



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Jorge Lucas Nascimento Souza

**ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA INFECÇÃO
POR *Ascaris suum* E O IMPACTO NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA DE MAMA
MURINO 4T1**

Belo Horizonte/MG

2024

JORGE LUCAS NASCIMENTO SOUZA

**ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA INFECÇÃO
POR *Ascaris suum* E O IMPACTO NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA DE MAMA
MURINO 4T1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Parasitologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito à obtenção do título de
Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Co-orientador: Prof. Dr. Remo Castro Russo

Belo Horizonte/MG

2024

043

Souza, Jorge Lucas Nascimento.

Aspectos fisiopatológicos da inflamação crônica na infecção por *Ascaris suum* e o impacto na progressão do carcinoma de mama murino 4T1 [manuscrito] / Jorge Lucas Nascimento Souza. – 2024.
287 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno. Co-orientador: Prof. Dr. Remo Castro Russo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Ascaridíase. 3. Neoplasias da Mama. 4. Fatores de Risco. 5. Inflamação. I. Bueno, Lilian Lacerda. II. Russo, Remo Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TÍTULO DA TESE: "ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA INFECÇÃO POR ASCARIS SUUM E O IMPACTO NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA DE MAMA MURINO 4T1"

ALUNO: JORGE LUCAS NASCIMENTO SOUZA

TESE: 357/2024/06

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **sete de junho de 2024**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Kenneth John Gollob

Membro externo - Instituto Einstein

Soraya Gaze Jangola

Membro externo - IRR/FIOCRUZ

Flávio Almeida Amaral

Membro interno - UFMG

Vanessa Pinho da Silva

Membro interno - UFMG

Remo de Castro Russo

Coorientador - UFMG

Lílian Lacerda Bueno

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 07 de junho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Lacerda Bueno, Professora do Magistério Superior**, em 10/06/2024, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Pinho da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 10/06/2024, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 10/06/2024, às 12:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraya Torres Gaze Jangola, Usuário Externo**, em 10/06/2024, às 13:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kenneth John Gollob, Usuário Externo**, em 13/06/2024, às 10:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Professor do Magistério Superior**, em 11/11/2024, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3248991** e o código CRC **9A32D50C**.

JORGE LUCAS NASCIMENTO SOUZA

Esta tese foi desenvolvida no *Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos* (LICP) do Departamento de Parasitologia no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob orientação da Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno e co-orientação do Prof. Dr. Remo Castro Russo do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar do Departamento de Biofísica e Fisiologia do ICB/UFMG. Além disso, contou com a parceria e envolvimento dos Laboratórios de Patologia Comparada (LPC) do Departamento de Patologia ICB/UFMG e do Laboratório de Radioisótopos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

COLABORADORES:

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Profa. Dra. Luísa Dias Mourão Magalhães

Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/UFMG

Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar

Prof. Dr. Remo de Castro Russo

Departamento de Patologia – ICB/UFMG

Laboratório de Patologia Comparada

Prof. Dr. Giovanni Dantas Cassali

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Farmácia/UFMG

Laboratório de Radioisótopos

Profa. Dra. Simone Odília Antunes Fernandes

Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, João Câmara e Rosa Maria, e, meu irmão, Isaac Nascimento

Pelo exemplo de dedicação, amor e respeito com os filhos a ser seguido;

Por comemorar minhas vitórias como se elas fossem as próprias, até porque as aflições e alegrias dessa fase eu não vivi sozinho. Obrigado por serem meus primeiros assistentes de laboratório e por todo caminho percorrido desde 2013 quando tudo começou.

Aos meus avós, Juvenal Ferreira e Sebastiana Penha (in memoriam)

Por sempre me ensinarem que tudo na nossa vida, quando gostamos, tem que ser feito com muito amor e dedicação;

Por sempre me apoiarem e por desejarem ao máximo ver o neto mais velho chegando aonde chegou. Sim! O primeiro neto de vocês se tornou Doutor.

À Maria Audenora (in memoriam) e a todas as mulheres e familiares que enfrentam a difícil jornada de lutar contra o câncer

Por toda coragem, força, esperança e amor inabaláveis que são fontes de inspiração para todos nós. Que este trabalho possa contribuir, de alguma forma, para iluminar o caminho na busca por melhores cuidados. A resiliência de vocês e determinação são verdadeiros exemplos de amor e superação.

...com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, e sempre, a **Deus**, pelo dom da vida, coragem, fortalecimento e saúde ao longo dessa jornada. À **Nossa Senhora** pelas interseções até esse momento.

Aos meus pais (**Rosa e João**), por todo investimento em educação de qualidade e por acreditar que eu era capaz de chegar até aqui. E aqui estou. Cheguei! Estou longe, mas com o coração cheio de gratidão. Aos meus familiares, tios e tias, primos e primas, agradeço a paciência e ao entender as minhas ausências nos encontros de família.

Aos meus avós **Juvenal Nascimento e Sebastiana Penha** (minha eterna alemã) – *In memoriam* – mesmo não estando mais aqui, com certeza estariam vibrando como se essa vitória fosse deles. Obrigado por terem dedicado boa parte de suas vidas a cuidarem de mim. Até hoje me lembro de vocês falando quando eu era criança “*estude pra ser um doutor no futuro*”. E aqui estou! O neto de vocês se tornou de fato Doutor.

A partir daqui peço licença para usar este espaço de uma forma peculiar, quase íntima, de uma característica que me define. Falar! E falar com o coração. Aqui, expresso minha eterna gratidão às pessoas que cruzaram meu caminho a partir de 2019-2020, quando decidi recomeçar minha vida do zero e apostar que tudo daria certo, mesmo sem garantias, para viver em uma cidade sem parentes e ninguém tão próximo. Sempre acreditei que a vida fosse cheia de propósitos e encontros, e alguns deles merecem ser celebrados com palavras sinceras que eternizem sua importância. Ser cientista em um país como o Brasil de fato não é uma tarefa muito fácil. Não seria honesto da minha parte romantizar e fingir que tudo desenrolou sem o meu famoso “eu estou desequilibrado”. Mas aproveito também para transformar este momento em um mosaico de histórias divertidas e engraçadas, que, de fato, foram fundamentais para dizer que encerro meu doutorado com uma carga de muitas histórias e desafios, mas também com muitos risos e a leveza que muitos me ajudaram a carregar por onde eu fosse. E com algo que somente eu posso carregar: **O aprendizado**, e ao mesmo tempo devolver: **“o ensinar para os próximos que virão”**. Isso é o que eu deixo para a sociedade. E, claro, além das discussões acadêmicas, deixo as intermináveis frases ditas por um nordestino nesses últimos 4 anos morando em Belo Horizonte: *Minha gente, isso não é canjica, é munguzá! Biscoito? Isso é bolacha! Polly é diferente de lapiseira! Calor? Um frio desse!*

Aqui começo agradecendo ao professor **Ricardo Fujiwara** por me proporcionar a visita ao laboratório em 2019 e me fazer repensar em trocar a Fiocruz/RJ pela UFMG. Agradeço muito a confiança, as conversas, os conselhos e oportunidades, incluindo poder participar

melhor como representante jovem da Sociedade de Parasitologia. E claro, por me apresentar minha atual orientadora, **Lilian Bueno**.

À minha orientadora **Lilian Lacerda Bueno** por ter aceitado me orientar nesse projeto totalmente novo, e como ela mesma fala, totalmente fora da zona de conforto, me dando todo suporte e estrutura para que tudo isso fosse possível. Foram muitos aprendizados em tão pouco tempo, muitos contatos com grandes pesquisadores em diferentes áreas e diferentes oportunidades em grandes projetos. Obrigado por toda confiança durante esse tão curto intervalo de tempo. Agradecimento sem fim pela liberdade em deixar eu executar minhas ideias, as vezes meio loucas, mas que no final tinham sentido. *“Ok, pode conduzir da forma que achar melhor.” “Uai, você não está achando que vai dar certo? Tô confiando em você! Vai lá e pode fazer”* E pensar que tudo começou com um *“Olha, eu vou te aceitar, mas nós vamos aprender juntos em relação a esse tema, porque é uma área totalmente nova para dois parasitologistas”* e aqui estamos nós depois disso tudo. Minha eterna gratidão. E vamos continuar porque ainda temos muito trabalho pela frente!

Ao meu co-orientador **Remo Russo** pela total confiança (literalmente), em deixar o laboratório sob total administração na minha mão, pelos inúmeros ensinamentos de fisiologia pulmonar, pelas inúmeras parcerias em diferentes projetos envolvendo doenças pulmonares, pelas diferentes conversas, trocas de experiências e por toda capacitação para manipular o espirômetro e rodar todas as mecânicas. Com certeza o Jorge de 2020 não acreditaria se o Jorge de agora falasse pra ele que um dia ele dominaria todos aqueles botões e parâmetros. Gratidão.

Ao Dr. **Diego Reis**, hoje pesquisador na Inglaterra, por me introduzir no mundo do câncer, me ensinar tudo sobre o 4T1 e me ajudar no início com a chegada do primeiro vial ao laboratório.

Ao professor **Geovanni Cassali** por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Patologia Comparada e ter me proporcionado momentos de muito aprendizado no mundo do câncer com toda sua experiência e paciência. *“Ah, tu és aquele garoto nordestino que fez rotina diagnóstica comigo! O que fez tu sair do Nordeste para cá garoto? E o que te fez abandonar os parasitos para o câncer?”*. E no final, acabei virando o Jorge/Parasito. Obrigado por todo carinho, ensinamentos e paciência nas mais de (1000 lâminas?). Agradecimento também por me proporcionar a interação com toda sua equipe, em especial à **Fernanda Rezende, Evelyn e Thaynan**. Vocês também fazem parte desse momento e de todos de alegria ao longo desse tempo dividindo as experiências de morar longe da família e deixando tudo mais leve e divertido. Claro, apesar de serem “patologistas raízes”, obrigado DEMAIS, por ajudar com uma

parte das necropsias e das descrições *post-mortem*. Thaynan especialmente por mesmo assim não me abandonar após eu descobrir que ela estava no mesmo barco que eu.

Aos professores **Simone e Valbert** que também me proporcionaram um mundo de aprendizado e abriram as portas do Laboratório de Radioisótopos com muito entusiasmo e vontade de colaborar. Sem vocês, com certeza muitos resultados deste trabalho não seriam possíveis. O entusiasmo de vocês desde a marcação de um 5'FU, até um Meropenem é impossível não se contagiar e não querer sair formulando ligações químicas para ligar Tecnécio em tudo. Agradecimento especial também aos alunos, especialmente **Luiz, Amanda (mice), Kátia, Amanda e Adrielle** pela ajuda nos experimentos, trocas de experiência e parceria. “*Quem pode ir amanhã no hospital buscar Tecnécio?*”.

Às minhas companheiras de doutorado e eternas professoras, PlasToxCAs (*Plasmodium*, *Toxocara*, Câncer e *Ascaris*) Docs **Thais Leal (tata-box), Chiara (ChiChis Almeida), Camila (WeirdoLopes) e Flaviane Vieira (Flávis)**. Gratidão sem fim a vocês que me ensinaram praticamente toda dinâmica do laboratório quando cheguei no auge da pandemia, ainda todo perdido. Pena que parte de vocês continuou nessa reta final comigo, mas agradeço poder compartilhar as aflições com vocês e viver os momentos de incertezas fazendo experimentos na época na pandemia todos longe da família, fazendo as trocas no biotério, nos experimentos intermináveis, nas madrugadas frias (congelantes), rir da cara dos seguranças quando saíamos às 2 da manhã e voltávamos às 5 e ainda era o mesmo segurança... enfim! Foram muitas histórias e com certeza conviver com vocês tornou tudo muito mais leve. “*Do you believe in life after love? // Gente, o intestino tá podre hoje! // Mande notícias do mundo de lá*”

Aos outros membros do LICP que chegaram depois e ajudaram a tornar esse momento possível. E sempre que possível botando a mão na massa nos experimentos... muito obrigado pelas conversas e toda ajuda **Isabela (Isa Dda.), Andressa (Andrew), Taty (Tatão)**. Agradecimento sem fim a cada momento compartilhado, troca de experiência e por estarem ao meu lado, por todo trabalho em equipe. Especialmente a **Isa** e **Andressa** que no início pareciam muito empolgadas em participar do meu projeto, especialmente em manipular material radioativo, mas quando viram a parte do: pesar mais de 5000 tubos e não me mataram, com certeza merecem um bônus ♥

Não poderia deixar de agradecer aos ICs que passaram por mim. Sem dúvida cada um de vocês deixou uma marca e me ensinaram muito. Vocês não imaginam a gratidão que eu tenho de cada um e pelos caminhos que vocês estão traçando. Obrigado por permitir que eu

compartilhasse um pouco das minhas experiências em laboratório com vocês, só esquecer a parte do: “*eu tô louco*” e tá tudo certo. Agradeço demais a **Ana Rafa**, que adora biomol e me fez reviver meu lado “*Jorge caderno amarelo do mestrado*” e a **Izabela** que só você mesmo pra saber o carinho e orgulho que eu sinto de você, mais ainda por querer continuar trabalhando com câncer. “*Iza, vamos descongelar nossas filhas hoje*”. Agradecimento também a **Luisa**, na época IC nova, mas que formou o trio com Ana e Iza, e que faziam o possível e impossível pra me ajudar nos experimentos intermináveis. Literalmente as meninas superpoderosas para fazer milagre com o horário. Agradecimento eterno também ao **Matheus e a Reysla**, que também muito me ajudaram nas curvas e nas padronizações no início do trabalho. E óbvio, ao IC mais novo, o **Getúlio (vargas)**, que sempre tá disponível pra ajudar, pra aprender, pra fazer, acontecer e, claro, me presentear com um prestigão ou cocada quando os dias são BEM LONGOS.

Aos demais membros do LICP, **Ramayana** que vem desde Natal nessa aventura, **Jordânia, Ana Cristina, Ana Laura, Carol Amado e Raquel** pelas horas felizes, troca de experiências e os cafezinhos da tarde. À **Letícia** (LetsPêxoto), pelas conversas aleatórias, discussão dos mecanismos de ação de diferentes medicamentos, os mil pedidos e etc. Agradecimento também a **Miche**, que muito conversou comigo, compartilhou experiências, me apresentou o laboratório no início e todo funcionamento, incluindo toda parte organizacional, o que foi fundamental para eu conseguir me organizar com todas amostras. À **Luisa Magalhães** pela troca de experiências, ensinamentos com citometria (que não terminará nem tão cedo) e pelas intermináveis conversas.

Ao Bryan e Marcelo, que chegaram na reta final, mas conseguiram me ajudar bastante fazendo total diferença. Sem palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram em tão pouco tempo. Com a chegada de vocês estou vendo que tô ficando pra titio no lab! A vanguarda oficialmente chegou pra mim.

Agradecimento mais que especial e sem fim ao **Giovani Lacerda** por todo apoio, conselhos, pela ajuda na formatação da tese, todo aporte emocional e toda assistência que precisei em Belo Horizonte. Você diversas, sem saber, foi essencial nos momentos de inseguranças e por proporcionar momentos de alegria. Além disso, por ter me apresentado sua família, a qual me deu todo apoio que precisei, e por isso, meu eterno agradecido a **família Leocádio e Rose Lacerda** pelas risadas, momentos distrações, cafés da tarde, almoços e churrascos, sendo literalmente minha família em BH, especialmente a **Tia Gabi** que por muitas vezes mais se preocupou se eu tomei café, almocei ou jantei do que eu mesmo. “*Sai desse*

computador sô e vem tomar um cafezinho” “ôôôôô Jorge meu filho, já comeu?”. Todo esse carinho e cuidado fizeram total diferença.

Agradecimento especial à **Maria Audenora (in memorian)**, uma grande mulher, professora da UERN e exemplo de inspiração para muitas pessoas, incluindo para mim. Infelizmente você se foi muito jovem devido ao câncer, e na época, uma das pessoas que me inspiraram a querer entrar na pesquisa no mundo do câncer e a investir na carreira acadêmica foi você. A minha persistência em continuar e investir nesta tese, nasceu graças a você. Hoje ficam as lembranças e a amizade com seus filhos, **Rodrigo Samir** e **Ralina Martins**. Meu eterno obrigado!

Aos meus **professores da UFRN**, principalmente, aos que me incentivaram a tentar a seleção no programa de parasitologia da UFMG. Obrigado a todos vocês! Saibam que toda minha base, tudo que sou foi por vocês! Desde os professores da Zoologia, até os da imuno/parasito, a UFRN sempre foi minha casa durante 7 anos e eu nunca canso de falar aqui em Minas o quanto a UFRN me ensinou e o quanto eu tento transmitir o que aprendi aí e as grandes inspirações que tenho e os exemplos que tive para seguir. Meu muito obrigado **UFRN** pelo exemplo de instituição pública de qualidade!

E claro, a todos os **professores da UFMG** que fizeram parte da minha formação como doutor, **especialmente aos da parasitologia**, os quais convivi e tive boa parte das minhas disciplinas, mas também aos da oncologia/patologia, imunologia das análises clínicas e toxicológicas da faculdade de farmácia. Foi uma honra ter aula com muitos dos professores dos meus professores! Com professores de capítulos de livros ou com grandes nomes que eu só conhecia por artigos científicos ou que eu só tinha visto na TV. Foi muita coisa em tão pouco tempo (e ainda em uma pandemia no meio) que só nos faz perceber que nós como profissionais ainda temos muito a aprender. Obrigado UFMG por tanto!

Eu não poderia deixar de agradecer a **Sumara e a Sibeles**, por todo apoio, carinho e competência na secretaria do programa da pós-graduação, tanto com a pré-vinda para BH e durante meus dias de doutorado. A tranquilidade de vocês era tanta com as coisas que eu achava que tinha algo errado com a minha bolsa e vocês não queriam me falar kkkk. Vocês não imaginam o quanto é difícil vir de fora, não ter nenhum parente aqui e ser totalmente dependente disso. Sou muito grato a todo esse cuidado e carinho, todos e-mails e orientações que vocês mandavam: *“Jorge querido, 1- Não se preocupe, preencha esse formulário e aguarde a próxima orientação; 2- Vai ficar tudo bem, aguarde Sibeles/Sumara entrar em contato; 3- Pelo o amor de Deus, perdi o prazo disso aqui, eu não posso cancelar não? Dois dias depois...*

Resolvido”. No final o desesperado era somente eu. As coisas fluíam tão bem com vocês que a nossa função era somente fazer um trabalho de qualidade para manter o programa com conceito 7.

Aos amigos que a UFMG e os corredores me deram: **Andreina, Anna Pio, Giovanna Rotondo, Agustin, Bruninha, Elis** (especialmente pela moradia no início), **Dri, Jordâna, Thabata, Anisleyde, Carol Silva, Léo da Fiocruz, Virgínia, Pedro, Ana Nolasco, Carol Leonel, Pedro Dias, Pedro Costa e Walison**. Obrigado pelas saidinhas para espairer e esquecer um pouco os problemas e os socorros naquelas horas do “*Ei, você tem aí rapidão...*” “*Coleta um sangue aqui*” “*Me ajuda com o citômetro?*”.

A minha outra família também de BH, a todas as pessoas com as quais já morei, e todas as gerações do apartamento 104. Obrigado pela convivência, acolhimento e conversas. As vezes por lavar aquela louça, colocar a roupa pra lavar pra mim, ou estender ou tirar do varal por falta de tempo. Obrigado a todos, **Jaque Hansen, Heminelly Holanda, Nathan Honorato, Laila e Érico**.

Aos funcionários da UFMG, especialmente aos **seguranças**, que sempre entendiam o porquê de Jorge Lucas ir ao laboratório as vezes no domingo à noite e abriam aquela exceção para entrar ou sair por outra portaria que não a principal. Aos **funcionários do biotério**, pelos inúmeros pedidos urgentes sempre atendidos.

Aos **animais experimentais** que deram as vidas para que tudo isso fosse possível.

Ao **CNPq** pelo financiamento da minha bolsa e, especialmente, a taxa de bancada, o que possibilitou a ida a tantos congressos e a divulgar muitas partes deste trabalho, do qual me orgulho muito de ter feito e resultou em tantos prêmios (disponível nos **apêndices**).

Eu sei que foram muitos agradecimentos! E de fato, um trabalho grande como esse eu não fiz só! Eu precisava agradecer a todos mesmo, **desde o segurança e as meninas da cantina** (que não sei o nome ainda, **mas falam comigo todo dia e sempre me alegram com café**) até **a todas as agências de fomento**. Porém, eu tenho certeza de que eu devo ter esquecido de alguém, e se eu fiz isso, me perdoem!

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram com este trabalho: **Meu eterno obrigado**.

“Enquanto houver vontade de lutar haverá esperança de vencer.”

Santo Agostinho.

RESUMO

Infecções por alguns helmintos estão entre os fatores de risco para alguns cânceres. Esses agentes além de estarem em constante contato com a sociedade, devido às condições socioeconômicas e ambientais, modulam a resposta imune e podem enriquecer o microambiente tumoral. *Ascaris* spp. por exemplo, é o helminto mais prevalente no mundo, mas pouco se sabe sobre os efeitos da inflamação causada a longo prazo por esse parasito e o impacto na progressão de alguns cânceres. Neste trabalho, investigamos a relação entre a infecção por *A. suum* e o impacto na progressão do carcinoma de mama (o mais prevalente globalmente), no modelo 4T1 em camundongos BALB/c, incluindo respectivas metástases no fígado e pulmão. Foram padronizados experimentos para validação de genes referência para análises de qPCR no modelo de infecção e no de carcinoma de mama 4T1. Além disso também padronizamos a utilização de metodologias auxiliares, como a utilização de radioisótopos para acompanhamento de metástases, para serem utilizadas neste trabalho e por outros que envolvam o modelo. Também caracterizamos os danos e o perfil de resposta imune presentes nos animais infectados até 100 dias após a infecção (dpi) ao parasito com diferentes doses e frequências de exposição para tentar mimetizar o cenário de infecção real. Para isso, técnicas de biologia molecular, ensaios de atividade celular, análises histopatológicas foram incorporadas a este trabalho após padronizações realizadas. Nossos principais resultados destacam que mesmo na ausência de larvas, aos 100dpi por *A. suum* é possível visualizar danos persistentes ao pulmão e fígado juntamente com o predomínio de citocinas inflamatórias, especialmente IFN- γ , TNF, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- β . Doses elevadas de infecção causaram danos mais intensos, mas com reparo mais rápido, enquanto doses menores, que melhor mimetizam o cenário de infecção natural, apesar de danos menores levaram a mecanismos de reparo mais lentos como aumento na expressão de TGF- β . Além disso, observamos que mesmo nesse tempo, os animais apresentam quadros de doença pulmonar crônica, similar a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e doença hepática sugestiva de doença colestática. Em ambos tecidos também houve a persistência de extensas áreas de fibrose. Esses achados contribuíram com o nosso entendimento da possível relação entre o favorecimento do microambiente tumoral para metástases do câncer de mama. Dessa forma, descrevemos os impactos relacionados à inflamação causada pelo parasito em diferentes doses de infecção em modelo murino. Enquanto a maior dose de infecção contribuiu com a melhor prognóstico dos animais, evidenciada pela redução na contagem de focos metastáticos no pulmão e melhora nos aspectos relacionados ao dano tecidual, as doses de 250 ovos, demonstraram ser um importante fator de risco para a progressão do câncer e agravamento das metástases, inclusive resultando em morte precoce dos animais. Acreditamos que esse cenário tenha sido resultado do perfil de resposta distinto que cada dose resultou. Enquanto a maior dose intensificou maior infiltrado de células, especialmente de eosinófilos, cuja ausência em modelos deficientes acelerou a mortalidade (estudo piloto conduzido em animais GATA-1^{-/-}), na menor dose houve menor expressão de citocinas inflamatórias, provavelmente devido ao aumento na expressão de TGF- β bem acima de todos os grupos e, assim, favorecendo o escape tumoral do sistema imune e, assim, favorecendo a progressão do câncer com piora do prognóstico. Nossos achados destacam a importância da avaliação do perfil de citocinas e do recrutamento celular na resposta imune e sugerem que a infecção por *A. suum* pode exercer efeitos dose-dependentes cruciais na evolução tumoral. Além disso, reforçam a necessidade de estratégias de controle para a ascarirose, considerando sua relevância para a saúde pública, não só devido a associação com câncer, mas, assim como evidenciamos, sob risco de surgimento de outras doenças como DPOC, Doença Colestática e fibrose persistente tanto no fígado quanto no pulmão. Acreditamos que este trabalho possa abrir caminhos para exploração em outros modelos de câncer além do câncer de mama. Ele também destaca o potencial para investigar a relação entre outras parasitoses e o desenvolvimento de outros tipos de câncer, ampliando o entendimento sobre o papel desses agentes na oncogênese e no seu prognóstico.

