptavidina acoplada a peroxidase foram acrescentados ao sistema por adicionais 1 h; e anti-MIF por 2 h, todos em temperatura ambiente. Para MIF, as placas foram lavadas, e foi adicionado estreptavidina acoplada a peroxidase por mais 20 min. Por fim, as placas foram lavadas e foi acrescentado 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) para a detecção dos imunocomplexos e posteriormente foi adicionado H₂SO₄ para parar a reação. A leitura da placa foi realizada a 450 nm. Os dados foram demonstrados em pg/mL de acordo com a curva padrão. Três experimentos independentes em triplicata foram realizados. Limites de detecção para cada citocina: IL-4: 7,81 pg/mL; IL-6: 4,7 pg/mL; IL-8: 3,125 pg/mL, IL-10: 7,81 pg/mL e MIF: 31,25 pg/mL.

4.7 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 analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido de testes t com correção de Bonferroni-Holm. As condições comparadas foram: a)

extrato total salino de *S. venezuelensis* b) extrato de excreção/secreção de *S. venezuelensis* isolado e c) estímulos nas concentrações de 32, 8, 2, 0,5 ou 0,125 µg/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 ± desvio padrão (SD). A análises foram feitas no programa GraphPad Prism® Version 10 (GraphPad Software, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Os extratos total salino e o de excreção e secreção de *S. venezuelensis* não reduziram a viabilidade das células BeWo

O ensaio de viabilidade celular (MTT) foi realizado para investigar o potencial de toxicidade relacionado ao uso dos extratos total salino e de excreção/secreção de *S. venezuelensis* em células da linhagem BeWo, em uma ampla faixa de concentrações (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 $\mu\text{g/ml}$). Os resultados indicaram que, em todas as concentrações testadas, ambos os extratos não mostraram diferença significativa na viabilidade das células BeWo em comparação com o grupo controle, composto pelas células não tratadas (Figura 1).

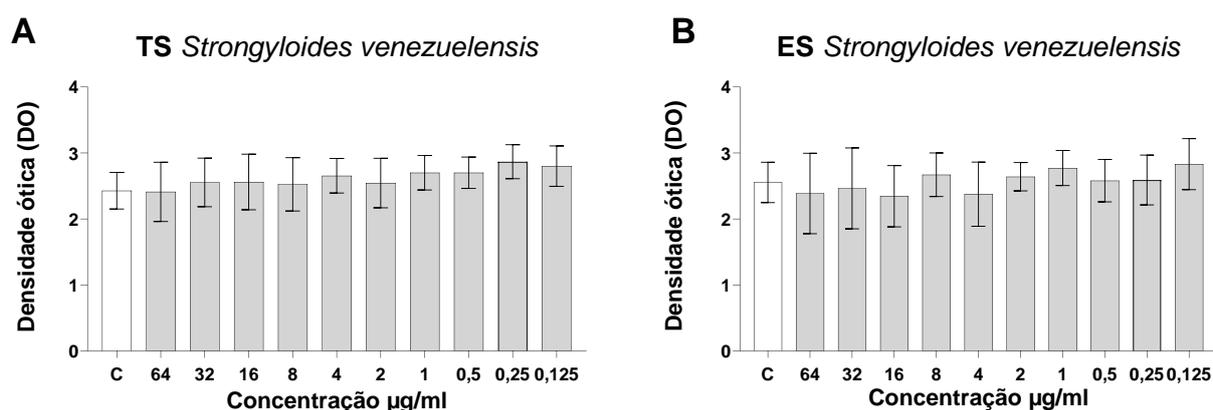


Figura 1. Viabilidade celular em células BeWo tratadas com extrato salino (TS, **A**) e de excreção/secreção (ES, **B**) de *Strongyloides venezuelensis* (concentração de 64 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Comparação entre células não tratadas (controle) e células tratadas feita por One-way ANOVA. Os dados são expressos em densidade ótica (DO).

5.2 Os extratos total salino e de excreção/secreção de *S. venezuelensis* em diferentes concentrações não afetaram a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo

Células BeWo foram infectadas e, após 3 horas, foram tratadas com as soluções de extrato total salino e de excreção/secreção nas concentrações 32, 8, 2, 0,5 e 0,125 µg/ml durante 24 horas. A avaliação da taxa de proliferação 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), utilizada para tratar toxoplasmose, serviu como controle positivo. SP diminuiu a reprodução do parasito quando comparada aos grupos controle negativo e em todas as concentrações de TS e ES de *S. venezuelensis*. Constatou-se que o tratamento de diferentes concentrações dos extratos não afetou a proliferação (Figura 2 A, B), assim como, não foi observada diferença, entre as preparações antigênicas, nas mesmas concentrações, para a proliferação de *T. gondii* (Figura 2 C). A figura 3 apresenta imagens representativas do ensaio nas condições controle e da concentração 32 µg/mL de TS e ES. No controle negativo é possível observar grande número de parasitos nos vacúolos parasitóforos, apontados por setas, assim como na concentração 32 µg/mL de ambas as preparações antigênicas. No tratamento com SP, observamos uma redução no número de parasitos.

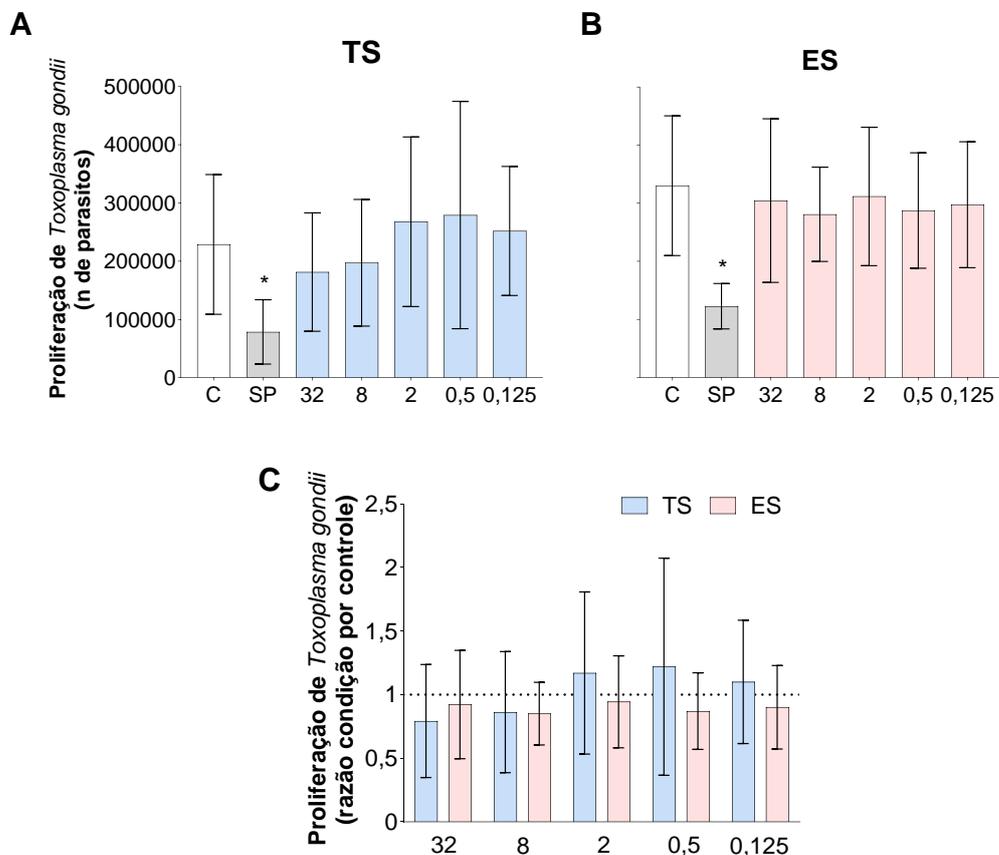


Figura 2. Proliferação de *Toxoplasma gondii*: quantificação de taquizoítos intracelulares pela reação enzimática da atividade da β -galactosidase. Células BeWo infectadas por *T. gondii* foram tratadas por 24 horas com extrato total salino (TS, **A**) e de excreção/secreção (ES, **B**) de *S. venezuelensis*, em concentrações de 32, 8 e 2, 0,5, 0,125 $\mu\text{g/ml}$. Controles experimentais: negativo (grupo C) - células BeWo infectadas mantidas apenas em meio e positivo (SP) adição de sulfadiazina + pirimetamina (grupo SP; 200+8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (A, B). Em **C**, a média do grupo C foi utilizada como fator de correção da proliferação de *T. gondii* nas diferentes condições de TS e ES, para posterior comparação. Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA (A e B). * $P < 0,05$.