Palavras-chave: Ascarirose larval; câncer de mama; 4T1; fator de risco; inflamação crônica

ABSTRACT

Infections by some helminths are among the risk factors for some cancers. Besides them being in constant contact with society due to socioeconomic and environmental conditions, these agents modulate the immune response and can enrich the tumor microenvironment. *Ascaris* spp., for example, is the most prevalent helminth in the world, but little is known about the effects of long-term inflammation caused by this parasite and its impact on the progression of some cancers. In this study, we investigated the relationship between infection by *A. suum* and the impact on the progression of breast carcinoma (the most prevalent globally) in the 4T1 model in BALB/c mice, including respective metastases in the liver and lung. Experiments were standardized to validate reference genes for qPCR analyses in the infection model and in the 4T1 breast carcinoma model. In addition, we also standardized the use of auxiliary methodologies, such as the use of radioisotopes to monitor metastases, to be used in this study and in others involving the model. We also characterized the damage and the immune response profile present in animals infected up to 100 days post infection (dpi) with the parasite with different doses and frequencies of exposure to try to mimic the real infection scenario. For this, molecular biology techniques, cellular activity assays, and histopathological analyses were incorporated into this study after standardizations were performed. Our main results highlight that even in the absence of larvae, at 100 dpi by *A. suum* it is possible to visualize persistent damage to the lung and liver together with the predominance of inflammatory cytokines, especially IFN- γ , TNF, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, and TGF- β . High doses of infection caused more intense damage, but with faster repair, while lower doses, which better mimic the natural infection scenario, despite less damage led to slower repair mechanisms such as increased TGF- β expression. In addition, we observed that even at this time, the animals presented chronic lung disease, similar to Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and liver disease suggestive of cholestatic disease. In both tissues, there was also the persistence of extensive areas of fibrosis. These findings contributed to our understanding of the possible relationship between the favoring of the tumor microenvironment for breast cancer metastases. Thus, we describe the impacts related to inflammation caused by the parasite at different doses of infection in a murine model. While the highest dose of infection contributed to a better prognosis for the animals, evidenced by the reduction in the number of metastatic foci in the lung and improvement in aspects related to tissue damage, the doses of 250 eggs proved to be an important risk factor for cancer progression and worsening of metastases, even resulting in early death of the animals. We believe that this scenario was the result of the distinct response profile that each dose resulted in. While the highest dose intensified a greater infiltration of cells, especially eosinophils, whose absence in deficient models accelerated mortality (pilot study conducted in GATA-1^{-/-} animals), at the lowest dose there was a lower expression of inflammatory cytokines, probably due to the increase in TGF- β expression well above all groups and, thus, favoring tumor escape from the immune system and, thus, favoring cancer progression with worsening prognosis. Our findings highlight the importance of assessing the cytokine profile and cellular recruitment in the immune response and suggest that *A. suum* infection may exert crucial dose-dependent effects on tumor progression. Furthermore, they reinforce the need for control strategies for ascariasis, considering its relevance to public health, not only due to its association with cancer, but, as we have shown, due to the risk of developing other diseases such as COPD, Cholestatic Disease and persistent fibrosis in both the liver and lung. We believe that this work may open avenues for exploration in other cancer models besides breast cancer. It also highlights the potential to investigate the relationship between other parasitic diseases and the development of other types of cancer, expanding the understanding of the role of these agents in oncogenesis and prognosis.

Keywords: Larval ascariasis; breast cancer; 4T1; risk factor; chronic inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da incidência mundial de câncer para o ano de 2020 por 100.000 habitantes.	38
Figura 2: Estimativa de número de casos dos 10 tipos de câncer mais incidentes no ano de 2020, distribuídos por sexo (exceto câncer de pele não melanoma).	40
Figura 3: Representação esquemática da classificação dos cânceres de mama e suas variações de acordo com a histopatologia, grau do tumor, estágio do tumor e subtipo molecular.	41
Figura 4: Progressão do carcinoma ductal invasivo desde o tumor primário até o estágio metastático.	42
Figura 5: Distribuição de óbitos por câncer no Brasil em 2018 de acordo com a localização primária, número bruto de óbitos e porcentagem, separadas por sexo.	43
Figura 6: Distribuição e classificação das glândulas mamárias em camundongos.	53
Figura 7: Distribuição mundial da ascaridose.	58
Figura 8: Estágios evolutivos de <i>Ascaris spp</i>	60
Figura 9: Ciclo biológico de <i>Ascaris spp.</i> em humanos.	63
Figura 10: Ciclo biológico de <i>Ascaris spp.</i> em modelo murino.....	64
Figura 11: Dinâmica de resposta imune em diferentes órgãos na primoinfecção e reinfecção ao <i>Ascaris suum</i>	68
Figura 12: Primeira parte do delineamento experimental do capítulo I.....	92
Figura 13: Segunda parte do delineamento experimental do capítulo I.....	93
Figura 14: Imagens representativas do <i>score</i> de classificação da evolução de áreas ulceradas no tumor primário de camundongos BALB/c com carcinoma de mama 4T1.....	95
Figura 15: Integridade total do RNA das amostras extraídas em gel de agarose a 1%.....	98
Figura 16: A: Desenho experimental da infection com 2500 ovos de <i>A. suum</i> aos 4, 8 e 12 dias pós infection e B: Recuperação larval.	104
Figura 17: Curvas de dissociação (incluindo temperaturas de fusão) e eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação dos cinco genes candidatos de referência e do gene alvo CXCL9.....	106

Figura 18: Distribuição da frequência dos níveis de expressão, baseados nos valores de Ct, para cada um dos cinco genes referência candidatos, separados por grupo (NI e infectado) em cada tecido avaliado.	107
Figura 19: Resultado do teste de estabilidade calculado por cinco diferentes softwares (GeNorm, Bestkeeper, Normfinder, Comparative Delta Ct e RefFinder).....	109
Figura 20: Normalização da expressão de CXCL9 com diferentes genes referência no fígado, pulmão, intestino delgado e grosso em camundongos infectados com <i>A. suum</i> no pico da migração larval	110
Figura 21: Aspectos clínicos da evolução do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c.....	112
Figura 22: Coloração representativa da histopatologia dos tecidos analisados aos 14, 21 e 28 dias após a injeção das células.....	114
Figura 23: Imagens cintilográficas e biodistribuição da HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) radiomarcada com ^{99m} Tc em diferentes órgãos	116
Figura 24: Curvas de dissociação dos cinco genes referência candidatos (GUSB, PGK1, SYMPK, CCER2 e ANKRD17) e dois genes alvo (VEGF e TNF- α).	117
Figura 25: Distribuição dos valores Ct para cada um dos 10 genes referência candidatos separados por grupo nos três tecidos avaliados.	118
Figura 26: Análise da estabilidade da expressão dos 10 diferentes genes referência candidatos pelo geNorm em diferentes tecidos	119
Figura 27: Análise da estabilidade da expressão dos 10 diferentes genes referência candidatos pelo NormFinder em diferentes tecidos.....	120
Figura 28: Classificação dos 10 diferentes genes referência candidatos em diferentes tecidos com base no RefFinder.	122
Figura 29: Normalização da expressão de VEGF e TNF- utilizando diferentes genes referência candidatos em diferentes tecidos	123
Figura 30: Principais resultados da primeira parte do capítulo I da avaliação dos genes referência em diferentes tecidos de camundongos BALB/c afetados pela migração de <i>A. suum</i>	130

Figura 31: Principais resultados da segunda parte do capítulo I da avaliação dos genes referência em diferentes tecidos de camundongos BALB/c afetados pela dinâmica de desenvolvimento do carcinoma de mama murino 4T1.....	131
Figura 32: Delineamento experimental do capítulo II para os estudos de pulmão	133
Figura 33: Delineamento experimental do capítulo II para os estudos de fígado	135
Figura 34: Aspectos clínicos da infecção por <i>A. suum</i> em camundongos BALB/c infectados com diferentes doses de ovos e frequência de exposição.....	140
Figura 35: Larvas recuperadas no pulmão dos animais aos 8dpi	141
Figura 36: Análise hematológica entre grupos de camundongos BALB/c infectados por <i>A. suum</i> em diferentes doses de ovos e frequência de exposições aos 35 dpi. e 100 dpi.....	142
Figura 37: Contagem total e diferencial de leucócitos aos 35 dpi no sangue periférico de camundongos BALB/c infectados com <i>A. suum</i> em diferentes doses de ovos e quantidade de exposições.....	143
Figura 38: Padrão de hemorragia alveolar e contagem de plaquetas nos camundongos BALB/c infectados com <i>A. suum</i> em diferentes doses de ovos e frequência de exposições aos 35 dpi.....	144
Figura 39: Contagem aos 35dpi de leucócitos totais e diferenciais no BAL de camundongos BALB/c infectados com <i>A. suum</i> em diferentes doses de ovos e frequência de exposições.....	145
Figura 40: Contagem aos 35 dpi e 100 dpi de leucócitos totais e diferenciais no BAL de camundongos infectados com <i>A. suum</i> com diferentes doses de ovos e frequência de exposições.....	147
Figura 41: Aspectos da inflamação no pulmão aos 35 dpi de camundongos BALB/c infectados por <i>A. suum</i> em diferentes doses de ovos e quantidade de exposições	149
Figura 42: Evolução até aos 100 dpi da inflamação no pulmão dos camundongos BALB/c infectados por <i>A. suum</i> em diferentes doses de ovos e quantidade de exposições	150
Figura 43: Imagens representativas de pulmão de camundongos BALB/c aos 35 dpi primoinfectados e reinfectedados por <i>A. suum</i> , corados com Tricrômico de Masson e morfometria de áreas de fibrose aos 35 dpi.....	151

Figura 44: Perfil da produção de citocinas no pulmão aos 35 dpi de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectedados com diferentes doses e quantidade de exposições por <i>A. suum</i>	153
Figura 45: Avaliação da mecânica pulmonar aos 35 dpi de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectedados com diferentes doses e frequência de exposições por <i>A. suum</i>	154
Figura 46: Evolução dos parâmetros respiratórios dos 35 dpi aos 100 dpi de camundongos BALB/c infectados por <i>A. suum</i> em diferentes doses de ovos e quantidade de exposições.....	157
Figura 47: Dosagem de IgG e IgA em camundongos BALB/c infectados com <i>A. suum</i> com diferentes doses de ovos, de acordo com a frequência de exposições.....	158
Figura 48: Análise de Componentes Principais (PCA) de danos e mecanismos de reparo em camundongos BALB/c infectados por <i>A. suum</i>	160
Figura 49: Inflamação resultante da intensidade da migração de larvas de <i>A. suum</i> aos 35dpi no parênquima hepático de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectedados por diferentes doses.....	162
Figura 50: Inflamação resultante da migração de larvas de <i>A. suum</i> no parênquima hepático após 100dpi de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectedados por diferentes doses.....	163
Figura 51: Danos hepáticos aos 35 e 100 dpi de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectedados por diferentes doses de <i>A. suum</i> e quantidade de infecções.....	165
Figura 52: Áreas de fibrose no fígado aos 35 e 100dpi de camundongos primoinfectados e reinfectedados por diferentes doses de <i>A. suum</i> e frequência de exposições	167
Figura 53: Análises de biologia molecular em camundongos BALB/c	168
Figura 54: Curvas de dissociação (incluindo temperaturas de fusão) e eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação dos genes avaliados nesta parte do trabalho (IL-12/40, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-17, IL-10 e TGF- β).....	170
Figura 55: Níveis de expressão relativa de citocinas no fígado de camundongos primoinfectados e reinfectedados com diferentes doses de ovos de <i>A. suum</i>	171

Figura 56: Perfil de produção de citocinas sistêmicas de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectedados por <i>A. suum</i> com diferentes doses após 35 dpi.....	172
Figura 57: Visão geral das respostas inflamatórias sistêmicas e pulmonares provocadas por diferentes doses de infecção por <i>Ascaris suum</i> durante cenários de infecção (Primo e Re), em 35 dpi e 100 dpi	179
Figura 58: Visão geral das respostas inflamatórias sistêmicas e hepáticas provocadas por diferentes doses de infecção por <i>Ascaris suum</i> durante cenários de infecção (Primo e Re), em 35 dpi e 100 dpi.	180
Figura 59: Delineamento experimental do capítulo III.	182
Figura 60: Aspectos clínicos da evolução do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c com ou sem exposição prévia à alta dose de ovos de <i>A. suum</i>	184
Figura 61: Dinâmica de desenvolvimento dos tumores em camundongos BALB/c com carcinoma de mama 4TI expostos ou não previamente a infecção por <i>A. suum</i>	185
Figura 62: Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c com carcinoma de mama murino 4TI e infectados com <i>A. suum</i> ou não, e seu impacto nos níveis séricos de LDH	186
Figura 63: Análise hematológica de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4TI e infectados com <i>A. suum</i> ou não	187
Figura 64: Avaliação da concentração de proteínas totais e hemoglobina no BAL de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4TI e infectados com <i>A. suum</i> ou não	188
Figura 65: Contagem total e diferencial de leucócitos no BAL de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4TI e infectados com <i>A. suum</i> ou não e seu impacto nos níveis séricos de LDH	189
Figura 66: Avaliação da dinâmica de metástases hepáticas provenientes do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c expostos ou não a altas doses de ovos de <i>A. suum</i>	190
Figura 67: Avaliação da intensidade da inflamação no pulmão de camundongos BALB/c com carcinoma de mama expostos ou não a infecção prévia por altas doses de ovos de <i>A. suum</i>	192

Figura 68: Avaliação da dinâmica de metástases pulmonares provenientes do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c expostos ou não a altas doses de ovos de <i>A. suum</i>	193
Figura 69: Perfil de produção de citocinas no pulmão de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4TI e infectados ou não com <i>A. suum</i>	194
Figura 70: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4TI e infectados com <i>A. suum</i> ou não	195
Figura 71: Determinação de IgG e IgA em camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama 4TI e infectados ou não com <i>A. suum</i>	196
Figura 72: Curva de sobrevivência referente ao experimento piloto realizado neste trabalho com animais selvagens e knockout para o gene GATA-1 com carcinoma de mama 4T1.	198
Figura 73: Delineamento experimental do capítulo IV.....	206
Figura 74: Aspectos clínicos da evolução do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c com ou sem exposição prévia a diferentes doses de ovos de <i>A. suum</i>	208
Figura 75: Dinâmica de desenvolvimento dos tumores em camundongos BALB/c com carcinoma de mama 4TI expostos ou não previamente a infecção com 250 ou 2500 ovos de <i>A. suum</i>	210
Figura 76: Avaliação da dinâmica de metástases pulmonares provenientes do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c expostos ou não a diferentes doses de ovos de <i>A. suum</i>	211
Figura 77: Intensidade do dano celular no pulmão de camundongos BALB/c com carcinoma de mama com ou sem exposição prévia a diferentes doses de <i>A. suum</i>	213
Figura 78: Perfil de produção de citocinas no pulmão de camundongos BALB/c infectados com 250 ovos de <i>A. suum</i> ou não em diferentes doses e com ou sem carcinoma de mama 4T1.....	214
Figura 79: Perfil de produção de citocinas no pulmão de camundongos BALB/c infectados ou não com <i>A. suum</i> em diferentes doses e com ou sem carcinoma de mama 4T1	216
Figura 80: Determinação do dano tecidual e sistêmico em camundongos BALB/c com carcinoma de mama murino 4TI infectados previamente com doses baixas de <i>A. suum</i>	217

Figura 81: Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c com carcinoma de mama murino 4TI e infectados previamente com doses baixas de <i>A. suum</i> e seu impacto nos níveis séricos de LDH	218
Figura 82: Avaliação do índice de Tiffeneau em camundongos BALB/c infectados com <i>A. suum</i> e com carcinoma de mama	219
Figura 83: Visão geral da evolução do câncer frente a exposição prévia a infecção por <i>A. suum</i> em diferentes doses de infecção	223

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de novos casos de câncer no Brasil por região no ano de 2020.....	39
Tabela 2: Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama a partir de seus biomarcadores, frequência dos casos, grau histológico, prognóstico e terapia associada.....	44
Tabela 3: Visão geral sobre a relação entre helmintos e câncer encontrados em literatura, excluindo os casos de infecção por parasitos classificados pela IARC.....	51
Tabela 4: Visão geral sobre a relação entre protozoários e câncer encontrados em literatura	52
Tabela 5: Graus de <i>score</i> utilizados para a análise histológica semiquantitativa de lesão pulmonar das amostras de pulmão de camundongos BALB/c.	82
Tabela 6: Graus de <i>score</i> utilizados para a análise histológica semiquantitativa de lesão hepática das amostras de fígado de camundongos BALB/c.....	83
Tabela 7: Graus de <i>score</i> de acordo com a evolução de áreas ulceradas no tumor primário de camundongos BALB/c com carcinoma de mama 4T1.....	94
Tabela 8: Iniciadores, sequências e características do amplicon e número de acesso na base de dados dos iniciadores utilizados na PCR para avaliação da expressão gênica	97
Tabela 9: Informações a respeito eficiência dos iniciadores utilizados no capítulo I	105
Tabela 10: Média $\pm$ Desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos valores de Ct dos cinco genes referência candidatos para o pulmão, fígado, intestino delgado e grosso.....	108
Tabela 11: Presença de metástases no fígado, pulmão e cérebro em camundongos BALB/c em diferentes dias após inoculação de células 4T1.	113
Tabela 12: Eficiência de amplificação dos diferentes iniciadores.....	117
Tabela 13: Análise da estabilidade da expressão dos 10 diferentes genes referência candidatos pelo BestKeeper em diferentes tecidos.....	121
Tabela 14: Iniciadores, sequências e características do amplicon e número de acesso na base de dados dos iniciadores utilizados na PCR para avaliação da expressão gênica	137
Tabela 15: Correlação dos níveis séricos de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e Gama-Glutamil Transpeptidase (GGT) de acordo com a dose de infecção nas diferentes frequências de exposição por <i>A. suum</i>	166
Tabela 16: Informações a respeito eficiência dos iniciadores utilizados no capítulo II	169

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

4T1 – Linhagem celular de carcinoma de mama

^{99m}Tc - Tecnésio

a.C. – Antes de Cristo

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de Variância

AST - Aspartato aminotransferase

BAL - Lavado broncoalveolar

BALB/c – Linhagem albina de camundongo

BSA – Albumina bovina sérica - do inglês “*Bovine Serum Albumin*”

BT – Bilirrubina total

BT474 – Linhagem celular de câncer mamário

C57BL/6j – Linhagem de camundongos...