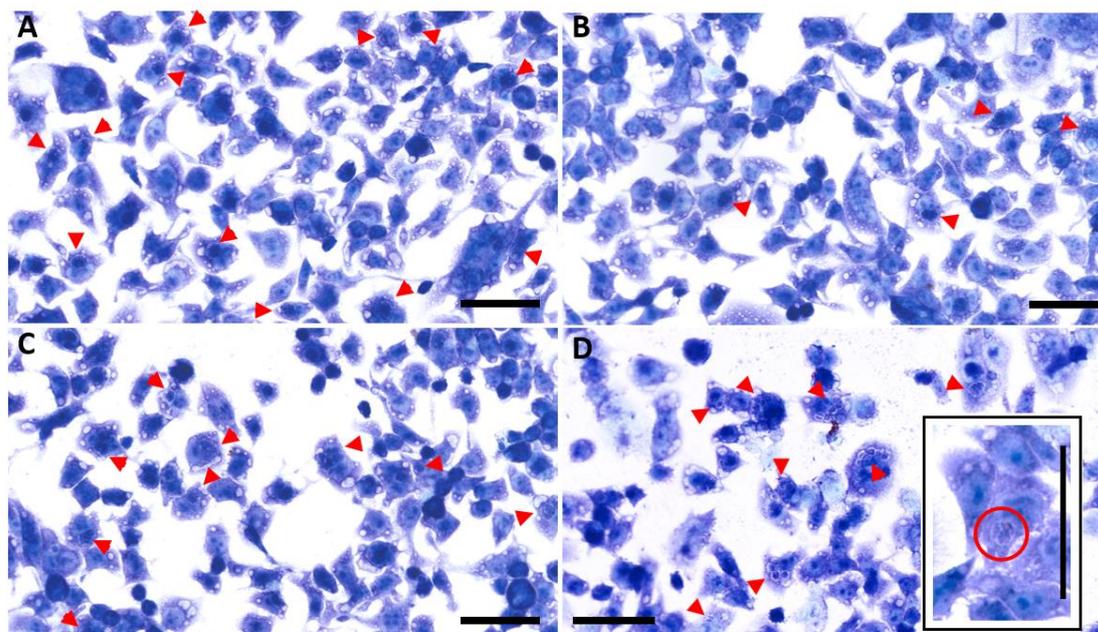


Figura 3. Ensaio de proliferação de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas BeWo. **A.** Controle negativo, não tratadas. **B.** Tratadas com a combinação de SDZ+PIR na concentração de 200+8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. **C.** Tratadas com extrato total salino (TS) na concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$. **D.** Tratadas com extrato de excreção/secreção (ES) na concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$. Vacúolos parasitóforos apontados pelas cabeças de setas (\blacktriangleright). Fotomicrografias ilustrativa da colorimetria de lamínulas com azul de toluidina. Escala da barra – 60 μm .

5.3 Avaliação de citocinas produzidas pela BeWo na infecção por *T. gondii* e coestímulo com o extrato salino total de *S. venezuelensis*

Os sobrenadantes das diferentes condições de células BeWo com o extrato total salino de *S. venezuelensis* e *T. gondii* foram submetidos ao ensaio ELISA para verificar o perfil de citocinas secretados (Figura 4). Em relação a produção de IL-4 não foi observada diferença significativa entre os grupos. No entanto foi visto que em concentração mais alta do extrato total salino (32 e 8 $\mu\text{g/mL}$) há uma maior produção de IL-4 (Figura 4 A). A produção de IL-6 teve uma diminuição significativa em células infectadas de todas as condições testadas quando comparadas a células não infectadas. A presença de TS em diferentes concentrações não alterou o padrão de diminuição da produção de IL-6 na infecção por *T. gondii* (Figura 4 B). Quanto a produção de IL-8, quando comparado os dois grupos, somente foi observada diferença significativa em relação ao grupo SP não infectado e infectado (Figura 4 C). A citocina IL-10 não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 4 D). Na produção de

MIF observou-se um aumento significativo da citocina no controle negativo e positivo no grupo de células infectadas com *T. gondii*. O estímulo de BeWo com TS de *S. venezuelensis* nas diferentes concentrações testadas induz níveis de produção de MIF semelhantes, independente da infecção com *T. gondii* (Figura 4 E).

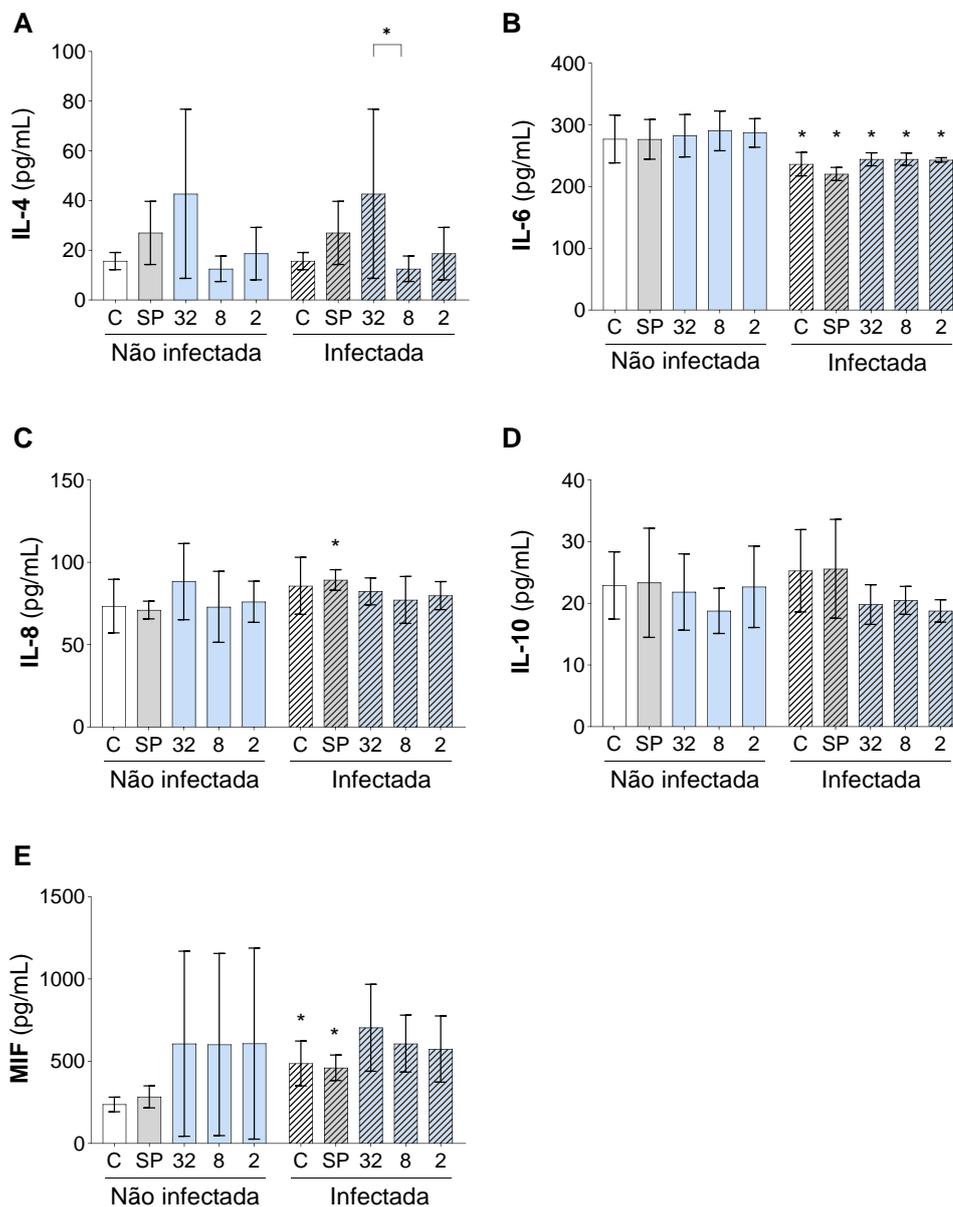


Figura 4. Análise do perfil de citocinas IL-4 (A), IL-6 (B), IL8 (C), IL-10 (D) e MIF (E) secretadas por células BeWo. Os sobrenadantes de células BeWo não infectadas e não tratadas, apenas tratadas (TS), apenas infectadas e infectadas e tratadas (TS) foram submetidos a dosagem de citocinas pelo ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão de cada citocina analisada. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste t seguido de correção para comparações múltiplas. * $P < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da infecção causada por *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2021). A infecção primária materna pode resultar em sequelas potencialmente graves para a saúde do feto, inclusive a morte intrauterina. A reativação de uma infecção latente em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles submetidos a transplantes de órgãos, pode ocasionar encefalite toxoplásmica fatal ou ainda na reagudização da infecção na gestante. Apesar de muitas vezes a infecção ser assintomática, a carga significativa imposta pelo parasito demanda a implementação de medidas eficazes para a prevenção, diagnóstico e tratamento desta doença (Saadatnia; Golkar, 2012; Brasil, 2018; Lourido, 2019).

A estrogiloidíase humana está listada entre as Doenças Tropicais Negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021). Isso, ocorre devido ao fato de que, embora possam ser letais, a maioria dos casos apresenta apenas sintomas clínicos leves ou mesmo assintomáticos e, quando os sintomas estão presentes, geralmente, são inespecíficos. Ademais, sua incidência ainda é, subestimada, dado que a detecção requer métodos diagnósticos específicos, os quais enfrentam desafios de sensibilidade e/ou especificidade. Apesar desse cenário, atualmente há uma crescente atenção voltada para a ameaça que a espécie *S. stercoralis* representa à saúde humana (Buonfrate *et al.*, 2023a).

A modulação da resposta imune em coinfeções parasitárias está sendo cada vez mais explorada pelas linhas de pesquisa nas últimas décadas, uma vez que, a infecção por um determinado parasito pode desencadear um padrão de resposta imune no hospedeiro, o qual pode afetar a infecção subsequente de outro parasito e alterar o resultado patogênico (Xu *et al.*, 2020). Ou seja, a doença advinda de um destes parasitos pode ser modulada devido à co-ocorrência das outras espécies, com impactos sinérgicos ou antagônicos no hospedeiro infectado (Degarege; Erko, 2016).

Dessa forma, o presente estudo investigou o estímulo dos extratos total salino e de excreção/secreção de *S. venezuelensis* nas células trofoblásticas (linhagem BeWo) infectadas por *T. gondii*. Inicialmente, verificamos o efeito dos extratos na viabilidade das células tratadas em diferentes concentrações. Para isso, o ensaio de MTT foi realizado para determinar as melhores concentrações

que não alterassem significativamente a viabilidade das células. As concentrações empregadas foram variadas, uma vez que não existe uma referência padronizada de *Strongyloides* na literatura. Portanto, decidimos testar uma ampla gama de concentrações. Os resultados revelaram que as células expostas ao tratamento não apresentaram alterações significativas em sua viabilidade. Este resultado é diferente de um estudo anterior que investigou o efeito do antígeno somático do nematódeo *Marshallagia marshalli*, nas concentrações 1 e 2 mg/mL, na inibição do crescimento celular de linhagem de leucemia mieloide humana (K562). Além do achado, discutiu a eficácia antitumoral de diferentes extratos de helmintos em várias linhagens celulares imortalizadas, dentre eles *Trichinella spiralis* e *Trichostrongylus colubriformis*. Nessa discussão, foi observado que a aplicação de diferentes concentrações dos extratos dos helmintos, em sua maioria, inibiu o crescimento das células tumorais (Raisnia *et al.*, 2022). Essa diferença pode estar relacionada às peculiaridades de cada célula cancerígena, por exemplo, a célula BeWo é uma célula possivelmente mais resistente; e também às distintas espécies de helmintos e suas preparações antigênicas. Devido à ausência de toxicidade dos estímulos com TS e ES, prosseguimos com os experimentos.

Tratamos as células BeWo infectadas com *T. gondii* por 24 horas com diferentes concentrações dos extratos total salino e de excreção/secreção de *S. venezuelensis*. Como o teste de MTT não indicou mudança na viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas, optamos por selecionar cinco delas para o teste de proliferação: uma concentração mais elevada, duas medianas e duas mais baixas.