CBA – *Cytometric Bead Array*

CC – Grupo de animais com Câncer

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

Cchord - Complacência estática

CDC - Centro para Controle e Prevenção de Doenças (Estados Unidos da América)

Cdyn - Complacência dinâmica

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animal

cm – Centímetro

CO₂ – Monóxido de Carbono

CPK – Pico de complacência

Ct – Valores do ciclo de limiar

Ctl – Grupo de animais Controle

CuT – Curvatura do Tronco

D.B.O – Demanda Biológica de Oxigênio

D.O. - Densidade óptica

DCNTs - Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DMBA - 7,12-Dimetilbenzantraceno

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPI - Dias pós-infecção

DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas

EBV – Vírus Epstein-Barr

EDDA - Ácido etilenodiamino-N, N'-diacético

EDTA K2 - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético dipotássico

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EPO - Peroxidase de eosinófilos

ER - Receptor de estrogênio

ES - Antígenos de excreção e secreção

FACS – Tipo de tubo Falcon para citômetros

FAL – Fosfatase Alcalina

FEV - Volume expiratório forçado

FVC – Capacidade Vital Forçada

g – Gramas

g/dL – Grama por decilitro

GGT – Gama Glutamil-transpeptidase

H&E – Hematoxilina e Eosina

HBSS - Solução Balanceada de Hank's

HBV – Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HER-2 - Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2

HHV4 – Herpervírus Humano 4

HPV – Papiloma Vírus Humano

HTLV-1 – Vírus Linfotrópico de Células T Humano tipo 1

IARC - Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer

IC - Capacidade inspiratória

ICB - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

IDH - Índice de desenvolvimento humano

IFN- γ - Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

ILC2 - Células linfoides inatas do tipo 2
INCA - Instituto Nacional de Câncer
Kg – Quilograma
KHCO₃ – Bicarbonato de Potássio
L3 – Larva de terceiro estágio
L4 – Larva de quarto estágio.
LCR - Líquido cefalorraquidiano
LDH – Lactato Desidrogenase
LICP - Laboratório de Imunologia e Controle de Parasitos
LPC – Laboratório de Patologia Comparada da UFMG
M – Mol
MCF7 – Linhagem celular de câncer mamário
MDA-MB-231 – Linhagem celular de câncer mamário
MDA-MB-435 – Linhagem celular de câncer mamário
MDP - Metilenodifosfonato de Sódio
mg – Miligrama
mL – Mililitros
mm – Milímetro
mm³ - Milímetro cúbico
MMP – Metaloproteinases
MPO - Mieloperoxidase de neutrófilos
Na^{99m}TcO₄ - Pertecnetato de Sódio
NI – Grupo de animais Não Infectados
NK – Células natural killers
NKT - Células T natural killer
nM – Nanometro
NMU - N-metil-Nnitrosureia
NT - Neurotoxocarose
°C – Graus Celsius
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PARP - Poli Adenosina difosfato Ribose Polimerase
pb – Pares de Bases

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão Fosfato-salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PE – Piloereção

PEG - Polietilenoglicol

pg/mg – Picograma por miligrama

pg/mL – Picograma por mililitro

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI – Grupo de animais Primoinfectados

PIC – Grupo de animais Primoinfectados e com Câncer

PR - Receptor de progesterona

qPCR – Reações de PCR quantitativa em tempo real

RA – Respiração Anormal

RANTES - Quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

RC - Resistência e conformidade

RE – Grupo de animais Reinfectedados

RI – Resistência pulmonar

RNA - Ácido Ribonucleico

RPMI – Meio de cultura de células humanas normais e neoplásicas in vitro

SEM - Erro padrão da média

SFB - Soro fetal bovino

T.A. - Temperatura ambiente

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

Th - Células T auxiliares

TLR – Toll-like receptors

Tm – Temperature of melting

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TR – Tremores

Treg - Células T reguladoras

TV – Volume corrente

U/L – Unidade por litro

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	35
2 REFERENCIAL TEÓRICO	37
2.1 Câncer.....	37
2.1.1 Contextualização e epidemiologia.....	37
2.1.2 Câncer de mama	40
2.1.3 Fatores de risco para o câncer de mama	45
2.1.4 Câncer e inflamação	46
2.1.5 Câncer e infecções	47
2.1.6 Estratégias de estudos experimentais em oncologia mamária e modelos experimentais.....	52
2.2 Ascaridose.....	55
2.2.1 Contextualização	55
2.2.2 Agente etiológico.....	56
2.2.3 Epidemiologia da ascaridose	57
2.2.4 Morfobiologia de <i>Ascaris spp.</i>	60
2.2.5 Ciclo biológico e transmissão de <i>Ascaris spp.</i>	61
2.2.6 Manifestações clínicas e fisiopatologia da ascaridose.....	65
2.2.7 Resposta imunológica na ascaridose	67
2.2.8 Ascaridose e doenças crônicas não transmissíveis	69
3 JUSTIFICATIVA	71
4 OBJETIVOS.....	73
4.1 Geral.....	73
4.2 Específicos.....	73
5 MATERIAIS E MÉTODOS	74
5.1 Aspectos éticos	74
5.2 Animais experimentais	74
5.3 Obtenção de parasitos adultos e ovos de <i>Ascaris suum</i>	74
5.4 Embrionamento dos ovos.....	75
5.5 Infecção experimental por <i>Ascaris suum</i>	75
5.6 Manutenção da linhagem 4T1 e indução de câncer	76
5.7 Avaliação da função pulmonar por espirometria	76
5.8 Análises hematológicas.....	78

5.8.1	Coleta e processamento do sangue	78
5.8.2	Contagem e avaliação de células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico	78
5.9	Procedimentos com lavado broncoalveolar (BAL)	79
5.9.1	Coleta e processamento	79
5.9.2	Contagem diferencial de células no BAL	79
5.9.3	Dosagens de proteínas totais, hemoglobina e LDH no BAL.....	79
5.10	Análises histopatológicas	80
5.10.1	Coleta e processamento de órgãos.....	80
5.10.2	Análises semi-quantitativas e morfométricas	81
5.11	Coleta e processamento de tecidos para dosagem de citocinas e avaliação da atividade celular de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos	83
5.12	Dosagem de citocinas séricas e teciduais	84
5.13	Avaliação da atividade celular de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos nos tecidos	84
5.13.1	Determinação dos níveis de NAG	85
5.13.2	Determinação dos níveis de MPO	85
5.13.3	Determinação dos níveis de EPO	86
5.14	Preparo de antígeno larval	86
5.15	Dosagem de anticorpos IgG sérico total e SIgA no BAL	87
5.16	Dosagens bioquímicas em amostras de plasma.....	88
5.16.1	Avaliação de danos hepáticos.....	88
5.17	Avaliação da função hepática.....	88
5.17.1	Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH).....	88
5.18	Análises estatísticas.....	89
6	RESULTADOS	90

CAPÍTULO I

Validação de genes referência no modelo de infecção por *Ascaris suum* e no modelo de carcinoma de mama murino 4t1 e aplicação de técnicas com radioisótopos para monitoramento da evolução do câncer de mama em camundongos

7	MATERIAIS E MÉTODOS	92
7.1	Delineamento experimental.....	92
7.2	Avaliação da curva de sobrevivência e manifestações clínicas	93
7.3	Recuperação de larvas de <i>A. suum</i> nos tecidos	95

7.4	Biologia molecular	96
7.4.1	Delineamento de iniciadores (<i>Primers</i>)	96
7.4.2	Coleta de tecidos, extração de RNA total e síntese de cDNA	97
7.4.3	Reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	98
7.4.4	Especificidade e eficiência de amplificação dos iniciadores	99
7.4.5	Padronização e escolha de genes referência para normalização dos dados de expressão e análise de estabilidade.....	99
7.5	Imagens cintilográficas e experimentos <i>ex vivo</i> com radioisótopos.....	100
7.5.1	Radiomarcção do complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina(7-14) com ^{99m}Tc	101
7.5.2	Controle de qualidade dos fármacos radiomarcados	101
7.5.3	Imagens cintilográficas	101
7.5.4	Experimentos de biodistribuição <i>ex vivo</i>	102
7.6	Análises estatísticas.....	102
7.7	Resultados	103
7.7.1	Avaliação de genes referência para análises de expressão gênica por PCR em tempo real em diferentes tecidos de camundongos infectados por <i>A. suum</i>	103
7.7.2	Análises parasitológicas.....	103
7.7.3	Eficiência de amplificação e especificidade dos iniciadores	104
7.7.4	Expressão dos genes referência candidatos nos diferentes tecidos.....	106
7.7.5	Identificação do gene referência mais estável nos diferentes tecidos.....	108
7.7.6	Validação dos genes referência candidatos.....	109
7.8	Triagem e validação de diferentes genes referência para ensaios de PCR em tempo real no modelo de carcinoma de mama murino 4T1 e respectivas metástases.....	111
7.8.1	Evolução do carcinoma de mama murino 4T1 e confirmação de metástases em órgãos alvo	111
7.8.2	Eficiência de amplificação e especificidade dos iniciadores de genes candidatos.....	116
7.8.3	Variação dos valores de Ct dos genes candidatos nos diferentes tecidos.....	118
7.8.4	Análises de estabilidade dos genes referência candidatos.....	118
7.8.5	Validação de análises de estabilidade dos genes referência candidatos.....	122
7.9	Discussão.....	124
7.10	Conclusão	129

CAPÍTULO II

Avaliação da persistência dos danos teciduais e estudo da inflamação crônica resultantes da infecção por *A. suum* em função da dose infecciosa e frequência de exposições

8 MATERIAIS E MÉTODOS	133
8.1 Delineamento experimental.....	133
8.2 Recuperação de larvas de <i>A. suum</i> nos tecidos	136
8.3 Procedimentos com biologia molecular	136
8.4 Resultados	138
8.4.1 A infecção por <i>Ascaris suum</i> desencadeia inflamação pulmonar persistente, anemia e doença pulmonar obstrutiva crônica dose-dependente de ovos em camundongos primo e reinfectedos	138
8.4.2 Impacto da dose de ovos e frequência de exposições na dinâmica do peso e manifestações clínicas na ascaridose larval.....	138
8.4.3 Doses intermediárias e mais baixas de ovos de <i>A. suum</i> causam anemia persistente e aumento de leucócitos em camundongos primoinfectados	140
8.4.4 Camundongos infectados apresentam hemorragia alveolar aos 35 dpi quando infectados com doses menores e intermediárias de ovos de <i>A. suum</i>	143
8.4.5 Apesar de induzir rápida melhora no hospedeiro, a infecção com 2500 ovos favorece a expansão persistente do infiltrado inflamatório no pulmão.....	147
8.4.6 Menores doses de infecção promovem aumento expressivo de citocinas regulatórias no pulmão e influenciam a produção de citocinas mistas Th1/Th2/Th17.....	151
8.4.7 A inflamação persistente desencadeada pela infecção por <i>A. suum</i> prejudica a função pulmonar e resulta em doença restritiva crônica	154
8.4.8 Doses mais baixas de ovos promovem aumento nos níveis de anticorpos na reinfecção persistindo por 100 dpi semelhante às doses mais altas	157
8.4.9 A análise de componentes principais (PCA) apoia a discussão de que as menores doses após exposição única não intensificam resposta imune de imediato e resultam em reparo mais lento e danos persistentes.....	159
8.5 A infecção larval por <i>A. suum</i> desencadeia inflamação hepática crônica, doença colestática, fibrose e inflamação sistêmica persistente	160
8.5.1 A dose de infecção e frequência de exposições estão relacionadas com a intensidade da inflamação do fígado aos 35dpi e persistente aos 100dpi	161
8.5.2 A infecção por <i>A. suum</i> induz lesões no fígado que persistem até 100 dpi e sugere a presença de doença colestática.....	163
8.5.3 A inflamação causada por <i>A. suum</i> levam ao surgimento de fibrose que persiste no tecido	166

8.5.4	A infecção por <i>A. suum</i> induz a expressão de genes associados às respostas Th1/Th2/Th17 que varia de acordo com a dose de infecção, frequência de exposições e com o tempo analisado.	167
8.5.5	Após 35dpi os danos causados pela infecção do <i>A. suum</i> promovem um mix de resposta Th1/Th2 sistêmica associado a dose infecciosa e frequência de exposições.....	171
8.6	Discussão.....	173
8.7	Conclusão	178

CAPÍTULO III

Papel da inflamação crônica causada por alta dose de infecção por *Ascaris suum* na progressão do câncer de mama

9	MATERIAIS E MÉTODOS	182
9.1	Delineamento experimental.....	182
9.2	A inflamação crônica impulsionada por altas doses de ovos de <i>A. suum</i> inibem o crescimento do câncer de mama e metástases em modelo experimental.....	183
9.2.1	Infecção prévia por alta dose de ovos de <i>A. suum</i> não influencia a sobrevivência de camundongos com carcinoma de mama, mas retarda o crescimento do tumor primário.....	183
9.2.2	Altas doses de ovos de <i>A. suum</i> resultam em intensa leucocitose com predomínio de eosinófilos e neutrófilos	185
9.2.3	O carcinoma de mama murino resulta em hemorragia alveolar e anemia as quais são atenuados pela infecção prévia por altas doses de ovos de <i>A. suum</i>	187
9.2.4	Animais com carcinoma de mama 4T1 expostos previamente a infecção com altas doses de ovos de <i>A. suum</i> intensificam resposta inflamatória no fígado e inibem metástase hepática	189
9.2.5	Animais com carcinoma de mama 4T1 expostos previamente a infecção com altas doses de ovos de <i>A. suum</i> intensificam a resposta inflamatória no pulmão	191
9.2.6	A infecção prévia por <i>A. suum</i> diminui a quantidade e a área de focos metastáticos no pulmão	193
9.2.7	A infecção prévia por <i>A. suum</i> em modelo de carcinoma de mama murino exibem um mix de citocinas Th1/Th2/Th17 no pulmão	194
9.2.8	A infecção por <i>A. suum</i> impacta mais a função respiratória que as metástases decorrentes do câncer de mama.....	195
9.2.9	O câncer de mama não interfere na imunidade humoral dos animais expostos ao parasito.....	196

9.2.10	Papel dos eosinófilos na evolução do carcinoma de mama murino 4T1, um estudo piloto	197
9.3	Discussão.....	199
9.4	Conclusão	204

CAPÍTULO IV

Influência da dose de infecção de *A. suum* na progressão do câncer de mama e estudo piloto do eosinófilo na progressão

10	MATERIAIS E MÉTODOS	206
10.1	Delineamento experimental.....	206
10.2	A infecção prévia em menores doses ovos de <i>A. suum</i> constitui potencial fator de risco para progressão do câncer de mama	207
10.2.1	Diferentes doses de ovos de <i>A. suum</i> retardam o crescimento do tumor primário, mas influenciam na sobrevida do animal e no desenvolvimento de áreas ulceradas	207
10.2.2	A dose de infecção de <i>A. suum</i> está associada ao potencial fator de risco para progressão do carcinoma de mama	210
10.2.3	Doses de infecção menores promovem aumento da liberação de citocinas regulatórias enquanto as maiores doses promovem aumento de resposta inflamatória, o que pode estar associado ao controle das metástases	214
10.3	Agravo tecidual e sistêmico	216
10.4	Discussão.....	220
10.5	Conclusão	223
11	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	224
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	225
13	ANEXOS.....	279
13.1	Anexo I - Certificados de aprovação da CEUA/UFMG para condução deste projeto.....	279
13.2	Anexo II - Certificados de aprovação da CEUA/UFMG para condução deste projeto.....	280
13.3	Anexo III - Artigo publicado na revista <i>Microbial Pathogenesis</i>	281
14	APÊNDICE: PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO (2020-2024)	282
14.1	Artigos derivados da tese publicados:	282
14.2	Artigos derivados da tese submetidos:	282
14.3	Artigos derivados da tese em processo de submissão:	283

14.4	Artigos publicados como primeiro autor:.....	283
14.5	Artigos como colaborador:	283
14.6	Premiações:	285

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) correspondem a um grupo de doenças incapacitantes causadas por vírus, fungos, bactérias, protozoários e helmintos (Mitra; Mawson, 2017). Este grupo representa um desafio significativo para a saúde pública, impactando predominantemente as populações mais pobres nos países em desenvolvimento, especialmente em áreas tropicais e subtropicais (Pullan; Brooker, 2012; Engels; Zhou, 2020). Globalmente, estima-se que aproximadamente um bilhão de pessoas estão infectadas com pelo menos uma DTN, resultando em 534 mil óbitos e 57 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) (Hotez et al., 2014; Lin et al., 2022).

Dentre as diferentes DTNs, as helmintoses são as mais prevalentes no mundo, causando prejuízos no desenvolvimento cognitivo de crianças e prejudicando seu rendimento escolar. Ao mesmo tempo, afetam adultos no ambiente de trabalho, impondo às famílias, encargos adicionais com despesas de saúde e exercendo um impacto negativo na economia dos países (Fitzpatrick et al., 2017; Rees et al., 2019). Dentre as diferentes helmintoses, a ascaridose é a mais prevalente no mundo, ampla distribuição geográfica e estimativa de cerca de 500 milhões de pessoas infectadas (Hotez et al., 2014; GBD, 2022).

Além disso, outro problema de saúde pública são as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs), diferindo das DTNs em sua alta morbidade e é a principal causa de morte na sociedade (Cieza et al., 2021). Dentre as diferentes DCNTs, o câncer corresponde a segunda causa de morte no mundo, e, em algumas regiões, é a primeira (Siegel; Naishadham; Jemal, 2013; Hassanpour; Dehghani, 2017). O de mama é o mais frequente, sendo a principal causa de morte em regiões menos desenvolvidas, principalmente em mulheres (Bray et al., 2024). Diversos fatores de risco estão associados ao surgimento ou agravamento do câncer, tais como tabagismo, exposição a poluentes, padrões alimentares, uso de medicamentos, obesidade e inflamação (Aggarwal et al., 2009; Wu et al., 2018). A inflamação desempenha um papel crucial na progressão ou regressão de tumores, e evidências sugerem que o microambiente inflamatório é crucial no curso da doença (Mantovani et al., 2008; Grivennikov; Greten; Karin, 2010). Vale salientar que 25% dos cânceres estão ligados a infecções, especialmente as crônicas (Murata, 2018).

Entre os parasitos mais frequentemente relatados em pacientes com câncer, destaca-se o *Ascaris lumbricoides* (Silva et al., 2011; Jeske et al., 2018). Muitos desses pacientes vivem em condições precárias de vida, o que contribui com a ampla disseminação deste parasito em

todo mundo. Apesar disso, poucos trabalhos têm investigado as consequências das helmintoses em pacientes com câncer ou em modelo experimental. Os helmintos são parasitos que desencadeiam inúmeros mecanismos imunomodulatórios no hospedeiro, porém essas respostas podem resultar em redução das respostas vacinais, suscetibilidade a coinfeções e redução da imunovigilância de tumores (Maizels; McSorley, 2016). No entanto, os efeitos dessas respostas em relação aos tumores, permanece controversa, pois estudos discutem a relação entre a progressão de tumores (Honeycutt et al., 2014; Brindley; Loukas, 2017) enquanto outros indicam possível regressão (Callejas et al., 2018).

A Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC) reconhece a relação entre helmintos e câncer, porém, inclui apenas três helmintos na lista de agentes carcinogênicos (Grupo 1): *Schistosoma haematobium*, *Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis* (Vennervaldi; Polman, 2009; Martel et al., 2020). Alguns trabalhos exploram essa associação com o câncer de bexiga decorrente da infecção por *S. haematobium* (Ma et al., 2011; Thanan et al., 2012; Antoni et al., 2017) e colangiocarcinoma, relacionado à infecção por *O. viverrini* (Pinlaor et al., 2003; Sripa et al., 2011; Sithithaworn et al., 2012; Fedora et al., 2017) e *C. sinensis* (Rustagi; Dasanu 2012; Na et al., 2020; Kim et al., 2022).

Embora a quantidade de informações seja escassa, outros trabalhos têm sugerido possível relação de alguns helmintos com a progressão de alguns cânceres além dos parasitos reconhecidos pela IARC. Exemplos incluem *Fasciola hepatica* (Tsocheva et al., 1992; Montero et al., 1999; Motorna et al., 2001), *Echinococcus granulosus* (Oikonomopoulou et al., 2016) e *Toxocara canis* (Ruiz-Manzano et al., 2020; Kazemi et al., 2023). Em relação ao câncer de mama, estudos que investigam a relação com helmintos é ainda menor (Noya et al., 2013; Ruiz-Manzano et al., 2020; Sauer et al., 2021; Kazemi et al., 2023).

Apesar de *Ascaris* spp. ser o helminto mais prevalente no mundo, especialmente em pacientes oncológicos, não há trabalhos avaliando a relação com câncer. A evidência de trabalhos descrevendo com clareza lacunas relacionadas à inflamação crônica induzida por *Ascaris* spp. e suas respectivas consequências para o hospedeiro também é escassa (Wu et al., 2021; Oliveira et al., 2024). Dada a associação reconhecida entre infecções parasitárias e câncer e os impactos socioeconômicos dos helmintos, há a necessidade de estudos sobre a relação entre a ascarirose e câncer de mama a fim de contribuir com o enfrentamento das implicações sociais e econômicas dessa doença e estabelecer estratégias preventivas e terapêuticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

2.1.1 Contextualização e epidemiologia

O “câncer” é um termo abrangente que engloba mais de 100 doenças diferentes. No entanto, todas elas compartilham características em comum relacionadas ao crescimento desordenado das células, resultante da perda de controle sobre os mecanismos que envolvem a divisão celular. Além disso, apresentam capacidade de invadir outros tecidos e órgãos, comprometendo suas respectivas funções (INCA, 2020; Somarelli, 2021; Hanahan, 2022). É uma doença complexa, de natureza multifatorial e ocupa espaço na lista das DCNTs mais prevalentes na sociedade, sendo considerada a segunda causa de morte antes dos 70 anos, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares e, em alguns países, especialmente em desenvolvimento, é a principal (Bray et al., 2018). A palavra “câncer” tem origem do grego *Karkínos* (καρκίνος) que significa caranguejo e foi atribuída por Hipócrates por volta dos 400 a.C. ao observar as patas de um caranguejo espalhadas na areia notando semelhanças com os vasos sanguíneos formados ao redor de um tumor (Mukherjee, 2012; INCA, 2020).

O câncer, de forma geral, surge a partir de células normais do tecido que apresentam alterações genéticas decorrentes de fatores intrínsecos, como a hereditariedade, ou por fatores extrínsecos (agentes físicos, químicos ou biológicos) (Mbeunkui; Johann, 2009; Hahn et al., 2021). Essas alterações podem afetar a função de genes responsáveis pela regulação da proliferação, diferenciação e morte celular (Aizawa et al., 2016; Alison, 2020). Cerca de 5% a 10% de todos os cânceres surgem de fatores intrínsecos, enquanto a maioria dos casos é atribuída aos fatores extrínsecos (Tomasetti; Vogelstein, 2015).

As células cancerígenas apresentam características fundamentais propostas por Hanahan e Weinberg que têm sido revisadas desde os anos 2000 e são cruciais para o seu desenvolvimento. Dentre elas destacam-se: a sustentação da sinalização proliferativa; evasão de supressores de crescimento; resistência a morte, resultando na imortalidade replicativa; indução ou acesso a vascularização por meio da angiogênese; capacidade metastática; reprogramação do metabolismo celular e evasão do sistema imune (Hanahan; Weinberg, 2011). De acordo com esses autores, os tumores vão além de massas de células cancerosas que se proliferam, podendo ser compreendidos como tecidos complexos, compostos de múltiplos tipos

celulares responsáveis por um ambiente heterogêneo, o que hoje conhecemos como microambiente tumoral, importante na evolução das neoplasias (Hanahan, 2022).

Vale salientar que o câncer não é uma doença recente, pois há registros em papiros egípcios, datados do século 7 a.C. (Mukherjee, 2012). Apesar dos avanços em novas terapias e métodos de diagnóstico, o câncer ainda consiste em um grande desafio para ciência e para saúde pública mundial devido aos elevados índices de morbimortalidade (Bray et al., 2024). Diversos fatores contribuem com o aumento cada vez mais constante dos casos de câncer na atualidade. Dentre eles a crescente globalização, a economia, o aumento da população atrelado ao crescente envelhecimento exponencial e fatores ligados ao desenvolvimento socioeconômico de cada região que também possuem forte relação com o aumento desses casos (Banna; Gondinho, 2019; Sung et al., 2021).

Nessa perspectiva, para o ano de 2020, a IARC registou cerca de 19,3 milhões de casos de câncer e 10 milhões de óbitos pela doença (Sung et al., 2021). Mundialmente é observado variação na incidência dos casos de câncer por regiões geográficas, especialmente nos países desenvolvidos que apresentam mais casos, diferente dos países em desenvolvimento que apresentam menos (**Figura 1**). Esse fato reflete na qualidade do sistema de saúde e nas diferentes características da população, como por exemplo, a disponibilidade de métodos de diagnóstico, informação e acesso (Sung et al., 2021).