Durante a análise, observou-se que o tratamento de diferentes concentrações dos extratos não afetou a proliferação, assim como, não foi observada diferença, entre as preparações antigênicas, nas mesmas concentrações, para a proliferação de *T. gondii*. Porém, a combinação de sulfadiazina e pirimetamina, como esperado, diminuiu a reprodução do parasito quando comparada aos grupos controle negativo em todas as concentrações de ambos os extratos de *S. venezuelensis*. O mesmo efeito não foi observado no estudo *in vivo*, em modelo de infecção não congênito, realizado por Araujo e colaboradores (2020). No estudo citado houve uma redução significativa 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*. Essa diferença destaca a complexidade da relação entre o helminto e o protozoário, evidenciando que as circunstâncias experimentais podem influenciar significativamente nos resultados. Embora o estudo *in vitro* proporcione controle experimental, ele pode não replicar integralmente as condições fisiológicas naturais, o que potencialmente limita a generalização dos resultados para o organismo como um todo. Compreender completamente os mecanismos subjacentes a essas interações em uma variedade de cenários – principalmente no contexto da infecção gestacional e transmissão congênita – é essencial para uma compreensão abrangente das respostas à strongiloidíase e suas possíveis implicações na infecção por *T. gondii*.

Os produtos antigênicos de helmintos estão sendo utilizados em trabalhos com coestímulos parasitários. Na literatura, estudos demonstraram efeitos promissores dos produtos helmínticos contra o *T. gondii*. Por exemplo, Khan e colaboradores (2008) relataram que a infecção precoce com o nematódeo intestinal de camundongos *Heligmosomoides polygyrus* pode suprimir a resposta de células TCD4+ e TCD8+, assim como a produção de IL-12 e IFN- γ . Em um modelo murino de coinfeção de *T. gondii* e *Fasciola hepatica* observou-se que a produção de citocinas Th1 específicas de *T. gondii* não é suprimida pela infecção por *F. hepatica*, mas a infecção por *T. gondii* inibe a capacidade dos esplenócitos de camundongos infectados por *F. hepatica* de produzir citocinas Th2 (Miller *et al.*, 2009b). Em contrapartida, foi mostrado que antígenos de *Taenia crassiceps* prejudicam a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzem uma resposta imune Th2 em modelo de camundongo com toxoplasmose (Dissanayake; Shahin; Ameen, 2005; Terrazas; Gómez-García; Terrazas, 2010).

A infecção por *T. gondii* é caracterizada, classicamente, por uma forte resposta Th1, enquanto *Strongyloides* desencadeia a produção de citocinas do tipo Th2. Como esses parasitos induzem perfis distintos de resposta imune examinamos se o tratamento com o ST alterou os níveis de citocinas produzidos pelas células BeWo. A infecção com *T. gondii* diminuiu a produção de IL-6, não revertida pelo tratamento com o extrato salino em células infectadas, enquanto na concentração mais alta (32 $\mu\text{g/mL}$) de TS houve uma maior produção de IL-4

quando comparada ao estímulo com 8 µg/mL. No estudo de Araujo e colaboradores, a IL-6 sérica e dosada no intestino delgado foi maior na condição infectada, mas reduziu seus níveis pós-tratamento com antígenos de *S. venezuelensis*; para a IL-4 não observaram diferenças entre controle, infectado e infectado + antígenos de *S. venezuelensis*.

IL-8 é uma citocina pró-inflamatória importante na interface materno fetal além de atuar como quimiocina para atrair células imunológicas (Mc Donald *et al.*, 2013). Na literatura, foi demonstrado que os antígenos solúveis dos ovos de *Schistosoma mansoni* aumentaram significativamente a secreção de IL-8 pelas células citotrofoblásticas isoladas de placenta humana (McDonald *et al.*, 2013). Em nosso estudo, não foi observado esse aumento.

A citocina IL-10 não exibiu diferença significativa entre os grupos, indicando que o extrato total salino não teve efeito mensurável nos níveis dessa citocina. Esse achado está em consonância com um estudo de Mc Donald e colaboradores (2013) no qual a citocina anti-inflamatória IL-10 não demonstrou alterações significativas após o tratamento de células citotroflobásticas com antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni*. Em contrapartida um estudo conduzido por Bahia-Oliveira e colaboradores (2009), observou uma redução *in vitro* nos níveis de IL-10 em indivíduos coinfectados por *T. gondii* e *Ascaris lumbricoides* e tratados com o extrato antigênico de *A. lumbricoides*. Esse aspecto pode favorecer a adaptação do *A. lumbricoides* ao hospedeiro, uma vez que a resposta imune protetora específica para aquele parasito é regulada negativamente. Assim, os níveis de IL-10 variam de acordo com vários fatores.