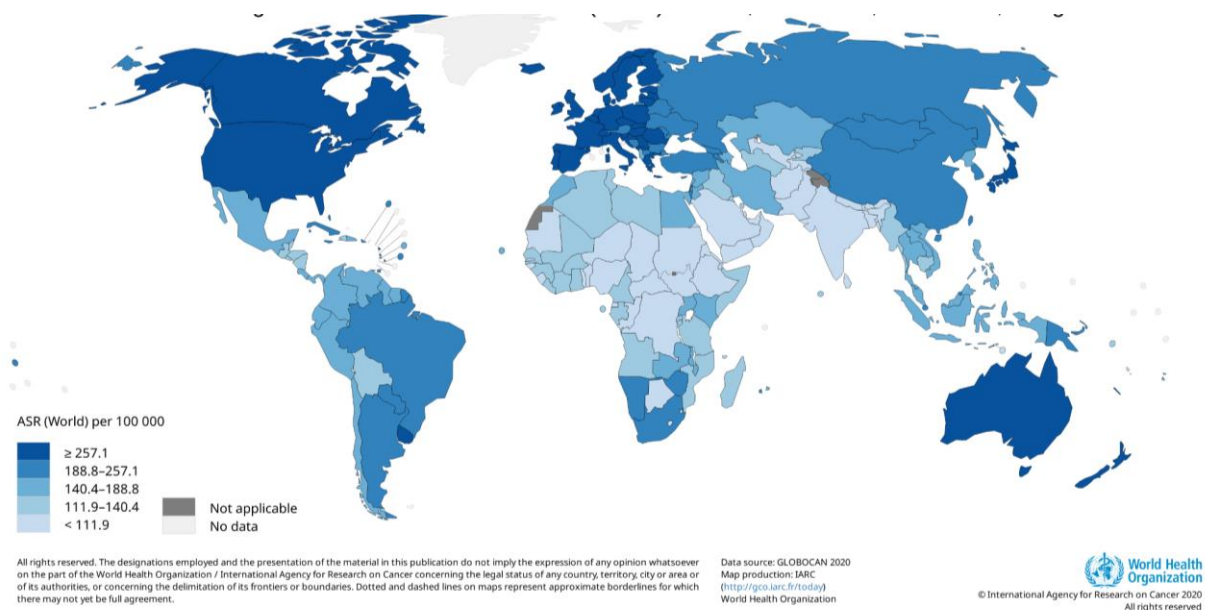


Figura 1: Distribuição geográfica da incidência mundial de câncer para o ano de 2020 por 100.000 habitantes.
Fonte: IARC, 2020.

No Brasil, o câncer também é reconhecido como um grave problema de saúde pública (INCA, 2020), o que resultou na inclusão dessa temática na agenda prioritária das políticas públicas de saúde, representando marco importante no enfrentamento da doença. Como resultado, houve a implementação de políticas e programas em todos os níveis de atenção (básica, média e na alta complexidade), que permitiram a organização de serviços capazes de garantir a assistência oncológica à população acometida pela doença (Migowski et al., 2018). Vale salientar que um estudo realizado pelo Observatório de Oncologia exibiu os gastos com ações de controle e tratamento por parte do governo federal girando em torno de 3,8 bilhões em 2018 (GLOBOCAN, 2020). Os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) demonstram variação de casos por região no Brasil (**Tabela 1**) (INCA, 2020).

Tabela 1: Distribuição de novos casos de câncer no Brasil por região no ano de 2020.

REGIÃO	ESTIMATIVA DE CASOS NOVOS
Sudeste	302.760 (48,4%)
Nordeste	136.220 (21,8%)
Sul	114.570 (18,3%)
Centro-Oeste	47.640 (7,6%)
Norte	24.830 (4,0%)
Brasil	626.030 (100%)

Fonte: Adaptado de INCA, 2020.

Ao analisar os casos novos por localização primária do tumor e a distribuição dos casos por sexo observa-se que no ano de 2020, o câncer de próstata nos homens e de mama nas mulheres foram os mais incidentes na população brasileira (**Figura 2**) (INCA, 2020). Já os dados de mortalidade mundial da doença mostram que a principal causa de morte por câncer está relacionada ao câncer de pulmão, colorretal e fígado e, o de mama, na população em geral, ocupa o 4º lugar, sendo a primeira causa entre mulheres (Sung et al., 2021).

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%	Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Figura 2: Estimativa de número de casos dos 10 tipos de câncer mais incidentes no ano de 2020, distribuídos por sexo (exceto câncer de pele não melanoma).
Fonte: INCA, 2019.

No Brasil, o câncer de mama é o mais diagnosticado em mulheres e é a principal causa de morte na população feminina, superando as mortes por câncer de pulmão, colorretal e fígado (INCA, 2020; Sung et al., 2021; Bray et al., 2024). Nesse contexto, estudos relacionados ao câncer são importantes para melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos e, assim, essenciais no seu entendimento e aplicabilidade para novas formas de profilaxia, tratamento e diagnóstico. O câncer de mama merece destaque por exibir altos índices de mortalidade na população feminina em comparação aos cânceres que mais matam no mundo todo, justificando, assim, a importância de estudos relacionados a essa doença.

2.1.2 Câncer de mama

Um dos primeiros registros de câncer que se tem conhecimento é de um papiro egípcio datado do século 7 a.C. relatando sobre enfermidades que assolavam a população, incluindo o que hoje é conhecido como o câncer de mama, descrito como “massas salientes que cresciam no peito e se espalhavam”. Dentre as histórias relatadas destaca-se a de Atossa - Rainha da Pérsia (550 a.C. - 475 a.C.) - que devido aos desconfortos constantes causados pela doença e, a necessidade de enfaixar a mama doente a fim de escondê-la, pediu a um escravo que extirpasse o seu seio com uma faca (Mukherjee, 2012). Atualmente os cânceres de mama são diferenciados de acordo com os tipos histopatológicos, grau de tumor, estágio da doença e subtipos moleculares (**Figura 3**) o que direciona para o tratamento mais adequado (Malhorta et al., 2010; Costa et al., 2020).

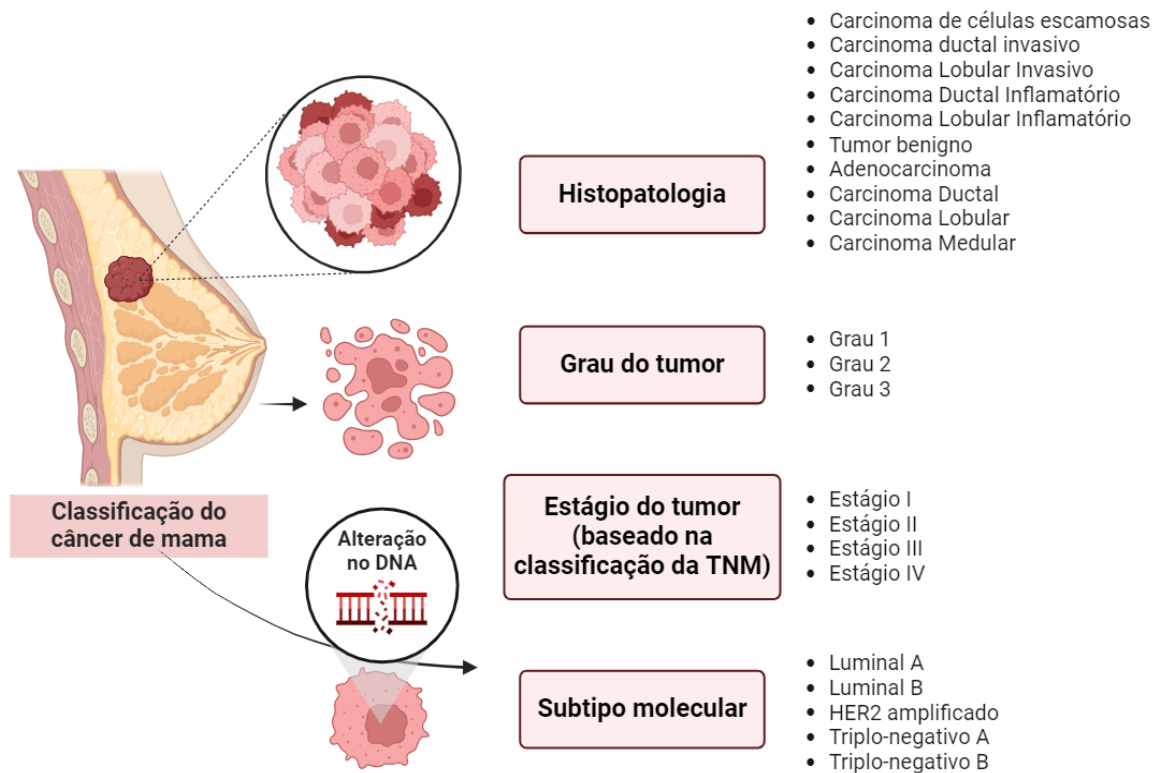


Figura 3: Representação esquemática da classificação dos cânceres de mama e suas variações de acordo com a histopatologia, grau do tumor, estágio do tumor e subtipo molecular.

Fonte: Adaptado de Costa et al., 2020.

O câncer de mama tem origem a partir de células neoplásicas da glândula mamária, especificamente na unidade lobular (unidade funcional da mama) ou no ducto, sendo o de origem ductal responsável por cerca de 80% dos casos. Os carcinomas ductais se dividem em *in situ* e invasor (INCA, 2020; Boix-Montesinos et al., 2021). O carcinoma ductal *in situ* é caracterizado pela proliferação de células epiteliais para dentro do ducto, que se não diagnosticado e tratado, pode progredir resultando no rompimento da camada de células epiteliais e a membrana basal e, assim, invadindo os tecidos adjacentes. Já o invasivo tende a crescer para fora do ducto e progredir, atingindo vasos linfáticos ou sanguíneos, pulmões, fígado, ossos e cérebro (**Figura 4**) (Boix-Montesinos et al., 2021).

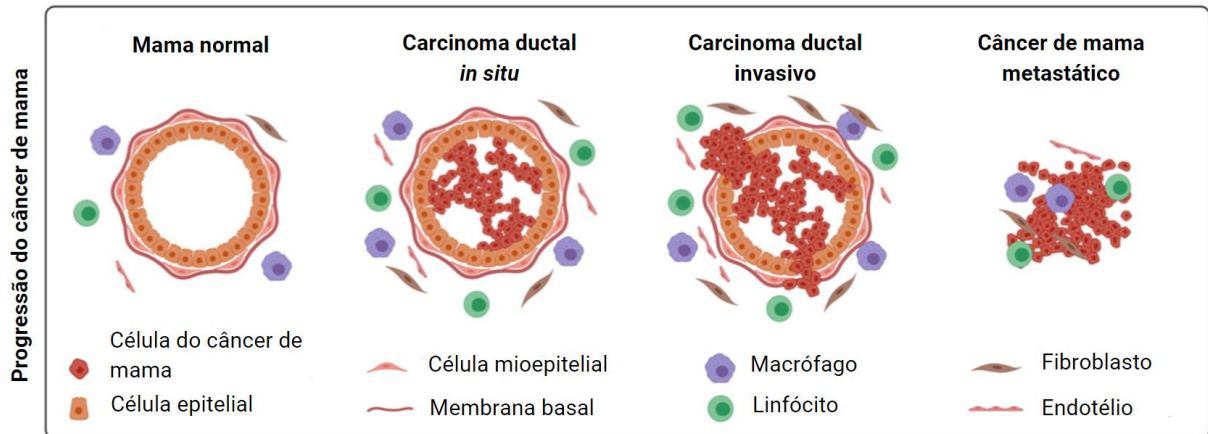


Figura 4: Progressão do carcinoma ductal invasivo desde o tumor primário até o estágio metastático.

Fonte: Adaptado de Boix-Montesinos et al., 2021.

Atualmente, sabe-se que o câncer de mama feminino, é a neoplasia maligna mais comumente diagnosticada em todo mundo, representando cerca de 2,3 milhões de novos casos, correspondente a 11,7% de todos os casos de câncer e 24,5% no sexo feminino. Além disso, dos 4,4 milhões de óbitos atribuídos por câncer nesta população, 680 mil são por câncer de mama, o que representa 15,5% dos casos, sendo a principal causa de morte entre mulheres, principalmente nos países em desenvolvimento (Sung et al., 2021). No mundo, o câncer de mama apresentou risco estimado de 55,5/100 mil, sendo a maior representatividade de casos na Austrália, Nova Zelândia, países do Norte Europeu e na Europa ocidental (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2018). No Brasil, os casos registrados de câncer de mama também seguem o mesmo padrão de incidência, sendo o tipo mais frequente com 29,7% para o ano de 2020 e a principal causa de morte por câncer, correspondendo a cerca de 16,4% dos casos de óbito na população feminina (INCA, 2020) (**Figura 5**).

Homens				Mulheres			
CID 10	Localização Primária	Óbitos	%	CID 10	Localização Primária	Óbitos	%
C33-34	Traqueia, brônquios e pulmões	16.371	13,9	C50	Mama	17.572	16,4
C61	Próstata	15.576	13,3	C33-34	Traqueia, brônquios e pulmões	12.346	11,5
C18-21	Cólon e reto	9.608	8,2	C18-21	Cólon, reto e ânus	9.995	9,3
C16	Estômago	9.387	8,0	C53	Colo do útero	6.526	6,1
C15	Esôfago	6.756	5,8	C25	Pâncreas	5.601	5,2
C22	Fígado e vias biliares intra-hepáticas	6.181	5,3	C16	Estômago	5.374	5,0
C25	Pâncreas	5.497	4,7	C80	Localização primária desconhecida	4.645	4,3
C00-10	Cavidade oral	4.974	4,2	C70-72	Sistema nervoso central	4.506	4,2
C80	Localização primária desconhecida	4.837	4,1	C22	Fígado e vias biliares intrahepáticas	4.369	4,1
C70-72	Sistema nervoso central	4.803	4,1	C56	Ovário	3.984	3,7
C91-95	Leucemias	3.902	3,3	C91-95	Leucemias	3.316	3,1
C32	Laringe	3.859	3,3	C26	Localizações mal definidas do aparelho digestivo	2.223	2,1
C67	Bexiga	2.998	2,6	C55	Útero, SOE	2.090	1,9
C82-85;C96	Linfoma não Hodgkin	2.426	2,1	C82-85+C96	Linfoma não Hodgkin	2.090	1,9
C64	Rim	2.288	1,9	C15	Esôfago	1.893	1,8
C26	Localizações mal definidas do aparelho digestivo	2.149	1,8				
-	Outras localizações	15.865	13,5	-	Outras localizações	20.705	19,3
Todas as neoplasias		117.477	100,0	Todas as neoplasias		107.235	100,0

Figura 5: Distribuição de óbitos por câncer no Brasil em 2018 de acordo com a localização primária, número bruto de óbitos e porcentagem, separadas por sexo.

Fonte: INCA, 2020.

Avaliando o cenário por região no Brasil, o câncer de mama é o mais frequente na população feminina em todas as regiões brasileiras. Em relação ao risco, a região sudeste exibe risco estimado de 81,06/100 mil, enquanto na região Norte é estimado 21,34 por 100 mil. Apesar da elevada prevalência, o câncer de mama, quando diagnosticado precocemente, apresenta um comportamento menos agressivo, dispensando a necessidade de cirurgias mais complexas, menos radiações ou até mesmo quimioterapia, sendo associada a maior sobrevida global. O diagnóstico pode ser feito a partir da mamografia, considerada o padrão-ouro, porém a sensibilidade do exame varia de 54% a 77% dependendo do tipo de câncer (Porto-Mascarenhas et al., 2017).

O câncer de mama é uma doença complexa, com características diversificadas relacionadas aos perfis fenotípicos, morfológicos e moleculares, exibindo apresentações clínicas diferentes (Anderson; Schwab; Martinez, 2014; Tang et al., 2016). Destes, os subtipos moleculares apresentam importante valor prognóstico e preditivo (Harbeck et al., 2019; Razzak; Marshal, 2019). A classificação molecular baseia-se na expressão de receptores de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR) ou ainda quanto a ausência total destes receptores, classificado como Triplo Negativo (TN) (Anderson; Schwab; Martinez, 2014; Nascimento; Otoni, 2020).

O subtipo molecular mais frequente é o Luminal A, sendo o mais comum, caracterizado pela alta expressão de ER e PR e baixa expressão de Ki67 e HER2 e apresenta prognóstico favorável e resposta positiva à terapia hormonal; o segundo tipo é o Luminal B, caracterizado pela expressão de ER e PR e elevada expressão de Ki67 e presença ou ausência de HER2 ou apresentando prognóstico menos favorável em relação ao primeiro e possuindo crescimento mais acelerado; O subtipo HER2+ possui alta expressão de HER2 e ausência na expressão de ER e PR exibindo crescimento tumoral mais rápido e prognóstico menos favorável; Por último, tem-se o triplo negativo (TN), representa 10-15% dos casos e é mais frequente em mulheres mais jovens (<40 anos), geralmente associado a mutações no gene BRCA1, não apresentam expressão de ER, PR e HER2, apresentam elevados índices mitóticos de Ki67, prognóstico menos favorável de todos e resistente a múltiplos tratamentos (Boix-Montesinos et al., 2021). As informações descritas estão resumidas na **tabela 2**.

Tabela 2: Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama a partir de seus biomarcadores, frequência dos casos, grau histológico, prognóstico e terapia associada. ER – receptor de estrogênio; PR – receptor de progesterona; HER-2 – receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2; PARP – Poli Adenosina Difosfato Ribose/Polimerase.

SUBTIPOS MOLECULARES	LUMINAL A	LUMINAL B		HER-2+	TRIPLO NEGATIVO
		HER 2-	HER 2+		
Biomarcadores	ER+	ER+	ER+	ER-	ER-
	PR+	PR-	PR-/+	PR-	PR-
	HER-2-	HER-2-	HER-2+	HER-2+	HER-2-
	Ki67 baixo	Ki67 alto	Ki67 alto/baixo	Ki67 alto	Ki67 alto
Frequência dos casos (%)	40-50%	20-30%		15-20%	10-20%
Grau histológico	Bem diferenciado (Grau I)	Moderada diferenciação (Grau II)		Pouco diferenciado (Grau III)	Pouco diferenciado (Grau IV)
Prognóstico	Bom	Intermediário		Ruim	Ruim
Terapia	Endócrina	Endócrina	Endócrina	Quimioterapia	Quimioterapia
	-	Quimioterapia	Quimioterapia	Terapia diferenciada	Inibidores de PARP
	-	-	Terapia diferenciada	-	-

Fonte: Adaptado de Nascimento; Otoni, 2020 e Boix-Montesinos et al., 2021.

Apesar do câncer ser uma doença multifatorial, fatores de risco no câncer de mama, como o sexo e a idade da paciente são considerados os mais importantes (INCA, 2019). Além disso, fatores intrínsecos como mutações hereditárias em genes como BRCA1 e/ou 2 ou histórico familiar de câncer de mama e ovário, também devem ser levados em consideração (INCA, 2019; 2020; Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2018; Sung et al., 2021). Dessa forma, compreender mais sobre os fatores de risco do câncer de mama pode levar diretamente à implementação de estratégias de prevenção mais eficientes, contribuindo para a redução da incidência da doença e, conseqüentemente, para uma melhoria significativa da saúde pública

2.1.3 Fatores de risco para o câncer de mama

O câncer de mama tem caráter multifatorial e envolve um conjunto de fatores relacionados ao estilo de vida, genéticos e endócrinos. Destes o sexo e a idade configuram como os principais fatores de risco para a doença (Desantis et al., 2017; INCA, 2020). Além desses, outros fatores estão fortemente relacionados, tais como o histórico familiar de câncer de mama e o respectivo grau de parentesco, compreendendo fatores ligados à hereditariedade, associados principalmente a disfunção de genes supressores tumorais da mama BRCA 1 e/ou 2 e a superexpressão do receptor HER2 (Anderson; Schwab; Martinez, 2014; Kaminska et al., 2015).

Além das condições socioeconômicas da população, outros também são considerados de risco e estão associados aos hábitos de vida da paciente, pois a obesidade, alimentação rica em gorduras, sedentarismo, consumo de álcool e tabagismo são importantes fatores que elevam o risco do surgimento do câncer de mama (Hulvat, 2020). Além disso, a exposição ao estrogênio, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, postergamento da primeira gestação, redução do período de amamentação e uso de contraceptivos orais ou de terapia de reposição hormonal combinada no pós-menopausa, aumentam consideravelmente o risco de desenvolvimento do câncer de mama (Kaminska et al., 2015; Kast; Rhiem, 2015; Ferlay et al., 2015; Geetika et al., 2017; INCA, 2020).

Alguns trabalhos também mencionam a inflamação como importante fator de risco para o surgimento de alguns cânceres, incluindo no câncer de mama (Danforth, 2021). A inflamação é entendida como determinante na progressão ou regressão de tumores, sendo o microambiente inflamatório crucial no curso da doença (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010). O microambiente inflamatório pode ser originado de processos inflamatórios persistentes devido a exposição prolongada a compostos não infecciosos (fumaça, sílica ou amianto) e infecciosos

(vírus, bactérias e parasitos), eventualmente contribuindo com a carcinogênese (Khandia; Munjal, 2020).

Como resultado da inflamação, pode ocorrer a produção de mediadores que eventualmente contribuem com o aumento da proliferação celular, ativação de oncogenes e angiogênese com redução ou perda do controle do crescimento normal celular (Shacter; Weitzman, 2002; Hanahan, 2022). A exploração do microambiente tumoral e a inflamação cada vez mais têm sido reconhecidos como importantes para a progressão do câncer e no desenvolvimento de metástases (Quail; Joyce, 2013; Hashim et al., 2016), entretanto, as lacunas existentes nas informações disponíveis destacam a necessidade de mais estudos para elucidar melhor esses mecanismos e desenvolver abordagens mais eficazes no tratamento e no controle do câncer.

2.1.4 Câncer e inflamação

A inflamação representa respostas fisiológicas inatas e adaptativas a estímulos nocivos, como patógenos, células danificadas e compostos químicos tóxicos, podendo se apresentar como aguda ou crônica. A inflamação aguda, pode evoluir para um processo crônico, a depender da gravidade e da persistência do dano (Furman et al., 2019). A inflamação crônica, além de envolver diversos processos metabólicos, está diretamente relacionada carcinogênese (Grivennikov et al., 2010; Hanahan; Weinberg, 2011; Ballerini et al., 2022).