MIF é uma citocina pró-inflamatória produzida por várias células e desempenha um papel crucial na imunidade tanto inata quanto adaptativa, além de ser fundamental no controle de infecções por protozoários (Terrazas *et al.*, 2017). Barbosa e colaboradores (2014) demonstraram o papel protetor da MIF na infecção pelo *T. gondii* na interface materno-fetal. Os MIFs, ou MIFs-like, de nematoides induzem macrófagos alternativamente ativados em um ambiente polarizado por Th2, indicando que, dependendo do padrão de citocinas predominante, os MIFs de nematoides podem ter efeitos pró ou contra inflamatórios na resposta imune (Ajonina-Ekoti *et al.*, 2013). Nossos dados, em células BeWo indicaram um aumento significativo da citocina no controle negativo e positivo no grupo de células infectadas com *T. gondii* em comparação

com a condição não infectada. Não foi observada tal alteração do nível de citocina na presença de *S. venezuelensis*, isto é, o estímulo com TS, mesmo na infecção com *T. gondii*, impediu o aumento de MIF que teria comprometido o controle da infecção? Poderia ser especulado que os níveis não alterados de MIF nas condições que envolveram TS de *S. venezuelensis* seria de reatividade cruzada na detecção de MIF do helminto. MIF tem uma estrutura evolutiva antiga e altamente conservada (Prieto-Lafuente *et al.* 2009). Em *S. rattii* já foi identificado uma proteína MIF-like, principalmente, secretada em larvas infectantes L3 (Younes *et al.*, 2012).

A presença simultânea de helmintos modifica a habilidade do organismo hospedeiro de reagir de forma adequada à infecção por protozoários. Embora os efeitos imunomoduladores da resposta Th2 induzida pelos helmintos sejam amplamente reconhecidos na imunidade do hospedeiro, evidências contraditórias sugerem efeitos tanto de aumento quanto de inibição na capacidade de resistência imunológica à infecção simultânea por patógenos não relacionados (Rovira-Diaz *et al.*, 2022). Essa contradição pode estar relacionada a diferentes paradigmas de tratamento/cultura, bem como em técnicas de medição de citocinas. Dessa forma, ainda não está claro se a infecção por helmintos aumenta ou reduz a imunidade do hospedeiro em situações de coinfeção. A dosagem de citocinas nas condições de ES, considerando a diferença entre os extratos, pode colaborar no entendimento da resposta.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que o extrato total salino e de excreção/secreção de *S. venezuelensis* não apresentaram toxicidade as células BeWo, assim como não alteraram a proliferação intracelular de *T. gondii*. Ademais, foram observadas alteração no padrão das citocinas das células tratadas com extrato total salino tais em algumas condições. Na maior concentração testada de TS (32 ug/mL) há maior produção de IL-4 na célula infectada. O TS não alterou o padrão de diminuição da produção de IL-6 na infecção por *T. gondii*. A estimulação de BeWo com *S. venezuelensis* TS em diferentes concentrações induz níveis semelhantes de produção de MIF, independente da infecção por *T. gondii*.

Logo, os resultados destacam a complexidade da interação helminto e protozoário. A explicação dos processos subjacentes a essas relações é essencial para uma compreensão completa das respostas na estrogiloidíase e suas possíveis implicações na infecção por *T. gondii*.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.; SOOD, A.; GUPTA, J. Toxoplasmosis in pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 255, p. 44–50, dez. 2020.

AJONINA-EKOTI, I. et al. Comparative analysis of macrophage migration inhibitory factors (MIFs) from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus* and the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 9, p. 3335–3346, 3 jul. 2013.

ARAUJO, 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.; SAEIJ, J. J. P. *Toxoplasma* Effectors that Affect Pregnancy Outcome. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 4, p. 283–295, abr. 2021.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Host immune response to *Toxoplasma gondii* and *Ascaris lumbricoides* in a highly endemic area: evidence of parasite co-immunomodulation properties influencing the outcome of both infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 273–280, 1 mar. 2009.

BARBOSA, B. F. et al. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152–162, mar. 2014.

BLADER, I. J. et al. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 463–485, 15 out. 2015.

BLAXTER, M. L. et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 71–75, mar. 1998.

BONNE-ANNÉE, S.; HESS, J. A.; ABRAHAM, D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. **Immunologic research**, v. 51, n. 2-3, p. 205, 1 dez. 2011.

BORGES, M. et al. How does toxoplasmosis affect the maternal-foetal immune interface and pregnancy? **Parasite Immunology**, v. 41, n. 3, p. e12606, 19 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo de Notificação e Investigação: Toxoplasmose gestacional e congênita. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. p. 4-28.

BRELOER, M.; ABRAHAM, D. *Strongyloides* infection in rodents: immune response and immune regulation. **Parasitology**, v. 144, n. 3, p. 295–315, 24 fev. 2016.

BUONFRATE, D. et al. Human strongyloidiasis: complexities and pathways forward. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, 20 dez. 2023b.

BUONFRATE, D. et al. *Strongyloides*: omics to worm-free populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 379, n. 1894, 27 nov. 2023a.

BUONFRATE, D. et al. The Global Prevalence of *Strongyloides stercoralis* Infection. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 468, 13 jun. 2020.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83–89, fev. 2007.

CARVALHO, Edson Fernando Goulart de. Produtos de excreção/secreção de *Strongyloides venezuelensis*: Aplicação ao diagnóstico da estrogiloidíase e caracterização de proteínas imunorreativas. 2019. 98f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

CASTELLETTO, M.L., AKIMORI, D., PATEL, R., SCHROEDER, N.E. and HALLEM, E.A. Introduction to *Strongyloides stercoralis* Anatomy. In *WormAtlas*.

CHALLIS, J. R. et al. Inflammation and Pregnancy. **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 2, p. 206–215, fev. 2009.

COSTA -CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R.W. A. Parasitologia Humana. 12. ed., São Paulo: Atheneu, 2011. p. 295-305.