A relação entre câncer e inflamação foi inicialmente estabelecida durante o século XIX por Rudolf Virchow (Khandia; Munjal, 2020). Contudo, cada vez mais trabalhos vêm mostrando que esse cenário é complexo (Piotrowski et al., 2020; Danforth, 2021; Hanahan, 2022). Além dos processos metabólicos envolvidos, a dinâmica do desenvolvimento tumoral é única, sendo cada tipo de câncer condicionado por requisitos específicos, e cada vez mais os resultados relacionados a inflamação e câncer são controversos (Grivennikov et al., 2010; Grivennikov, 2013; Palucka; Coussens, 2016; Piotrowski et al., 2020).

Nesse sentido, diversos trabalhos vêm mostrando a importância dos componentes do sistema imune para o controle da progressão tumoral e até mesmo a eliminação (Chen; Mellman, 2013; Mantovani; Allavena, 2015; Kumar et al., 2017; Bajgain et al., 2018; Mulder, 2019), outros mostram a inflamação como um fator crucial para carcinogênese (Grivennikov et al., 2010; Grivennikov, 2013; Palucka; Coussens, 2016; Ballerini et al., 2022), o que torna a discussão complexa.

Quando um tumor é formado, é comum ver a presença de infiltrados inflamatórios, muitas vezes compostos de linfócitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e células *natural killers* (NK) sendo as principais células presentes no microambiente tumoral (Whiteside, 2007). Atualmente sabe-se que essas células exercem papel fundamental na resposta antitumoral (Brown et al., 2014; Schalper et al., 2015; Nair; Dhodapkar, 2017). Entretanto, a depender do tipo celular e quantidade, os leucócitos podem resultar na progressão de cânceres devido aos mediadores produzidos no microambiente tumoral, tais como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteases (Qian et al., 2011; Shiels et al., 2013; Tang, 2013; Yeung et al., 2013; Zhu et al., 2014; Zaynagetdinov et al., 2015).

Nesse contexto, a intensa infiltração de leucócitos pode ser benéfica ou não, com trabalhos relatando pior prognóstico no câncer de pulmão (Mei et al., 2016; Zhang et al., 2011) e câncer de mama (Ruffell et al., 2012; Zhao et al., 2017), enquanto que no câncer colorretal (Mojarad; Esafahani; Zali, 2018), câncer de ovário (Darb-Esfahani et al., 2018) e câncer gástrico (Lee et al., 2018) a infiltração de leucócitos pode estar associada a um melhor prognóstico. Diversos estudos utilizando modelos animais têm sido conduzidos na tentativa de elucidar o papel das citocinas e suas aplicações na terapia antitumoral (Lee; Margolin, 2011; Berraondo et al., 2019). Além disso, sabe-se que as citocinas desencadeiam diversas funções biológicas, incluindo a progressão ou regressão do câncer (Lin; Karin, 2007; Grivennikov; Karin, 2011). Independente da fonte de produção, trabalhos têm mostrado que IL-12 (Sun et al., 2021) e IFN- γ (Finn, 2008; Schreiber et al., 2011; Braumüller et al., 2013; Sun et al., 2021) possuem eficácia antitumoral enquanto citocinas como IL-10 (Mocellin; Marincola; Young, 2005; Lee; Margolin, 2011), TGF- β (Becker et al., 2004), IL-5 (Zaynagetdinov et al., 2015), IL-6 (Becker et al., 2004; Khandia; Munjal, 2020), IL-8 (Alfaro et al., 2017), IL-17, IL-23 e TNF- α (Grivennikov et al., 2010) favorecem a progressão de alguns tumores.

Digno de nota, é necessário reconhecer que, independentemente da origem, agentes infecciosos podem induzir a secreção de citocinas, desencadeando respostas inflamatórias e afetar significativamente o microambiente tumoral. Essa interação complexa entre citocinas e câncer destaca a importância de explorar mais a fundo as relações entre agentes infecciosos, inflamação e o desenvolvimento do câncer.

2.1.5 Câncer e infecções

Apesar do conhecimento consolidado sobre os fatores ambientais responsáveis pela iniciação, promoção e progressão do câncer, historicamente centrados em agentes químicos e

físicos, é crucial destacar que fatores biológicos têm sido subestimados, incluindo as doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários e helmintos, pois estudos revelam o papel fundamental dessas condições na carcinogênese (Vennervald; Polman, 2009; Ingerslev et al., 2017; Knoll et al., 2018; Callejas et al., 2018).

Além do tabagismo, inalação de poluentes, alimentação e obesidade, é relevante observar que 25% dos cânceres estão ligados a infecções, especialmente as crônicas (Murata, 2018). Estima-se que as doenças infecciosas e parasitárias são responsáveis por cerca de 25% dos casos de câncer em humanos, podendo atingir até 50% em algumas regiões. Apesar dessa significativa influência global, o estudo dos agentes infecciosos como causa de câncer permanece subestimado, tanto pela população quanto pela comunidade científica (Knoll et al., 2018). No último levantamento realizado em escala global dos casos de câncer atribuídos a infecções, estima-se que aproximadamente 13% dos casos de câncer seriam reduzidos se parte dessas infecções fossem prevenidas ou tratadas (Martel et al., 2020). Quando esse índice é estimado para países em desenvolvimento, ocorreria redução de cerca de 26 a 29% de casos de câncer (Parkin, 2006; Vennervaldi; Polman, 2009).

A IARC estima que um a cada seis casos de câncer em todo mundo são causados por infecções virais (Chang et al., 2017), correspondendo a aproximadamente 10-15% dos casos (Knoll et al., 2018). Dentre os principais vírus envolvidos nessa associação, destacam-se o Papiloma vírus humano (HPV) 16 e 18, responsável pela maioria dos casos de câncer de colo do útero, pênis e alguns cânceres anogenitais, de cabeça e pescoço (Parfenov et al., 2014; Doorbar et al., 2015); o Vírus da Hepatite B (HBV) (Chang et al., 2009) e C (HCV) (Lozano et al., 2012), responsáveis pela maioria dos casos de carcinoma hepatocelular, sendo o HCV também associado a alguns casos de linfomas (Moore; Chang, 2010); o Vírus Epstein-Barr (EBV) ou Herpesvírus Humano 4 (HHV4), associado à maioria dos casos de linfoma de Burkitt, carcinoma de nasofaringe, distúrbios linfoproliferativos, linfomas Hodgkin e não-Hodgkin (Epstein; Achong; Barr, 1964; Kelly; Rickinson, 2007); HHV8, associado ao Sarcoma de Kaposi (Ganem et al., 2010; Mesri et al., 2010); Vírus Linfotrópico de Células T Humano tipo 1 (HTLV-1), associado à leucemia linfóide em adultos (Poiesz et al., 1980; Gallo, 2005).

Em relação às bactérias, a *Helicobacter pylori* recebe destaque pela associação com o câncer gástrico (Callejas et al., 2018). Além disso, muitos trabalhos têm evidenciado o papel da microbiota no surgimento do câncer, assim como já discutido por Hanahan e Weinberg (2011) e Fulbright e Ellermann (2017). Nesse sentido, estudos já relataram a interação microbiota com bactérias patogênicas, como é o caso da *H. pylori*, potencializando

a progressão do câncer de estômago (Noto et al., 2017). Além disso, também já foi relatado casos de carcinoma oral de células escamosas (Whitmore; Lamont, 2014); câncer de colorretal e associação com a disbiose intestinal (Koliarakis et al., 2019); e ainda relatos específicos com *Porphyromonas* (Han; Wang, 2013) e *Fusobacterium* (Rubinstein et al., 2013).

Por outro lado, as doenças parasitárias são responsáveis por uma pequena proporção de casos de cânceres, o que no último levantamento mundial realizado em 2018 correspondeu a 210.000 novos casos (Martel et al., 2020). Vale salientar que os parasitos são um importante grupo de agentes que exibem números de pessoas expostas ou infectadas mundialmente (Sripa et al., 2007; Mayer; Fried, 2007; Vennervald; Polman, 2009) e que muitos desses parasitos, em especial os helmintos, podem induzir respostas inflamatórias crônicas (Wu et al., 2021; Oliveira et al., 2024). Mesmo com esse conhecimento, a IARC reconhece apenas o *Schistosoma haematobium*, associado com o câncer de bexiga e o *Clonorchis sinensis* e *Opisthorchis viverrini* associados ao colangiocarcinoma de fígado, como carcinógenos (Vennervald; Polman, 2009; Martel et al., 2020).

Porém, estudos já mostram a relação de alguns tipos de câncer com outros parasitos. A construção deste tópico da revisão para o presente trabalho possibilitou a elaboração de um artigo de revisão que está sendo finalizado para submissão na revista **European Journal of Cancer** sob título ***Parasitic Infections and Cancer: Occurrence, immune aspects and Insights from Human Diseases and Experimental Models (Apêndice)***. A partir das evidências encontradas, informações relacionadas a infecções parasitárias e câncer foram sintetizadas na **tabela 3** para helmintos e **tabela 4** para protozoários, tais como: *Plasmodium falciparum* e o linfoma de Burkitt (Torgbor et al., 2014; Thorley-Lawson et al., 2016) e *Trichomonas vaginalis* associado ao câncer de próstata (Stark et al., 2009; Sutcliffe et al., 2009; Mitteregger et al., 2012). Além disso, alguns estudos *in vitro* com antígenos de parasitos sugerem um potencial risco para o surgimento de câncer, tais como: *Taenia solium*, induzindo danos ao DNA de linfócitos e aumento de translocação nos cromossomos 7, 11 e 14 em pacientes com neurocisticercose podendo levar a instabilidade cromossômica em linfócitos (Herrera; Ostrosky-Wegman, 2001; Herrera et al., 2003).

Um outro cenário explora a presença de parasitos como fator de risco para progressão do câncer. Em modelo murino foi demonstrado que a infecção por *Toxocara canis* pode ser um potencial fator de risco para a progressão do câncer de mama (Ruiz-Manzano et al., 2020; Kazemi et al., 2023). Nesse sentido, vale a pena destacar que pacientes oncológicos enfrentam diversas complicações devido à imunossupressão causada pela própria doença e/ou pela

quimioterapia (Sapolnik, 2003; Silva et al., 2011). Essa supressão deixaria o paciente mais suscetível a diversas infecções parasitárias, incluindo *A. lumbricoides*, previamente descrito como o helminto mais frequente em pacientes oncológicos (Silva et al., 2011; Jeske et al., 2017). Porém, levando em consideração que muitos desses pacientes também vivem em condições precárias de vida, poucos trabalhos têm mostrado a evidência de helmintoses em pacientes acometidos por algum tipo de câncer, incluindo a infecção por *Ascaris* spp.

Outros trabalhos têm investigado o potencial de regressão de alguns cânceres devido ao perfil de resposta inflamatória induzidas por alguns helmintos. Peptídeos de *Echinococcus granulosus*, por exemplo, foram associados à regressão do câncer de mama (Noya et al., 2013) e do câncer de cólon (Berriel et al., 2013), enquanto estágios larvais de *Taenia crassiceps*, já foram descritas envolvidas na regulação negativa do fibrossarcoma e câncer de colo retal associado à colite (Yousofi et al., 2012; León-Cabrera et al., 2014) e *Trichinella spiralis* em redução de metástases pulmonares decorrentes do melanoma (Kang et al., 2013).

Apesar dos helmintos serem os agentes parasitários mais prevalentes globalmente, há uma escassez de trabalhos que exploram sua associação com determinadas condições, incluindo com o câncer, limitando nossa compreensão completa dos potenciais impactos à saúde. Até o momento não foram encontrados trabalhos que explorem essa relação com o câncer em pacientes, apenas relatos da infecção frequente (Sitotaw et al., 2022). O conhecimento tem se tornado mais amplo, graças a utilização de modelos experimentais. A necessidade de trabalhos mais abrangentes nessa área é evidente, considerando o papel significativo que os helmintos podem desempenhar em diversas condições patológicas, incluindo na modulação da resposta imunológica (Maizels; McSorley, 2016).

Tabela 3: Visão geral sobre a relação entre helmintos e câncer encontrados em literatura, excluindo os casos de infecção por parasitos classificados pela IARC.

TIPO DE PARASITO	CARACTERIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO COM O CâNCER	REFERÊNCIAS
Helmintos		
<i>Anisakis</i> spp.	Presença em pacientes com câncer e potencial fator de risco.	Sonoda et al., 2014; Hernandez-Prera and Polydorides 2012; Corcuera et al., 2018; Perez, et al 2015
<i>Brugia pahangi</i>	Presença em paciente com carcinoma ductal.	Thongpiya et al., 2021
<i>Diectophyme renale</i>	Presença em pacientes com carcinoma renal.	Yang et al., 2019; Sardjono et al., 2008; Kuehn et al., 2016
<i>Dirofilaria immitis</i>	Presença do parasito em neurilemoma.	Ying Lia et al., 2013
<i>Echinococcus granulosus</i>	Presença em pacientes com câncer e potencial antitumorigenico de seus antígenos ou microRNAs.	Molina et al., 2007; Zedelj et al., 2021; Rad et al., 2018; Rostamirad et al, 2023; Mohammadi et al., 2021; Yasen et al., 2022
<i>Enterobius vermicularis</i>	Presença em pacientes com câncer.	Virgone et al., 2015; Coyne et al., 2020
<i>Hymenolepis diminuta</i>	A infecção não altera a progressão tumoral.	Sauer et al, 2021
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	A infecção reduz a migração de células malignas e progressão do câncer cervical	Jacobs et al, 2018
<i>Schistosoma</i> spp.	Possível relação entre esquistossomose intestinal e desenvolvimento de câncer; papel dos antígenos solúveis do parasito no desenvolvimento de alterações oncogênicas	Sabry et al., 2015; Wang et al., 2016; Imai et al., 2016; Paunovic et al., 2013; Herman et al., 2017; Wong et al., 2019; Sabino et al., 2016; Ruan et al, 2013; Alsharaydeh et al., 2017; Eissa et al, 2019; Eder, et al 2019; Lin, et al 2014; Tuffour, et al 2018; Roderfeld et al., 2020; El- Tonsy, et al 2013; Canepa, et al 2012; Liu et al., 2013
<i>Spirometra</i> spp.	Presença em paciente com linfoma	Tsuda, et al 2014
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Presença do parasito e exacerbação dos quadros de hiperinfecção e disseminação em pacientes com câncer	Kinjo et al., 2015; Glenn et al., 2017; Guerrero-Wooley et al., 2017; Seo et al., 2015; Zueter et al., 2014; Kosalka-Węgiel et al., 2020; Guevara Miranda et al., 2017; Abdelrahman et al., 2012; Konnick et al., 2016; Tanaka, et al 2016; Sahu, et al 2021; Alpern et al., 2017; Shelton et al., 2012
<i>Taenia</i> sp.	Presença do parasito e potencial papel tumorigênico	Herrera et al., 2000; Beaujot, et al 2015
<i>Toxocara canis</i>	Potencial papel anti ou pró-tumorigênico	Ruiz-Manzano et al., 2020; Bahadory et al., 2022; Kazemi et al., 2022

<i>Trichinella spiralis</i>	Potencial antitumorigênico e indutor da imunidade antitumoral	Yue et al., 2021; Eissa et al, 2019; Ruenchit et al., 2022 Luo et al., 2017; Elhasawy, Fawzya A. et al. 2021.; Kang et al. 2013
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Resistência e redução da frequência de metástases	Donskow-Lysoniewska et al, 2020

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4: Visão geral sobre a relação entre protozoários e câncer encontrados em literatura

TIPO DE PARASITO	CARACTERIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO COM O CâNCER	REFERÊNCIAS
Protozoários		
<i>Blastocystis</i> spp.	Maior risco de infecção em pacientes com câncer, especialmente colorretal	Sulżyc-Bielicka et al., 2021; Mahmoudvand et al., 2021; Labania, Lena et al. 2023.
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Presença em pacientes com câncer e potencial tumorigênico por alteração no microambiente tumoral	Abdou et al., 2013; Sulżyc-Bielicka et al., 2018; Certad et al., 2012; Benamrouz et al, 2014; Karabey, et al 2021; Sawant, et al 2021; Zhang, et al 2020
<i>Toxoplasma gondii</i>	Presença em pacientes com diferentes tipos de câncer; papel promissor do <i>T. gondii</i> como ferramenta para o estabelecimento de resposta protetora antitumoral	Hafez, 2020; Bajnok et al., 2019; Jung et al., 2016; Thomas et al., 2012; Sharafi et al , 2015; ZHU, Yu-Chao et al. 2021; Payne, et al 2021;Şahar et al., 2020; Zúñiga-Contreras et al., 2021;
<i>Trichomonas</i> spp.	Presença do parasito; possível efeito prótumorigênico pela indução de macrófagos M2	Zhang et al., 2019; Han, et al 2020; Kamarkhani et al., 2021
<i>Trypanosoma</i> spp.	Potencial antitumorigênico pela indução de resposta imune protetora	De Beule et al., 2017; Ubillos et al, 2015; Junqueira et al, 2012

Fonte: Autoria própria.

2.1.6 Estratégias de estudos experimentais em oncologia mamária e modelos experimentais

Estudos pré-clínicos relacionados ao câncer são essenciais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e no entendimento do comportamento das células tumorais no hospedeiro. Para isso, dependem da disponibilidade de modelos que mimetizam bem a evolução nos pacientes (Schrörs et al., 2020). Dentre os diversos modelos, o estudo do câncer em modelos *in vivo*, especialmente animais, promove o entendimento relacionado às diversas interações

entre as células tumorais e o respectivo microambiente, bem como o entendimento da progressão tumoral e metástase (Pantaleão; Luchs, 2010).

Os roedores, especialmente camundongos, representam um modelo muito utilizado na oncologia, devido ao tamanho, rápida reprodução, facilidade em modificação genética, menor custo, curta gestação e expectativa de vida que permitem a validação de vários experimentos em curto intervalo de tempo (De Jong; Maina, 2010; Costa et al., 2020). Os modelos animais são muito importantes para avaliação experimental por possuir características semelhantes aos tumores humanos (Zhou et al., 2023). Além disso, camundongos também possuem alta incidência de câncer de mama (Zeng et al., 2020). Isso pode ser explicado por diversos fatores como hormônios, hereditariedade e alimentação (Holland; Pogo, 2004).

Nesse sentido, para estudos em oncologia mamária, o conhecimento das glândulas mamárias em modelos experimentais e a forma como os diferentes carcinógenos interagem são de grande importância para elucidar os aspectos relacionados ao desenvolvimento do tumor (Avanzo, 2008). As glândulas mamárias em camundongos estão distribuídas em diferentes pares alojadas na camada adiposa subcutânea, incluindo regiões ventrais, flanco e regiões laterais, conforme mostra a **figura 6**.

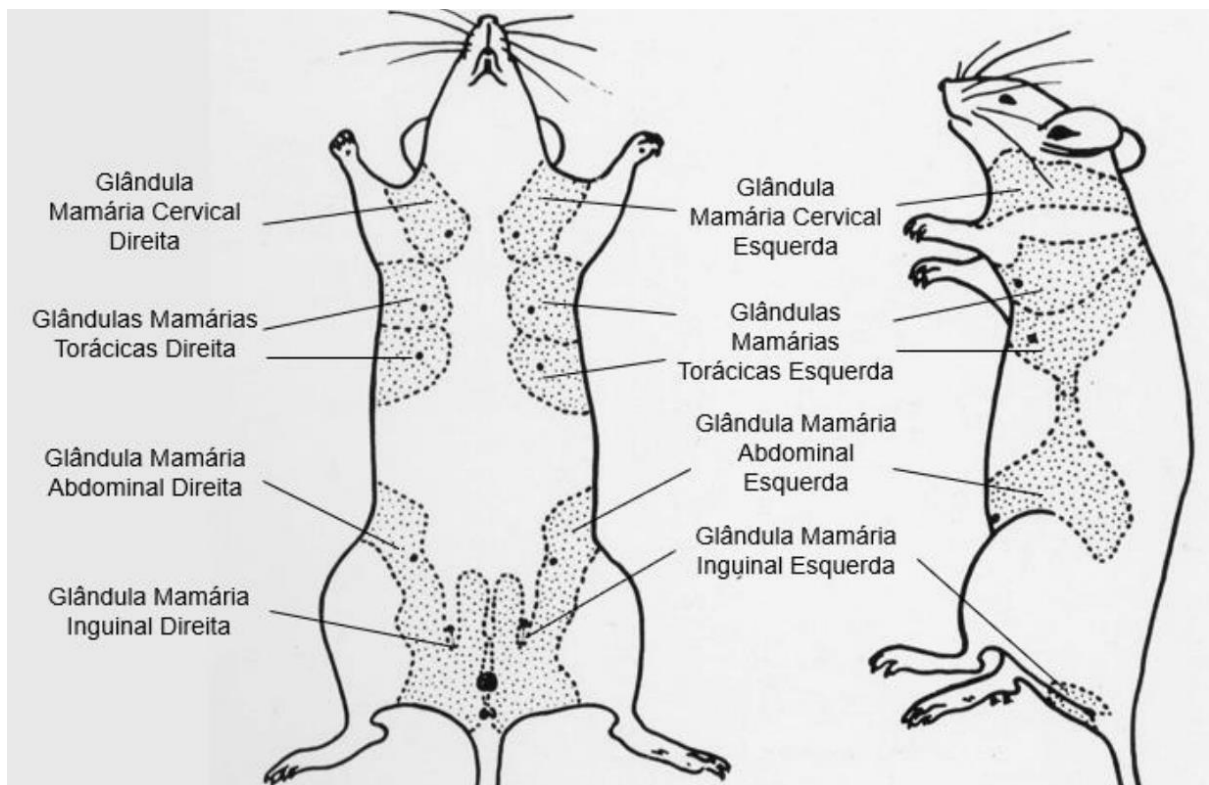


Figura 6: Distribuição e classificação das glândulas mamárias em camundongos.

Fonte: Adaptado de Hummel; Richardson; Fekete, 1966.

Existem diferentes abordagens para induzir câncer de mama em modelos murinos. Uma delas envolve a administração de carcinógenos químicos, como o 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA) (Jung et al., 2006; Karnam et al., 2017) e N-metil-Nnitrosureia (NMU) (Alvarado et al., 2017). Esses agentes são frequentemente usados em ratas da linhagem Sprague-Dawley (Vargo-Gogola; Rosen 2007; Al-Dhaheri et al., 2008; Liu et al., 2015) e Wistar (Alvarado et al., 2017), que resultam em tumores com características histopatológicas e alterações genéticas semelhantes às encontradas em humanos, especialmente tumores dependentes de hormônios. Curiosamente, em camundongos esses modelos induzem a formação de tumores independente de hormônios (Zarb, 2007).

Apesar da eficácia destes modelos, a indução se torna demorada e os tumores resultantes variam quanto ao tamanho e a localização (Costa et al., 2020). Além das formas químicas, a radiação também pode ser usada para indução de câncer de mama (Finerty et al., 1953; Ito et al., 1991; Imaoka et al., 2007), assim como para o transplante de tumores. Essa forma de indução consiste no transplante de células vivas em suspensão oriundas de tumores sólidos obtidos de um doador (Park et al., 2018). Diferentes linhagens celulares são utilizadas com essa finalidade, tais como: MDA-MB-231 (Pledge-Tracy et al., 2010), MDA-MB-435 (Leong et al., 2003), BT474 (Kaneko et al., 2024; Li et al., 2024), MCF7 (Jain et al., 2020; Imanimoghdam et al., 2024) e 4T1 (de Souza et al., 2014; Reis et al., 2019).

Os modelos de aloenxerto (modelos singênicos), quando o doador e o hospedeiro do tumor são da mesma espécie (Park et al., 2018), incluem um modelo experimental para câncer de mama humano amplamente explorado, o modelo de carcinoma de mama murino 4T1, que apresenta alto potencial invasivo e metastático, refletindo em estágio IV de câncer de mama em mulheres (Pulaski; Ostrand-Rosenberg, 2001; Gravekamp et al., 2008; Gupta et al., 2016; Tiash et al., 2016). Diversos estudos têm utilizado esse modelo, principalmente para investigar a progressão tumoral e avaliar a eficácia de terapias antineoplásicas, bem como novos métodos de diagnóstico (Ghaghada et al., 2011; Souza et al., 2012; Souza et al., 2013)

Inicialmente, a linhagem celular 4T1 foi isolada por Miller et al. (1983), derivada de uma subpopulação de tumor de mama de surgimento espontâneo em camundongos BALB/c. Essa linhagem demonstra características de pouco imunogenicidade, alta tumorigenicidade e invasividade quando transplantado para camundongos BALB/c, resultando em metástases espontânea para órgão como linfonodos, fígado, pulmão, ossos e cérebro, similar ao observado no câncer de mama humano (Pulaski; Ostrand-Rosenberg, 2001; Yoneda et al., 2000; Aslakson

et al., 1992; Eckhardt et al., 2005). O modelo celular 4T1 mimetiza bem o câncer de mama triplo negativo pela dinâmica de desenvolvimento e pela ausência de receptores de estrogênio, progesterona e HER2 (Kaur et al., 2012; Chiu et al., 2013; Parvani et al., 2015; Simone et al., 2016).

Cabe ressaltar que há uma escassez de estudos que abordem o papel da inflamação causada por helmintos no modelo celular 4T1. Até o momento, apenas dois estudos utilizaram esse modelo experimental para investigar a influência da infecção por *Toxocara canis* em modelo murino com carcinoma de mama 4T1 (Ruiz-Manzano et al., 2020; Kazemi et al., 2023), e não há registros de pesquisas envolvendo *Ascaris* com 4T1 ou com outro modelo celular.

2.2 Ascaridose

2.2.1 Contextualização

As infecções causadas por helmintos, também conhecidas como helmintoses ou popularmente como verminoses, representam um desafio para saúde pública devido à sua ampla distribuição geográfica, elevados índices de prevalência e, em muitos casos, morbidade significativa (Cavagnoli et al., 2015). Essas infecções são causadas por parasitos platelmintos e nematódeos e são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), que afetam bilhões de pessoas em todo mundo, principalmente em países de clima tropical e subtropical (Lustigman et al., 2012; Pullan; Brooker, 2012). De maneira geral, as DTNs impactam mais as populações mais pobres, devido às condições precárias de vida associadas à falta de saneamento básico e higiene inadequada. Esses fatores favorecem a contaminação da água e contribuem para propagação dessas doenças, especialmente em conglomerados (Manfroí; Stein; Castro Filho, 2009; de Souza et al., 2014).

Estima-se que aproximadamente 1,5 bilhões de pessoas estejam infectadas com alguma helmintose, o que equivale a 20% da população mundial (James et al., 2018). Dentre as diferentes helmintoses, destacam-se as geohelmintoses (Hazell; Braun; Templeton, 2019). Essas doenças são causadas por helmintos cujo uma das etapas do ciclo evolutivo ocorre no solo, sendo a principal fonte de infecção de ovos ou larvas (Lustigman et al., 2012). A sobrevivência, desenvolvimento e a transmissão dependem de fatores ambientais, como clima quente e úmido (Jia et al., 2012; Chieffi, 2015). Além disso, apresentam capacidade de resistir a diversos fatores climáticos e condições ambientais adversas (Holanda; Vasconcellos, 2015).

Por essa razão, são mais comuns na América Latina, onde a prevalência pode atingir cerca de 30% da população, ou ainda 50% em populações mais vulneráveis e até 95% em tribos indígenas (Cordón et al., 2008; Pullan; Brooker, 2012).

As espécies de geohelminthos que causam maior impacto na saúde são: *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, responsáveis por causar infecção por meio da ingestão de seus ovos e, *Strongyloides stercoralis* e os ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*), cujas larvas penetram ativamente na pele (Echazú et al., 2015). Os sinais e sintomas mais comuns associados a essas doenças incluem anemia, devido a deficiência de ferro e a desnutrição, que prejudica diretamente o crescimento e desenvolvimento cognitivo em crianças ainda em fase de crescimento. Além disso, a desnutrição também reduz o desempenho em atividades laborais em adultos, podendo levar a disfunção de órgãos e até mesmo a morte (Cavagnoli et al., 2015; McKay; Shute; Lopes, 2017; Claus et al., 2018).

2.2.2 Agente etiológico

A ascaridose humana é uma doença infectoparasitária antes relacionada apenas com helmintos nematódeos da espécie *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758) pertencentes ao filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, família Ascarididae e gênero *Ascaris* (Else et al., 2020). A ascaridose é possivelmente a primeira helmintose humana registrada, com o *A. lumbricoides* mencionado em textos da Mesopotâmia, Grécia, Roma e China. Inicialmente, esse nematódeo foi confundido com um anelídeo descrito como “minhoca” pelos gregos e romanos. Somente em 1758 que Linnaeus diferenciou e descreveu o gênero *Ascaris*, originando o nome da palavra grega **Askaris** (ασκάρης), que significa verme (Khuroo, 1996).

Até o momento, o Ministério da Saúde classifica apenas o *A. lumbricoides* como agente etiológico da ascaridose (Brasil, 2018; Brasil, 2022). Entretanto, outra espécie conhecida é o *Ascaris suum* (Goeze, 1782) até então associado apenas a infecções em suínos e por resultar em perdas econômicas significativas para a indústria devido a redução da massa corporal dos animais, deterioração da qualidade da carne e interferência na eficácia de vacinas (Dold; Holland, 2011; Knecht et al., 2012; Thamsbord et al., 2013; Vlaminck et al., 2014).

Por muito tempo acreditava-se que a infecção era específica entre espécie-hospedeiro devido às descrições epidemiológicas (Anderson et al., 1993) e experimentais (Takata, 1951). Entretanto, há décadas o potencial zoonótico de ambas as espécies têm sido motivo de debate pela comunidade científica (Anderson, 2001; Peng et al., 2007; Silva; Conceição; Leles et al., 2016). Dados na literatura já demonstraram que ambas as espécies podem ser patogênicas, tanto

para o ser humano quanto para suínos e, que ambas são capazes de completar seu ciclo independente do hospedeiro (Galvin 1968; Anderson, 2001; Peng et al., 2007; Sadaow et al., 2018; Avery, et al., 2018; Silva et al., 2021), embora exista uma predileção por hospedeiro, como destacado por Betson et al. (2014) e Monteiro et al. (2019).

Outras evidências apontam para uma frequência maior de infecções cruzadas entre humanos e suínos. Em um estudo recente, foi demonstrado que em uma vila onde a criação de suínos é pouco comum os parasitos recuperados em humanos possuíam genoma mitocondrial mais semelhante ao *A. suum* do que com *A. lumbricoides* (Easton et al., 2020). Nos países em desenvolvimento, onde humanos e suínos compartilham o mesmo ambiente, é frequente encontrar genótipos de *Ascaris* tipicamente associados aos suínos em seres humanos. Essas constatações fortalecem a hipótese de uma infecção cruzada nessas áreas e destacam o notável potencial zoonótico desses parasitos (Barbosa, 2015; Da Silva; Conceição; Leles, 2016).

Em modelo experimental, utilizando camundongos, também já foi demonstrado que não há diferença entre o padrão de migração das larvas e as alterações fisiopatológicas entre a infecção por *A. lumbricoides* e *A. suum* (Gazzineli-Guimarães et al., 2013). Esses achados reforçam a importância de medidas preventivas e de controle tanto em seres humanos quanto em animais para evitar a disseminação dessas infecções parasitárias.

2.2.3 Epidemiologia da ascaridose

A ascaridose é considerada a helmintose mais prevalente no mundo, sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente na Ásia Central e Sudeste Asiático, América Latina e África Subsaariana (Hotez et al., 2014; Silva; Massara, 2016; Holland et al., 2022). A prevalência da doença é registrada em mais de 150 países, com aproximadamente 450 milhões de pessoas infectadas (Pullan et al., 2014; Kyu et al., 2018; CDC, 2023) (**Figura 7**). Esse cenário impacta socioeconômica, uma vez que, em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS), considerando problemas de saúde, incapacidade e morte precoce, relatou que as helmintoses foram responsáveis pela perda de 9,5 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY). Deste número, 800 mil foram atribuídos somente a ascaridose juntamente com o registro de aproximadamente 3000 óbitos (GBD 2019; Else et al., 2020; Magalhães et al., 2021).

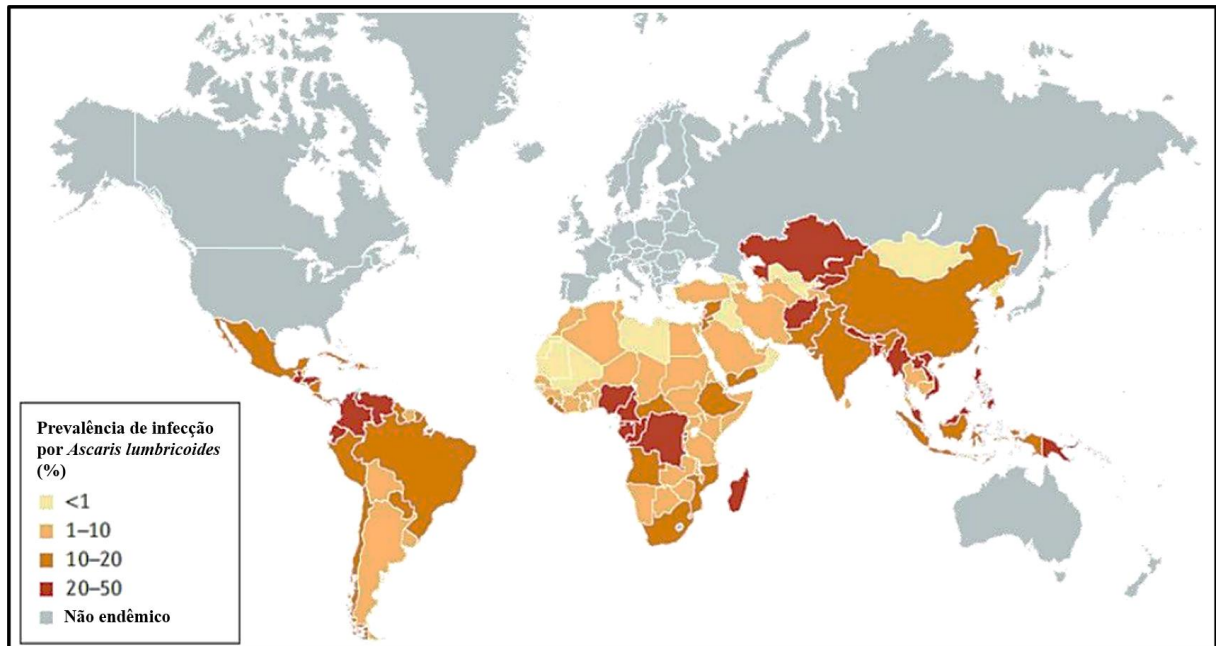


Figura 7: Distribuição mundial da ascaridose.

Fonte: Adaptado de Else et al. (2020).

A distribuição da doença, assim como as outras geohelmintoses, é diretamente ligada a fatores climáticos, pobreza, falta de saneamento básico e educação em saúde (Fortes et al., 2004; Barreto et al., 2010; Hotez et al., 2014; Magalhães et al., 2021). Esses fatores somados às condições do solo, desempenham papel crucial na transmissão de *Ascaris* spp. uma vez que alta umidade, temperatura entre 25-30°C e acidez entre 5,35-5,65 favorecem o desenvolvimento dos ovos do parasito (Pullan; Brooker, 2012; Chammartin et al., 2013; Chammartin et al., 2014). Embora a infecção possa ocorrer em qualquer faixa etária, crianças entre seis a dez anos de idade demonstram uma maior suscetibilidade do que adultos, especialmente do sexo feminino (Wright et al., 2018).

Ademais, a intensidade da infecção tende a ser menor em adultos em comparação com crianças (Holland et al., 1989). Além dos fatores ambientais e comportamentais que favorecem a transmissão do parasito, a genética do hospedeiro e a imunidade desempenham papel crucial na suscetibilidade à infecção (Dold; Holland, 2011; William-Blangero et al., 1999; 2022; Peisong et al., 2004; Acevedo et al., 2009) juntamente com a frequência de exposição ao parasito (Wright et al., 2018; Else et al., 2020).

As áreas rurais com baixo desenvolvimento econômico de países tropicais apresentam índices alarmantes. Estimativas apontam para cerca de 173 milhões de pessoas infectadas na África Subsaariana, o que equivale a 25% da população nessa região. No Sudeste Asiático, a

situação não é menos preocupante, com algumas áreas registrando uma taxa de infecção superior a 60%. Na América Latina e Caribe, aproximadamente 86 milhões de pessoas estão infectadas (Pullan et al., 2014). Vale destacar que cerca da metade desses casos se concentram no Brasil, com um número próximo a 40 milhões de pessoas infectadas (Hotez, 2008; Hotez; Kamath, 2009; Hotez et al., 2014).

Apesar do continente europeu e os Estados Unidos não serem áreas endêmicas (Else et al., 2020) é possível encontrar casos de infecção predominantemente em áreas rurais da Europa onde a prevalência pode chegar a 69% (Hotez; Gurwith 2011). Nos Estados Unidos, a situação não é muito diferente, com a prevalência que pode atingir os 50% na região sudeste do país, especialmente em comunidades de imigrantes oriundos de países em desenvolvimento (Valentine; Hoffner; Henderson, 2001; Starr; Montgomery 2011). No Brasil, conforme revelado pelo último inquérito epidemiológico realizado, os maiores índices de positividade foram registrados nas regiões Norte e Nordeste do país, com destaque para o Amazonas (19,14%), Maranhão (17,49%), Alagoas (14,26%), Sergipe (12,86%) e Pará (11,78%). Em contrapartida, no Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina as positivities ficaram em torno de 5%, enquanto no Espírito Santo 2,73% e em Minas Gerais 1,43% (Katz, 2018). Esses dados ilustram a significativa variação na prevalência da ascaridose dentro do território brasileiro e ressaltam a importância de estratégias de controle e prevenção adaptadas às realidades específicas de cada região. Além disso, é possível observar tendência à diminuição da prevalência em relação ao último levantamento epidemiológico (Saboyá et al., 2011).

É importante destacar que a determinação da prevalência da doença baseia-se no diagnóstico do parasito a partir de amostras de fezes para detecção de ovos de *Ascaris* spp. No entanto, os métodos parasitológicos de fezes tradicionais apresentam sensibilidade reduzida (Else et al., 2020). Isso se deve ao fato de que o período pré-patente da infecção pode durar cerca de 60 dias, durante os quais os métodos parasitológicos de fezes não conseguem detectar o parasito, especialmente durante a fase aguda da infecção, que envolve a migração hepato-pulmonar, e nas fases iniciais da fase intestinal. Além disso, em infecções leves com baixa carga parasitária, a sensibilidade desses métodos é ainda mais comprometida, especialmente em infecções exclusivamente com machos adultos do verme, o que resulta em resultados falso-negativos nos exames de fezes (Bharti; Bharti; Khurana, 2017). Dessa forma, vale destacar que, a prevalência desta parasitose pode estar sendo subestimada.

2.2.4 Morfobiologia de *Ascaris spp.*

Os helmintos pertencentes ao gênero *Ascaris* apresentam três estágios biológicos distintos: ovo, larva e adulto (**Figura 8**). No caso de *A. lumbricoides*, os ovos férteis são ovais com diâmetro variando de 45 a 75µm, caracterizados por uma estrutura composta por três camadas: uma mais interna (membrana vitelina), delgada e impermeável à água; uma camada intermediária mais espessa, quitinosa e transparente e a membrana mamilonada, camada mais externa, espessa e de superfície irregular composta principalmente por mucopolissacarídeos. Apresentam coloração branca e se coram de marrom/castanho na presença de pigmentos biliares nas fezes (Khuroo, 1996). A presença da membrana mamilonada confere resistência aos ovos às condições adversas do ambiente, como dessecação, e facilita sua aderência a superfícies, contribuindo para sua disseminação (Senecal; Nordin; Vinnerås, 2020).

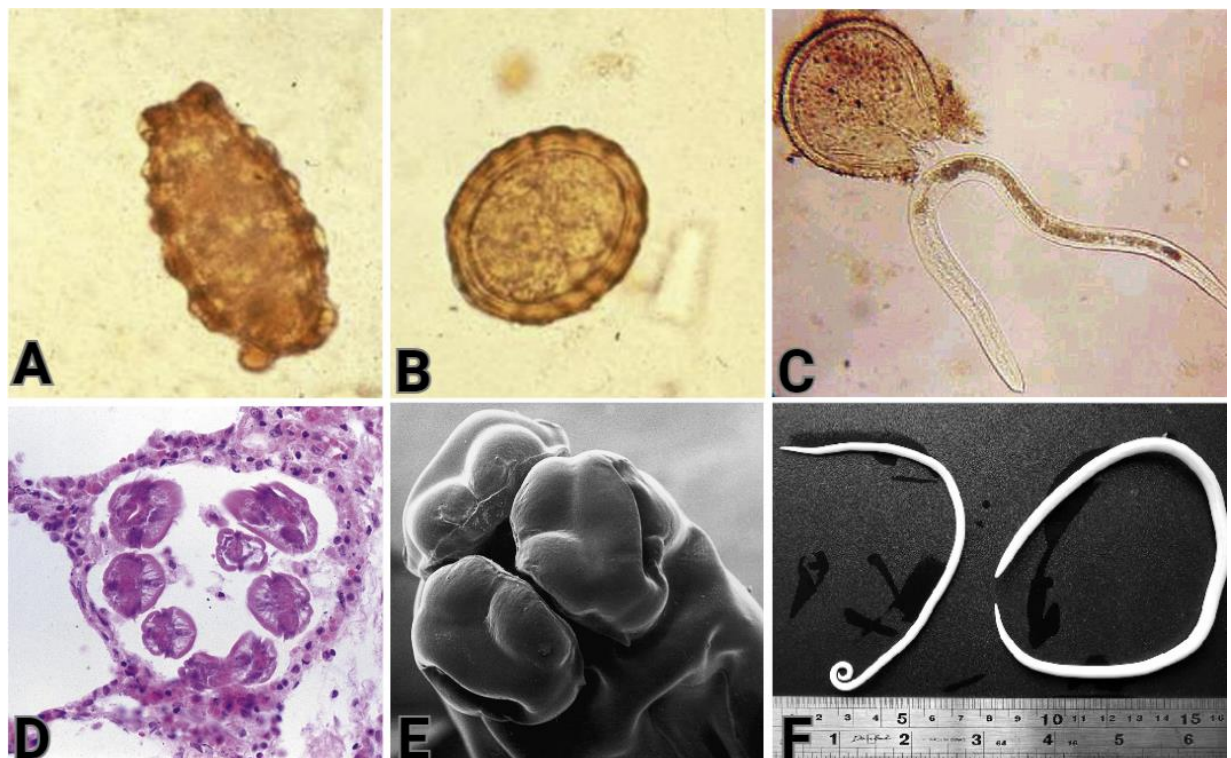


Figura 8: Estágios evolutivos de *Ascaris spp.* A: ovo infértil; B: Ovo fértil mamilonado; C: Larva L3 eclodindo; D: Secções transversais de larvas de *Ascaris lumbricoides* nos alvéolos pulmonares; E: Cabeça do verme adulto com enfoque nos três lábios típicos de *Ascaris*; F: Parasitos adultos fêmea mais robusta à direita e macho à esquerda com a extremidade posterior recurvada ventralmente.

Fonte: Adaptado de Nabarro; Morris-Jones; Moore, 2020.

Os vermes adultos são desprovidos de sistema circulatório, com seus sistemas fisiológicos sustentados no pseudoceloma. Na extremidade anterior, apresentam um vestíbulo bucal cercado por três lábios - um dorsal e dois lateroventrais - todos munidos de dentículos,

cujo formato permite a distinção entre *A. lumbricoides* e *A. suum* (Sprent, 1952; Barbosa, 2015). São vermes longos, cilíndricos, dioicos e com dimorfismo sexual. O macho tem a extremidade posterior recurvada, equipada com dois espículos que funcionam como órgãos acessórios de cópula, enquanto a fêmea apresenta uma extremidade caudal retilínea (Rey, 2011; Dold; Holland, 2011). Eles podem atingir aproximadamente 20-30 cm de comprimento (macho) e 30-40 cm (fêmea), com diâmetro variando de 3 a 6 mm, e possuem uma camada externa quitinosa com cutícula anucleada secretada pelo epitélio adjacente (Else et al., 2020). Essas proporções podem variar dependendo do estado nutricional do hospedeiro e da carga parasitária, devido à competição intraespecífica por nutrientes (Walker et al., 2010; Dold; Holland, 2011).

2.2.5 Ciclo biológico e transmissão de *Ascaris* spp.

Os parasitos do gênero *Ascaris* apresentam ciclo de vida monoxênico (Khuroo et al., 1996; 2016). De forma geral, os adultos habitam, principalmente, o jejuno e íleo do hospedeiro, porém, em infecções intensas com alta carga parasitária, podem ser encontrados também no duodeno, e podem viver por cerca de seis meses a dois anos (Rey, 2011; Khuroo et al., 2016; Else et al., 2020). Os adultos, ao atingir maturidade sexual, ocorre reprodução sexuada e cada fêmea diariamente pode ovipor cerca de 200.000 ovos. Esses ovos em contato com o solo em boas condições de temperatura, umidade, pH e oxigenação ocorre o embrionamento (Senecal; Nordin; Vinnerås, 2020). Digno de nota, na ausência dos machos, a fêmea também pode ovipor ovos inférteis (Holland; Behke; Dold, 2013).