COSTA, I. N. et al. Biogenic Silver Nanoparticles Can Control *Toxoplasma gondii* Infection in Both Human Trophoblast Cells and Villous Explants. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 623947, 21 jan. 2021.

COUTO, B. P. DO 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, 1 abr. 2020.

DEGAREGE, A.; ERKO, B. Epidemiology of *Plasmodium* and Helminth Coinfection and Possible Reasons for Heterogeneity. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

DEKEL, N. et al. REVIEW ARTICLE: Inflammation and Implantation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 1, p. 17–21, 14 dez. 2009.

DISSANAYAKE, S.; SHAHIN, A.; AMEEN, A. M. Adjuvant effect of *Taenia crassiceps* glycans against leishmanial antigens in mice infected with *Leishmania mexicana*. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 12, p. 1495–1502, 1 ago. 2005.

DOTTERS-KATZ, S.; KULLER, J.; HEINE, R. P. Parasitic infections in pregnancy. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 66, n. 8, p. 515–525, ago. 2011.

DUBEY, J. P. Chapter 1 - The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* (Third Edition). Eds. L. M. Weiss and K. Kim (Academic Press), 2020. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00001-3

DUBEY, J. P. et al. Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. **Parasitology**, v. 148, n. 12, p. 1406–1416, 18 jun. 2021.

DUBEY, J. P. Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 112, 2010.

DUNN, D. et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **The Lancet**, v. 353, n. 9167, p. 1829–1833, maio 1999.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 793–813, 1 nov. 2012.

ENAS, F. A. H. et al. *Toxoplasma gondii* Suppresses Th2-Induced by *Trichinella spiralis* Infection and Downregulates Serine Protease Genes Expression: A Critical Role in Vaccine Development. **Iranian Journal of Parasitology**, 16 jul. 2023.

FALLAHI, S. et al. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 47, n. 3, p. 133–140, 1 mar. 2018.

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, 9 mar. 2023.

FISCH, D.; CLOUGH, B.; FRICKEL, E.-M. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 12, p. e1008097, 12 dez. 2019. GIGLEY, J. P. The Diverse Role of NK Cells in Immunity to *Toxoplasma gondii* Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 2, p. e1005396, 25 fev. 2016.

FITZGERALD, J. S. et al. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 4, p. 335–344, 2 abr. 2008.

GARCIA-MÉRIC, P. et al. Prise en charge de la toxoplasmose congénitale en France : données actuelles. **La Presse Médicale**, v. 39, n. 5, p. 530–538, maio 2010.

GAZZINELLI, R. T. et al. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 13, p. 6115–6119, jul. 1993.

GEISINGER, F.; STEEN, H.; BRATTIG, N. W. Life cycle stage-resolved proteomic analysis of the excretome/secretome from *Strongyloides ratti* - Identification of stage-specific proteases. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, M1 11.010157, 2011.

GENTA, R. M.; FREI, D. F.; LINKE, M. J. Demonstration and partial characterization of parasite-specific immunoglobulin A responses in human strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 1505–1510, 1 ago. 1987.

GIGLEY, J. P. The Diverse Role of NK Cells in Immunity to *Toxoplasma gondii* Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 2, p. e1005396, 25 fev. 2016.

GONZAGA, H. T., RIBEIRO, V. da S., CUNHA-JÚNIOR, J. P., UETA, M. T., COSTACRUZ, 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

HARNETT, W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 130–136, 1 jul. 2014.

JEFFERS, V. et al. A Latent Ability to Persist: Differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 75, n. 13, p. 2355–2373, 1 jul. 2018.

JONES, J.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. **American Family Physician**, v. 67, n. 10, p. 2131–2138, 15 maio 2003.

KHAN, I. A. et al. Coinfection with *Heligmosomoides polygyrus* Fails To Establish CD8+ T-Cell Immunity against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1305–1313, 14 jan. 2008.

KHAN, I. A.; MORETTO, M. Immune responses to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 77, p. 102226, ago. 2022.

LOURIDO, S. *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 11, p. 944–945, nov. 2019.

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

LUVIRA, V. et al. *Strongyloides stercoralis*: A Neglected but Fatal Parasite. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 10, p. 310, 1 out. 2022.

MARCOS, L. A. et al. Update on Strongyloidiasis in the Immunocompromised Host. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 1, p. 35–46, 1 dez. 2010a.

MCDONALD, E. A. et al. Schistosome Egg Antigens Elicit a Proinflammatory Response by Trophoblast Cells of the Human Placenta. v. 81, n. 3, p. 704–712, 1 mar. 2013.

MCLEOD, R. et al. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 320–344, mar. 2009.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D. C.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 11, p. 487–495, nov. 2011.

MILLER, C. M. D. et al. Immunological Interactions between 2 Common Pathogens, Th1-Inducing Protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-Inducing Helminth *Fasciola hepatica*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5692, 25 maio 2009b.

MILLER, C. M. et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23–39, jan. 2009a.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. [s. l.], v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MOR, G.; CARDENAS, I. The Immune System in Pregnancy: a Unique Complexity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 425–433, 29 mar. 2010.

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, dez. 1983.

MOTA-FERREIRA, D. M. L. et al. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 109, n. 2, p. 103–107, 1 fev. 2009.

MUKHOPADHYAY, D.; SAEIJ, J. P. J. Assays to Evaluate *Toxoplasma*-Macrophage Interactions. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2071, p. 347–370, 2020.