No ambiente, os ovos em temperaturas em torno de 30°C, o embrionamento ocorre em cerca de 14 dias, enquanto em temperaturas mais baixas como 17°C o embrionamento pode chegar a 55 dias. No interior do ovo, inicialmente é formado uma larva de primeiro estágio (L1) que sofre duas mudas até se tornar L3, nessa fase os ovos tornam-se infectantes e, assim, podem permanecer viáveis no interior dos ovos por períodos prolongados (Else et al., 2020; Holland, 2021). Estudos têm demonstrado que, dependendo das condições climáticas, os ovos de *Ascaris* spp. podem permanecer viáveis no ambiente por períodos longos significativos. Por exemplo, observou-se que na Rússia os ovos podem resistir por até 14 anos, enquanto na Alemanha esse período é de até seis anos (Stephenson; Holland, 1987). Em solos tropicais caracterizados por um clima quente e úmido, a resistência dos ovos pode ser de até dois meses (Wong; Bundy, 1990).

A infecção ocorre via oro-fecal, quando o hospedeiro ingere ovos contendo larvas L3. Uma vez no estômago, os ovos são expostos à ação do suco gástrico e, em seguida, as larvas

eclodem no intestino delgado graças a estímulos do próprio hospedeiro, como pH, temperatura, sais e concentração de CO₂ (Murrel et al., 1997; Jourdan et al., 2017). Evidências recentes demonstram que a eclosão de larvas e migração para outros órgãos, podem acontecer no próprio estômago (Wu et al., 2024). Após a eclosão, as larvas alcançam o ceco e penetram a mucosa atingindo os vasos sanguíneos, dando início a migração hepato-traqueal, marcando o início da fase aguda da doença. As larvas atingem a veia mesentérica superior, chegando ao fígado através da circulação portal (Murrel et al., 1997; Jourdan et al., 2017). Uma vez no fígado, as larvas aumentam consideravelmente de tamanho, deixam o órgão e avançam primeiro para o coração e depois para os pulmões por meio da corrente sanguínea, caracterizando, assim, o ciclo de Loss. Em seguida, atingem o parênquima pulmonar até chegarem nos alvéolos, onde sofrem muda para L4 devido à alta concentração de oxigênio e ascendem a árvore brônquica, provocando expectoração no hospedeiro, alcançando a laringe e posteriormente, são deglutidas, retornando ao intestino delgado. Esse processo leva aproximadamente 20-30 dias, e até os parasitos atingirem a maturação sexual e iniciar oviposição leva cerca de 60 dias (Dold; Holland, 2011). O processo de infecção no humano é esquematizado na **figura 9**.

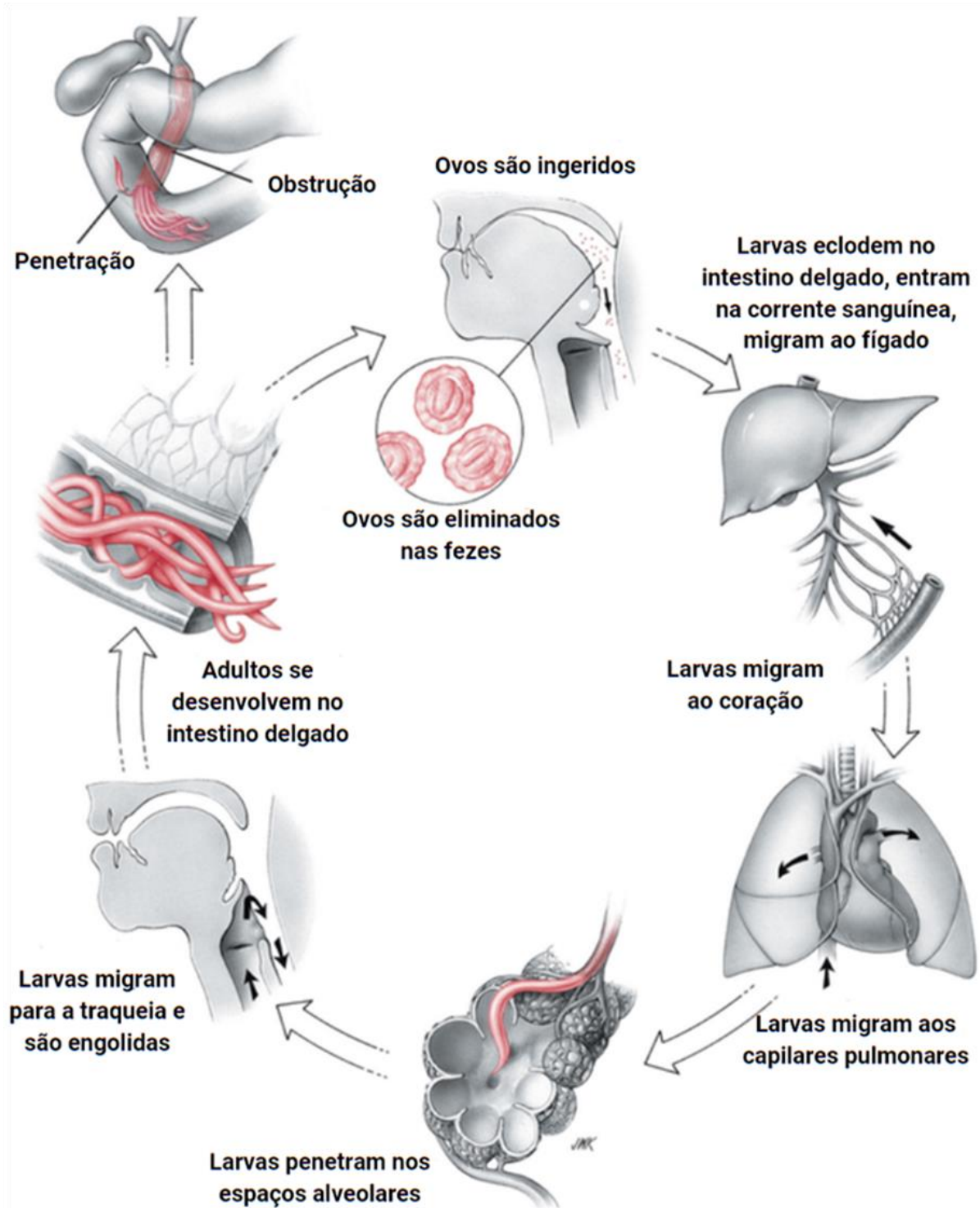


Figura 9: Ciclo biológico de *Ascaris spp.* em humanos.

Fonte: Adaptado de Despommier et al., 2019.

Além disso, é importante destacar a utilidade dos modelos murinos na exploração dos aspectos relacionados à infecção por *Ascaris spp.* Uma das peculiaridades é que o parasito não completa o seu ciclo evolutivo devido à incompatibilidade entre o tamanho do parasito adulto e o tamanho do intestino do camundongo, o que inviabiliza o estudo da ascaridose crônica. Por

outro lado, o modelo murino reproduz de forma eficaz a fase aguda da ascaridose, correspondente a migração hepato-traqueal do *Ascaris* spp. Devido às considerações éticas e à complexidade logística associada à investigação da ascaridose larval, os modelos animais surgem como uma alternativa viável (Holland; Behke; Dold, 2013; Gazzineli-Guimarães et al., 2013; Nogueira et al., 2016).

No camundongo, após a ingestão dos ovos infectantes, as larvas L3 eclodem no lúmen do intestino delgado. Em seguida, penetram a mucosa na altura do ceco, alcançando a circulação sanguínea e sendo transportadas ao fígado pelo sistema vascular portal, atingindo o pico de migração aos quatro dias após a infecção. Posteriormente, alcançam os pulmões, por volta do sexto dia e aos oito, atingem o pico máximo de larvas. Após 10 a 12 dias, as larvas retornam ao intestino delgado e são expelidas pelo roedor, não sendo mais observada a presença de larvas após 14 dias (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013). Vale destacar que evidências mais recentes demonstram que as larvas também podem eclodir no próprio estômago e migrar para os órgãos (Wu et al., 2024). O processo de infecção no camundongo é esquematizado na **figura 10**.

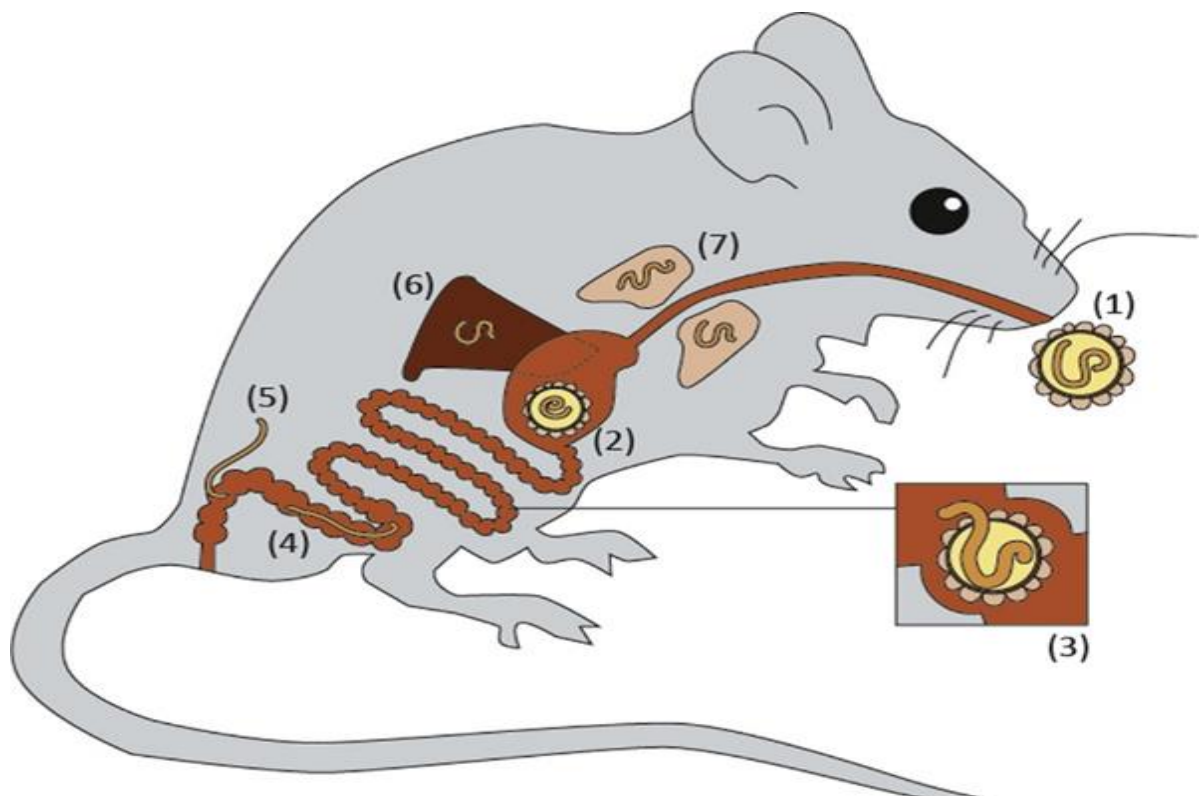


Figura 10: Ciclo biológico de *Ascaris* spp. em modelo murino. 1) Infecção por ovos larvados; 2) Passagem pelo estômago; 3) Eclosão das larvas L3 no intestino delgado; 4) Migração de larvas até o intestino grosso; 5) Penetração da mucosa do ceco; 6) Larvas chegam até o fígado; 7) Larvas chegam aos pulmões.

Fonte: Holland; Behke; Dold, 2013.

Apesar dos diferentes aspectos explorados em modelo experimental, a maioria dos trabalhos exploram os aspectos fisiopatológicos e imunológicos no pico da migração larval nos tecidos (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Nogueira et al., 2016; Gazzinelli-Guimarães et al., 2018; Nogueira et al., 2019; Oliveira et al., 2022) e poucos exploraram os impactos no hospedeiro tempos após a migração da larva (Wu et al., 2021; Oliveira et al., 2024). Além disso, muitos estudos avaliam a dinâmica da infecção utilizando uma carga padrão alta de 2500 ovos totalmente embrionados, o que não reflete o cenário real da infecção humana onde ocorre ingestão de doses mais baixas (Crombie; Anderson, 1985). Poucos estudos avaliam a infecção com doses mais baixas (Lewis et al., 2009). Além disso, com base nos achados recentes de Wu et al., (2021) e Oliveira et al., (2023) pouco se sabe sobre os aspectos da inflamação crônica promovida pela migração larval de *Ascaris* spp. e as consequências para o hospedeiro.

2.2.6 Manifestações clínicas e fisiopatologia da ascaridose

De forma geral, a maioria das pessoas infectadas por *Ascaris* spp. são assintomáticas devido às cargas leves ou moderadas de parasitos (Soderberg et al., 2003). Os quadros clínicos relacionados aos casos sintomáticos ocorrem devido à alta carga parasitária ou em infecções múltiplas devido ao poliparasitismo causado pela presença de outros helmintos (Brooker et al., 2000; Silva et al., 2011; Cunha, 2013).

A doença pode ser dividida em fase aguda, a qual diz respeito a migração hepato-pulmonar das larvas do parasito, e crônica, quando ocorre o estabelecimento de parasitos adultos no intestino delgado (Nogueira et al., 2016). Entretanto, os sintomas, quando presentes, são inespecíficos, podendo se apresentar com dor abdominal, náusea, diarreia e anorexia (De Silva et al., 1997). A intensidade da doença está ligada com a carga parasitária do hospedeiro (por volta de 10.000 ou mais ovos por grama de fezes) e acompanham o curso da infecção de acordo com a migração larval no hospedeiro (Else et al., 2020). Crianças em idade escolar, são as mais afetadas com parte dos sintomas, especialmente devido ao estreito lúmen intestinal e devido aos hábitos de higiene e geofagia que as tornam mais suscetíveis (Scott, 2008; Dold; Holland, 2011).

Focando na fase aguda da doença, devido a passagem das larvas nos órgãos alvo, ocorre o surgimento de sinais e sintomas clínicos devido a resposta do hospedeiro. Inicialmente, no fígado, o parasito pode levar a obstrução dos ductos biliares (Louw, 1966; Morano; Morano, 1988; Sanjeev; Lum, 2012; Wang et al., 2013; Asif et al., 2014; Umetsu et al., 2014; Azhar et

al., 2015; Khuroo et al., 2015), fibrose hepática colelitíase e até mesmo a abscesso hepático (Chauhan et al., 2015), mais associada à fase crônica da doença (Choi; Seo, 2017; Ismaili-Jaha et al., 2018). Digno de nota, estudos envolvendo fígado são escassos e pouco explorados.

No pulmão, as manifestações mais encontradas na literatura são relacionadas ao trato respiratório, que podem levar ao aumento da resposta inflamatória decorrente da migração de neutrófilos e eosinófilos, podendo evoluir para pneumonia eosinofílica, caracterizando a síndrome de Löeffler (Herrera; Meneses, 2005; Alves; Souza; Sanches, 2012; Guimarães, 2014). Além disso, a migração das larvas no pulmão provoca o surgimento de focos hemorrágicos, edema nos septos alveolares e, devido aos danos na arquitetura do parênquima, ocorre aumento das áreas de infiltrado inflamatório, resultando em pneumonia, febre, tosse, dispnéia, bronquite e até asma. A tosse muitas vezes é produtiva podendo ocorrer hemoptise e conter larvas do parasito (Valentine; Hoffner; Henderson, 2001; O'lorcain; Holland, 2000; Dold; Holland, 2011; Andrade et al., 2015; Shah; Shahidullah, 2018; Taghipour et al., 2020). Também é possível ocorrer reação de hipersensibilidade 1 aos estágios larvais (Jourdan et al., 2018).

A migração da larva também pode ocorrer em outros órgãos resultando, por exemplo, em apendicite (Louw, 1966), ascaridose pancreática (Louw, 1966; Galzerano et al., 2010; Azhar et al., 2015) e ascaridose escrotal (Dey et al., 2012). Na fase crônica, boa parte dos sintomas é dependente da carga parasitária. De forma geral, os parasitos se alimentam de nutrientes provenientes da digestão do hospedeiro, podendo levar a subnutrição, especialmente em crianças. Além disso, os parasitos adultos podem se enovelar no lúmen intestinal e levar a quadros obstrutivos no intestino resultando no desenvolvimento de volvulus que podem resultar em áreas gangrenadas devido aos processos isquêmicos no órgão (Kanneganti; Makker; Remy, 2013) e hematêmese (Ahmed et al., 2015), e também pode ocorrer cólica, náusea, edema e urticária na região abdominal.

Outra consequência ocorre quando há deslocamento do parasito para outro órgão como ductos biliares levando a colelitíase (Choi; Seo, 2017; Ismaili-Jaha et al., 2018). A ascaridose pode levar a intolerância a lactose e má absorção de vitaminas (Bethony et al., 2006), levar a desnutrição, atraso no crescimento e desenvolvimento cognitivo de crianças, resultados adversos na gravidez e redução do desempenho de adultos (Echazú et al., 2015; Claus et al., 2018). Além disso, o parasito adulto pode agravar quadros de trauma em pacientes atendidos na emergência, devido a obstrução traqueal levando a hipóxia e prolongar por mais tempo a permanência de pacientes na internação (Valentine; Hoffner; Henderson, 2001; Li et al., 2014).

2.2.7 Resposta imunológica na ascaridose

De forma geral, os helmintos apresentam diferentes estratégias de infecção e são capazes de modular a resposta imunológica, especialmente por induzirem respostas do tipo 2, mediadas por importantes citocinas como a Interleucina (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que levam a mecanismos efetores como produção de imunoglobulina (Ig)-E, ativação de mastócitos, eosinófilos, basófilos, contração da musculatura lisa e produção de muco intestinal (Bouchery et al., 2014). Além disso, também induzem a secreção de citocinas associadas às células T regulatórias (Treg) como IL-10 e TGF- β (Jackson et al., 2009).

Alguns trabalhos mostram que a doença clínica e impactos mais graves relacionados à infecção por helmintos surgem em decorrência do desequilíbrio entre as respostas Th2/Treg, ou em perfis de suscetibilidade como altas respostas Th1 não controladas. O conhecimento sobre a diferenciação de células T em resposta aos helmintos vem sendo desafiado pela descoberta de padrões mais complexos, pois além de haver ativação das respostas Th1, Th2 e Treg durante a infecção, alguns trabalhos mostram o envolvimento das respostas Th17, Th9 e Th22 (Belkaid; Tarbell, 2009; Bouchery et al., 2014; Oliveira et al., 2023). Poucos trabalhos têm evidenciado a participação do perfil Th9 e Th22 na infecção aguda (Bouchery et al., 2014). Além disso, essas citocinas levam a migração de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleadas, levando a infiltrados inflamatórios que se mostraram protetores ao hospedeiro (Nogueira et al., 2016).

Na fase aguda, os danos teciduais desencadeiam a liberação de alarminas, tais como IL-25, linfopoetina estrômica tímica (TSLP) e IL-33 as quais promovem ativação e regulação de células inatas, incluindo neutrófilos, eosinófilos, células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) e macrófagos ativados alternativamente, bem como células TCD4⁺ 2 ou T helper (h)-2. Uma vez ativada, essas células liberam citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Cooper et al. 2000; Weatherhead et al. 2020; Else et al., 2020; Magalhães et al., 2021).

Em modelo experimental, foi observado que após única exposição às larvas de *Ascaris* spp. no pulmão induzem um mix de citocinas Th1/Th2 com a secreção inicial de IL-5, seguido da alta produção de IL-6 e TNF- α , bem como a participação de citocinas IL-17 citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Favoretto et al., 2014). Além disso, ocorre a participação de alarminas como IL-33 e quimiocinas como CCL11 (eotaxina), CCL2 e CXCL10 (Else et al., 2020). Em um cenário de reinfecção, a ascaridose agrava o dano tecidual devido à intensidade de larvas que por ali passam, levando a um aumento de células inflamatórias com mix de citocinas Th2/Th17 (Nogueira et al., 2016). Evidências

também sugerem que a participação de eosinófilos desempenha importante função na produção de IgA secretória (SIgA), e há uma importante ação de controle da infecção associada a receptores inatos *toll-like receptors* (TLR)1, TLR2 e TLR4 (Nogueira et al., 2021). As informações resumidas a respeito da resposta imune na ascaridose após única exposição e em re-infecções são mostradas na **figura 11**.

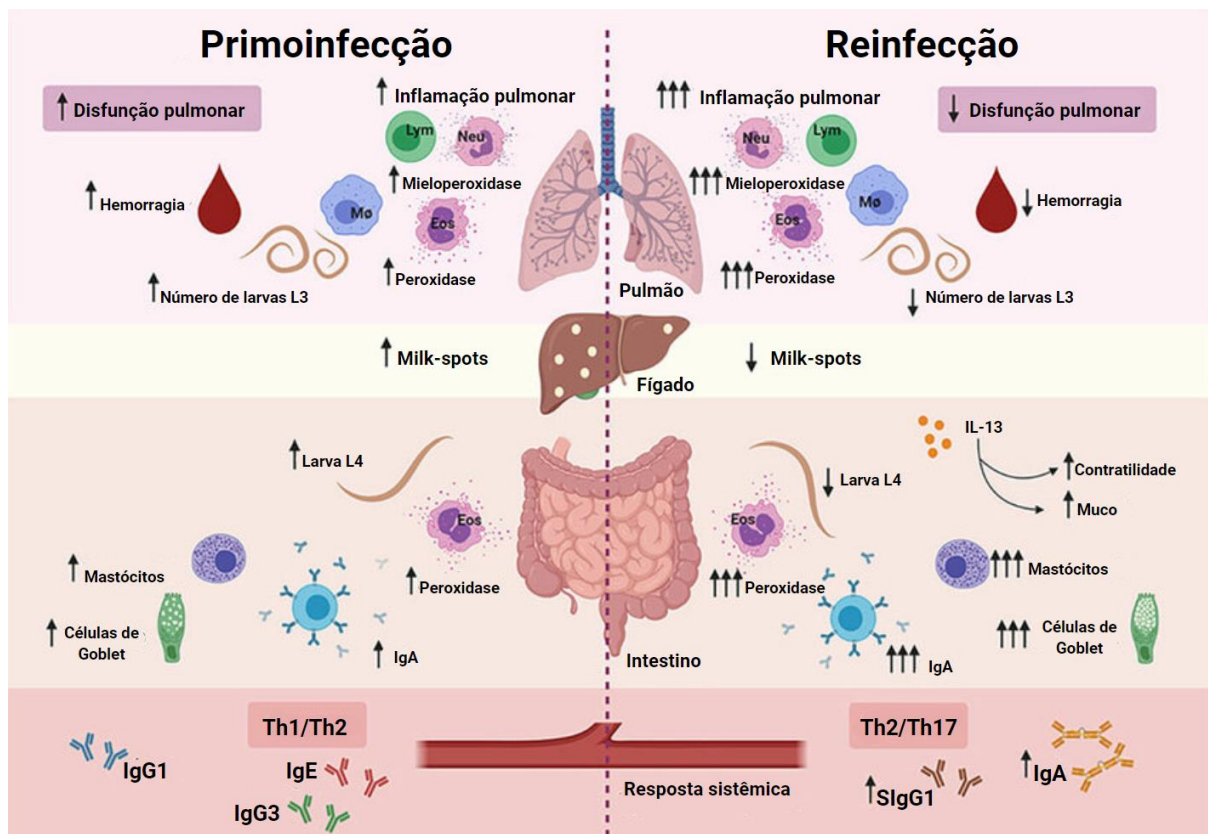


Figura 11: Dinâmica de resposta imune em diferentes órgãos na primoinfecção e reinfecção ao *Ascaris suum*. Nos pulmões, após uma única exposição, ocorre aumento na intensidade da inflamação pulmonar e celularidade com aumento do número e status de ativação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos. No entanto, os animais reinfetados apresentam menor carga larval, menos hemorragia e comprometimento pulmonar. Também há redução no número de fibrose no fígado de animais reinfetados. No intestino, os animais reinfetados apresentam aumento no número e estado de ativação de eosinófilos, mastócitos e células caliciformes com maior expressão de IL-13 que leva ao aumento da peristaltase e secreção de muco. Todos esses fatores culminam com larvas de L4/adulto jovem mais baixas. Demonstrou-se que a infecção prolongada induz a geração de anticorpos específicos ao parasito, com predominância de IgG1 e IgA, enquanto a infecção primária recente há predominância de IgG1, IgG3 e IgE polirreativos. A resposta das citocinas também difere dos modelos após única exposição e em modelos de reinfecção. A predominância de um mix de respostas Th2/Th17 ocorre em reinfecções enquanto após única exposição ocorre fenótipo Th1/Th2.