NAST, R.; CHOEPAK, T.; LÜDER, C. G. K. Epigenetic Control of IFN- γ Host Responses During Infection With *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 25 set. 2020.

OLIVEIRA, Marina Ranhel. Avaliação da atividade da prednisolona e do extrato salino de *Strongyloides venezuelensis* em células trofoblásticas humanas (BeWo) infectadas por *Toxoplasma gondii*. 2023. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.

OMS. Organização Mundial da Saúde. *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030*. Jan. 2021.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for

- pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385–1394, out. 2009.
- PRIETO-LAFUENTE, L. et al. MIF homologues from a filarial nematode parasite synergize with IL-4 to induce alternative activation of host macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 5, p. 844–854, 29 jan. 2009.
- REYHANE RAISNIA et al. Anti-Tumor Effect of *Marshallagia marshalli* Somatic Antigen on Inhibition Cell Growth of K562. **Iranian Journal of Parasitology**, 28 mar. 2022.
- REZENDE-OLIVEIRA, K. et al. Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. **Placenta**, v. 33, n. 9, p. 682–687, 1 set. 2012.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*. [s. l.], v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
- ROVIRA-DIAZ E. et al. The Impact of Helminth Coinfection on Innate and Adaptive Immune Resistance and Disease Tolerance during Toxoplasmosis. **Journal of Immunology**, v. 209, n. 11, p. 2160–2171, 17 out. 2022.
- SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 805–814, 1 nov. 2012.
- SANA, M. et al. Immune response against toxoplasmosis—some recent updates RH: *Toxoplasma gondii* immune response. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 36, p. 039463202210784, jan. 2022.
- SILVA, L. A.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; VITOR, R. W. Genetic polymorphisms and phenotypic profiles of sulfadiazine resistant and sensitive *Toxoplasma gondii* Isolates obtained from newborns with congenital toxoplasmosis in minas gerais Brazil. **PLoS ONE**. [s. l.], v. 12, e0170689, 2017.
- SOBLIK, H.; YOUNIS, A. E. MITREVA, M.; RENARD, B. Y.; KIRCHNER, M.;
- SOUZA, W. DE et al. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131–143, 22 fev. 2010.
- 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. e180222201280, 2022.
- STRAUBINGER, K.; PRAZERES DA COSTA, C. Maternal helminth infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 828, p. 27–48, 2014.
- TERRAZAS, C. A.; GÓMEZ-GARCÍA, L.; TERRAZAS, L. I. Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic

- cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 9, p. 1051–1062, 1 ago. 2010.
- TERRAZAS, C.; STOCK, J. C.; KIMBLE, J.; MORETTI, E.; VARIKUTI, S.; SATOSKAR, A. R. The role of MIF in parasitic infections. In: Bucala R, Bernhagen J, editors. *MIF Family Cytokines in Innate Immunity and Homeostasis*. Cham: Springer International Publishing. p. 203-219, 2017
- THAENKHAM, U.; CHAN, A. From past to present: opportunities and trends in the molecular detection and diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, 11 abr. 2023.
- THAMSBORG, S. M. et al. *Strongyloides* spp. infections of veterinary importance. **Parasitology**, v. 144, n. 3, p. 274–284, 1 mar. 2017.
- TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J.-G. Strongyloidiasis with Emphasis on Human Infections and Its Different Clinical Forms. **Advances in Parasitology**, v. 88, p. 165–241, 1 abr. 2015.
- VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 4, n. 1, 30 maio 2006.
- VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; DE LEÓN-NAVA, M. A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine Mechanisms Associated with Resistance or Susceptibility to Parasitic Diseases during Pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 114–121, 2009.
- VELOSO, M. G. P.; PORTO, A. S.; MORAES, M. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*: relato de caso autopsiado. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 413–415, ago. 2008.
- VINEY M.E., LOK J.B. The biology of *Strongyloides* spp. (July 16, 2015), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook,
- WEISS, L. M.; DUBEY, JITENDER. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895–901, 1 jul. 2009.
- WILBERS, R. H. P. et al. Secreted venom allergen-like proteins of helminths: Conserved modulators of host responses in animals and plants. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 10, p. e1007300, 18 out. 2018.
- WILLE, U. et al. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 6, p. 291–296, jun. 2001.
- WIKMAN-JORGENSEN, P.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; LLENAS-GARCÍA, J. A Review on Strongyloidiasis in Pregnant Women. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 12, p. 219–225, set. 2021.

WOLFE, M. W. Culture and Transfection of Human Choriocarcinoma Cells. **Placenta and Trophoblast**, p. 227–238, [s.d.].

XU, F. et al. Prior *Toxoplasma Gondii* Infection Ameliorates Liver Fibrosis Induced by *Schistosoma japonicum* through Inhibiting Th2 Response and Improving Balance of Intestinal Flora in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2711, 14 abr. 2020.

YAN, C. et al. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 10 mar. 2016.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109–121, 24 jan. 2014.

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 and Infection**, v. 14, n. 3, p. 279–289, mar. 2012.

ZEINALI, S. et al. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among women with miscarriage and their aborted fetuses in the northwest of Iran. **PloS One**, v. 18, n. 10, p. e0283493, 2023.

ZHAO, X.-Y.; EWALD, S. E. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 7, p. 3370–3380, 1 jul. 2020.