Fonte: Adaptado de Magalhães et al., 2021.

A longo prazo, mesmo não havendo larvas migrando pelos tecidos, estudos indicam que há persistência de uma resposta inflamatória por até 3-9 meses após a infecção (Wu et al., 2021).

Evidências demonstram que isso ocorre devido à presença de antígenos do parasito no tecido que já foram observados por até 70 dias (Oliveira et al., 2024). Aos 42 dias após a infecção, é observado aumento das citocinas IL-10, IL-1 β , IL-33 e IL-12 e ainda aos 70 dias após a infecção, verifica-se um aumento das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17A, evidenciando uma resposta inflamatória prolongada e complexa induzida pela infecção por *Ascaris* spp. (Oliveira et al., 2024). Além disso, trabalhos já mostram o envolvimento de metaloproteinases (MMP)-9 e MMP-12, IL-4, IL-5 e IL-13 que podem persistir por até 3 meses, e quimiocinas como CXCL1 e CCL3 que podem persistir até 9 meses após a infecção (Wu et al., 2021).

A fase crônica em humanos está associada à alta resposta Th2, caracterizada por elevados níveis de anticorpos IgG, IL-4, IL-5 e IL-13 (Scott, 2008). Além disso, há participação de células mononucleares circulantes responsáveis pela produção de citocinas como IL-10 e TGF- β (Cooper; Figueiredo, 2013), o mesmo padrão observado em modelo experimental após múltiplas exposições ao *A. suum*, sugerindo que a presença dessas citocinas é determinada pela fase aguda do parasito e que podem persistir no hospedeiro (Nogueira et al., 2016)

2.2.8 Ascaridose e doenças crônicas não transmissíveis

As doenças tropicais negligenciadas, incluindo a ascaridose, exibem maiores índices de morbidade do que mortalidade, o que resulta em negligência na agenda mundial de saúde (Engels; Zhou, 2020). Por outro lado, as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) matam e incapacitam cada vez mais pessoas com menos de 60 anos (WHO, 2010; Schmidt et al., 2011). Essas doenças incluem as doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e as doenças respiratórias crônicas (Malta et al., 2019). Apesar da baixa mortalidade, Magalhães et al. (2021) demonstra que cada vez mais a ascaridose apresentam consequências que vão além da infecção, influenciando uma variedade de condições clínicas, indicando numerosos fatores desconhecidos e complexos na investigação dessa parasitose.

A inflamação causada por *Ascaris* spp. foi associada a diversas comorbidades, tais como inflamação alérgica pulmonar (Acevedo; Caraballo, 2011; Weatherhead et al., 2018), pneumonia eosinofílica (Leoffler, 1956; Gelpi; Mustafa, 1968; Nutman, 2007; Kunst et al., 2011), condições similares à asma (Phills et al., 1972; Leonardi-Bee et al., 2006; Endara et al., 2015; Caraballo et al., 2019; Taghipour et al., 2020); fibrose pulmonar (Nogueira et al., 2016; Gazzinelli-Guimarães et al., 2018; Oliveira et al., 2019), e enfisema (Wu et al., 2021).

Alguns trabalhos têm evidenciado que, mesmo sem a presença de larvas nos tecidos, a inflamação no hospedeiro é persistente por mais de 100 dias (Wu et al., 2021). Destaques recentes esclarecedores demonstram que antígenos larvais podem permanecer no tecido e impulsionar resposta inflamatória no hospedeiro (Oliveira et al., 2024). Compreender melhor os aspectos da inflamação crônica resultante da infecção por *A. suum* é crucial devido às evidências apontarem para o grande impacto resultante a longo prazo. Além disso, apesar dos inúmeros trabalhos relatarem consequências aos pulmões, vale a pena lembrar que a migração das larvas afeta outros órgãos vitais como coração e pâncreas, os quais também são acometidos por DCNTs.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar da elevada prevalência da ascaridose no mundo, diversos aspectos imunológicos e fisiopatológicos permanecem não compreendidos. A persistência de danos e um processo inflamatório crônico nos tecidos após a migração das larvas de *Ascaris* spp. representa um importante aspecto a ser compreendido nesta parasitose não tão explorado. Dessa forma, ainda existem lacunas significativas no entendimento da fisiopatologia dessa infecção e das implicações clínicas associadas. Além disso, muitos estudos têm como foco o pulmão, enquanto os estudos relacionados ao fígado são escassos, o que limita ainda mais a compreensão dos efeitos dessa parasitose para o hospedeiro.

Paralelamente a isso, o câncer de mama é outro problema de saúde pública com elevados índices de prevalência. A relação entre inflamação crônica e câncer é uma área de interesse crescente na pesquisa biomédica. Embora seja reconhecido que agentes infecciosos, incluindo helmintos, possam influenciar, tanto no risco de surgimento de câncer, quanto na progressão, caso o câncer surja por outros fatores ao longo da vida, pouco se sabe sobre o papel da infecção por *Ascaris* spp. nesse contexto e o entendimento do cenário imunológico após a migração da larva nos tecidos. Dado que a ação do parasito ocorre em órgãos-alvo como o fígado e pulmão, desencadeando uma resposta inflamatória local e sistêmica, é plausível que o cenário imunológico resultante possa contribuir com o desenvolvimento de metástases do câncer de mama. No entanto, essa interação ainda não foi avaliada, destacando a necessidade de investigações adicionais para entender melhor o papel da resposta imunológica prolongada na ascaridose e o impacto na oncogênese e no prognóstico da doença.

Levando em consideração que aproximadamente um quinto da população mundial está infectada por *Ascaris* spp. e mais da metade está sob risco de infecção (WHO, 2013; Else et al., 2020) e que *Ascaris* spp. é um dos helmintos mais presentes em pacientes com câncer (Gabe et al., 2009; Silva et al., 2011), compreender melhor os mecanismos fisiológicos e imunológicos envolvidos na resposta em um hospedeiro após exposição ao parasito e com câncer é essencial para o esclarecimento do papel da resposta imune na evolução do câncer do hospedeiro. Além disso, uma vez que o câncer de mama é o câncer mais diagnosticado no mundo, incluindo o Brasil, muitos desses pacientes convivem em condições precárias de higiene e saúde.

Nesse contexto, para este trabalho, buscamos preencher algumas lacunas ainda existentes na literatura científica a respeito dos estudos da infecção experimental por *A. suum*. Dessa forma, antes de entender o papel da infecção por *A. suum* na progressão do carcinoma de

mama murino 4T1, propomos elucidar aspectos relacionados à persistência dos danos causados pela infecção nos tecidos acometidos pela migração do parasito (fígado e pulmão), com foco nos efeitos a longo prazo após a passagem das larvas por esses órgãos. Além disso, buscamos avaliar em detalhe a extensão dos danos teciduais e a inflamação crônica persistente, contribuindo para uma compreensão mais ampla dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos por até 100 dias. Esses efeitos foram avaliados considerando diferentes doses de infecção: 2.500 ovos, correspondente à dose padrão utilizada em experimentos com *Ascaris*, e doses menores, que se assemelham mais ao cenário de infecção natural.

Após compreender esse cenário e identificar as limitações do modelo, avançamos para os estudos utilizando o modelo de carcinoma de mama murino 4T1. Nessa etapa, aplicamos o conhecimento adquirido com a hipótese de que a inflamação crônica induzida por *A. suum* possa influenciar, de alguma forma, a progressão do câncer. Essa abordagem visa explorar as interações entre a inflamação persistente e o prognóstico do hospedeiro com câncer, ampliando o entendimento sobre os impactos da interação parasito hospedeiro/sistema imune e na evolução tumoral em contextos clínicos.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar os mecanismos fisiopatológicos e imunológicos subjacentes à ascaridose larval e seu impacto na evolução do carcinoma de mama murino 4T1.

4.2 Específicos

Capítulo I:

- Selecionar e validar diferentes genes referência para ensaios de PCR em tempo real nos modelos murinos de infecção por *A. suum* e no de carcinoma de mama 4T1;
- Padronizar o modelo de carcinoma de mama murino 4T1 para investigação do papel da inflamação crônica produzida por *A. suum*;
- Aplicar métodos de avaliação clínica em camundongos nos modelos de inflamação crônica por *A. suum* e na progressão do carcinoma de mama murino 4T1.

Capítulo II:

- Caracterizar os mecanismos imunológicos e fisiopatológicos da dose de infecção e da frequência de exposição ao *A. suum* na inflamação crônica causada pelo parasito em diferentes órgãos;
- Determinar o padrão de resposta imune celular na inflamação crônica, incluindo a ativação celular e o perfil de citocinas teciduais e sistêmicas de camundongos infectados por *A. suum* com diferentes doses de infecção e quantidade de exposições.

Capítulo III e IV:

- Avaliar o impacto da exposição prévia ao *A. suum* em diferentes doses de infecção e frequência de exposições na progressão do carcinoma de mama murino 4T1;
- Descrever mecanismos imunológicos e fisiopatológicos resultantes da exposição prévia ao *A. suum* na dinâmica de evolução do carcinoma de mama murino 4T1 em diferentes doses de infecção e frequência de exposição ao parasito.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Todas as atividades de pesquisa, incluindo a manutenção e utilização de modelos animais neste trabalho, foram conduzidas em conformidade com os princípios éticos de boas práticas na experimentação animal. Este estudo foi previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), conforme atestado pelo Protocolo nº. 178/2021 (Anexo I). As atividades desenvolvidas no primeiro tópico do capítulo I foram aprovadas pelo protocolo nº 126/2019 (Anexo II).

5.2 Animais experimentais

Para execução deste trabalho todos os animais foram provenientes do Biotério Central da UFMG e mantidos no biotério do Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos (LICP) do Departamento de Parasitologia em gaiolas ventiladas até o dia da eutanásia, em local com boas condições de higiene, água filtrada e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente e iluminação controlada com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (controlado por um temporizador digital) seguindo a preconização da CEUA. Camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem BALB/c entre seis e oito semanas de idade foram os principais utilizados no início dos protocolos experimentais deste trabalho. Camundongos da linhagem C57BL/6j, machos, com oito semanas de idade foram usados apenas para a padronização inicial detalhada no primeiro tópico do Capítulo I.

5.3 Obtenção de parasitos adultos e ovos de *Ascaris suum*

Os parasitos adultos de *A. suum* foram recuperados de carcaças intestinais encaminhadas para descarte de um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os parasitos foram coletados, acondicionados em tampão fosfato-salino (PBS) (0,4M NaCl e 10mM NaPO₄, pH 7,2), doados e levados para o LICP, localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG para serem processados para coleta de ovos.

Para o devido processamento e obtenção dos ovos, com a finalidade de utilização para os protocolos de infecção, as fêmeas foram separadas dos machos e dissecadas para coleta do útero. Esse material foi então processado de acordo com Nogueira et al., (2016), basicamente, os úteros foram colocados em um cadinho de porcelana e macerados mecanicamente com auxílio de um pistilo para liberação dos ovos e, a este conteúdo, foi adicionado PBS para homogeneização e, em seguida, o material foi purificado por filtração em tamis com telas de nylon (Tyler 100, 0,15mm). O conteúdo filtrado foi colocado em garrafas de cultura contendo 50 mL de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) a 0,2M na concentração de 25 ovos/ μ L.

5.4 Embrionamento dos ovos

O embrionamento dos ovos foi realizado de acordo com a metodologia padronizada por Boes et al., (1998) e modificada por Gazzinelli-Guimarães et al., (2013). Após a suspensão contendo os ovos ser adicionada nas garrafas de cultura conforme descrito anteriormente, estas foram incubadas a 26°C em estufa de demanda biológica de oxigênio (D.B.O) (SP 50 RDE 35 Super), onde foram submetidas a agitação manual para oxigenação três vezes por semana. Após atingirem o pico de infectividade com aproximadamente 100 dias, somente os ovos larvados foram contabilizados para realização das infecções dos camundongos conforme descrito com maiores detalhes no próximo item.

5.5 Infecção experimental por *Ascaris suum*

Para realização das infecções, as culturas foram mantidas por 100 para atingir o pico de infectividade adquirido ao longo do embrionamento (item 4.4), os ovos foram submetidos a metodologia de preparo previamente padronizada por Gazzinelli-Guimarães et al., (2013). Resumidamente, uma alíquota de cultura de ovos em H_2SO_4 a 0,2 M foi submetida a centrifugação por 800 g por 10 minutos à temperatura ambiente (T.A.) em tubos cônicos de 50 mL para remoção do ácido. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi suspenso em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 5% e incubado por 120 minutos a 37°C e 5% CO_2 em atmosfera umidificada (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA).

Após a etapa de incubação, a amostra foi centrifugada a 800g por 10 minutos T.A. e em seguida o sobrenadante foi removido. Posteriormente, foi adicionado água filtrada ao sedimento

de ovos e uma nova etapa de centrifugação por 10 minutos, a 800g T.A. foi realizada. Esse processo de lavagem foi repetido três vezes e após a última centrifugação, o sedimento foi suspenso em água filtrada, homogeneizado e três alíquotas de 10 µL foram removidas da suspensão para serem contabilizados os ovos larvados. O resultado obtido foi usado para calcular o número médio de ovos totalmente larvados por µL e para determinar a diluição necessária para obtenção da suspensão contendo a quantidade de ovos de interesse (250, 1.250 ou 2.500) em 200µL (conforme ilustrado nos capítulos I, II, III e IV).

Após o preparo dos ovos, a infecção foi então realizada via intragástrica com auxílio de uma agulha de gavagem de acordo com o protocolo descrito por Lewis et al., (2006). Foram administrados aproximadamente 200µL de suspensão contendo carga de interesse para cada grupo, seguidos da administração de 100µL de água filtrada para remover os ovos restantes na seringa e agulha.

5.6 Manutenção da linhagem 4T1 e indução de câncer

Para a indução de câncer foram utilizadas alíquotas previamente criopreservadas de células da linhagem 4T1 de carcinoma de mama murino provenientes da passagem 14 (P14). As alíquotas foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera umidificada (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA). Para a indução do câncer, foram realizados três repiques celulares após o descongelamento para garantia da malignidade da linhagem e em seguida as células foram submetidas a 2 etapas de lavagem com PBS para retirada total de soro fetal bovino e em seguida ressuspendidas em RPMI para posterior inoculação. Foram inoculados $1,0 \times 10^6$ células subcutaneamente no flanco esquerdo conforme Gao et al., (2011). Em seguida, procedemos com o delineamento experimental estabelecido no capítulo I e descrito em cada capítulo.

5.7 Avaliação da função pulmonar por espirometria

A função pulmonar dos animais foi avaliada por espirometria no laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, situado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG. Para isso, os camundongos foram anestesiados via subcutânea com cetamina (130 mg/kg) e xilazina (8,5 mg/kg) para garantir a manutenção da respiração espontânea. Após a

anestesia, os animais foram traqueostomizados, procedimento que envolveu a remoção da glândula submaxilar e da camada muscular que envolve a traqueia. Em seguida uma pequena incisão foi realizada para introdução de um cateter de teflon (1,7 mm de diâmetro e 0,8 mL de espaço morto) e posteriormente os animais foram acomodados em um pletismógrafo e o cateter introduzido foi conectado a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, North Carolina USA).

O aparelho em questão é especificamente projetado para o uso em camundongos e fornece semi-automaticamente três diferentes manobras: manobra de pressão, volume quasi-estático e fluxo rápido. Após a acomodação, os animais foram submetidos a frequência respiratória média de 160 incursões respiratórias por minuto (irpm) até alcançarem um padrão regular de inspiração e expiração (Vanoirbeek et al., 2010). Durante a respiração mecânica a complacência dinâmica (C_{dyn}), a resistência pulmonar (R_I) e volume corrente (TV) foram determinadas usando um teste de resistência e complacência (RC) da Buxco Forced-Maneuvers, que se baseia na parada da ventilação ao final da expiração com fechamento imediato da válvula do tubo endotraqueal. A respiração espontânea contra a válvula fechada e a consequente variação da pressão na caixa torácica foram utilizadas para calcular o FRC pela lei de Boyle. A manobra quasi-estática de Pressão-Volume foi realizada para medir a curva Pressão-Volume, pico de complacência (CPK) e a capacidade inspiratória (IC), que infla os pulmões a uma pressão padrão de +30 cm H₂O e depois expira lentamente até uma pressão negativa de -30 cm H₂O, medindo assim o volume em cada ponto de aplicação de pressão nos pulmões. Foi realizada uma manobra de volume de fluxo rápido, que insufla os pulmões até +30 cm H₂O, seguida de expiração forçada com pressão altamente negativa até -30 cm H₂O. A capacidade vital forçada (FVC) e a curva Fluxo-Volume foram registradas durante esta manobra. As manobras abaixo do ideal foram rejeitadas e, para cada teste em cada camundongo, foram realizadas pelo menos três manobras aceitáveis para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos. Para determinação do padrão de doença pulmonar observada (obstrutiva ou restritiva) foi realizado o índice de Tiffeneau, que se baseia na razão entre os valores obtidos de FEV₅₀ e FVC.

5.8 Análises hematológicas

5.8.1 Coleta e processamento do sangue

Em todos os pontos de eutanásia, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (09 mg/kg). A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca e cerca de 600 µL de sangue foi coletado e, em seguida transferidos, cuidadosamente, a fim de evitar hemólise, para microtubos de coleta (Vacuplast®) contendo anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-acético dipotássico (EDTA K2). Os tubos foram devidamente homogeneizados por inversão de oito a dez vezes e posteriormente uma parte do sangue foi utilizada para realização das metodologias descritas no próximo tópico (4.9.2) e o restante foi submetido a centrifugação a 5000 g por 10 minutos para coleta do plasma e posteriormente armazenado em -80°C até a realização das dosagens bioquímicas e de citocinas séricas.

5.8.2 Contagem e avaliação de células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico

A contagem e avaliação de células sanguíneas foi realizada por meio da contagem total de eritrócitos, avaliação dos parâmetros eritrocitários (hematócrito e hemoglobina) e avaliação dos respectivos índices hematimétricos (volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média), contagem global de leucócitos e plaquetas. Para isso, foi realizada metodologia automatizada em contador hematológico modelo Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA).

Também foi realizada a contagem diferencial de leucócitos para determinar o número relativo (%) por animal em microscopia óptica na objetiva de 100x com imersão em óleo por meio da contagem 100 leucócitos em lâmina de distensão sanguínea, obtida a partir de 5 µL de sangue e, posteriormente, corada com Giemsa. Para determinação do número absoluto (total/mm³) das populações de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos foi calculado a partir da fórmula: leucócitos totais x número relativo/100.

5.9 Procedimentos com lavado broncoalveolar (BAL)

5.9.1 Coleta e processamento

Após a eutanásia, em cada animal foi realizada dissecação traquel seguida de uma pequena incisão na parte superior da traqueia para introdução de um cateter (Safety Catheter 18 G x 1 $\frac{3}{4}$ ", Termo Medical Corp.) acoplado a uma seringa de 1 mL. Para obtenção do BAL foram realizadas duas lavagens intratraqueais com duas alíquotas de 1mL de PBS filtrado a 4°C. O líquido recuperado em volume final de 2 mL, foi mantido a 4°C até o momento do processamento. Após a coleta, o material foi submetido a centrifugação por 300g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado em alíquotas e congelado a -80°C para ser usado para dosagem de proteínas totais, hemoglobina, Lactato Desidrogenase (LDH) e SIgA. Em seguida, ao sedimento resultante da centrifugação, foi adicionado 100 μ L de PBS, homogeneizado e o volume aferido. Uma alíquota foi então removida para contagem total de células em câmara de Neubauer e em seguida o volume foi ajustado para 200 μ L e submetido ao processamento detalhado no próximo tópico.

5.9.2 Contagem diferencial de células no BAL

O *pellet* ressuspendido no item anterior foi submetido a centrifugação por cinco minutos, a 135g e 4°C em citocentrífuga (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge). Posteriormente, as lâminas obtidas após citocentrifugação foram secadas em TA por 24 horas e posteriormente coradas por Panótico Rápido (Laborclin, BRASIL) e usadas para a contagem diferencial dos leucócitos em microscopia óptica. Em cada lâmina foram contadas 400 células e o número relativo de cada subtipo celular (linfócitos, monocitos/macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) foi determinado utilizando a fórmula: leucócitos totais x número relativo/400.

5.9.3 Dosagens de proteínas totais, hemoglobina e LDH no BAL

Para avaliar a presença de hemorragia nas vias aéreas, foram realizadas dosagens de proteínas totais e hemoglobina no BAL. Para dosagem de proteínas totais, foi realizado o método do ácido bicíntrico utilizando kit comercial (Pierce, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Uma curva padrão foi realizada usando BSA e os valores de densidade óptica (D.O.) das amostras foram medidos em comprimento de onda de 562 nm e interpolados para determinar a concentração de proteínas. Os resultados foram expressos em μ g por mL de BAL.

Para dosagem de hemoglobina foi realizado ensaio colorimétrico usando método da cianometahemoglobina utilizando kit comercial (Bioclin Quibasa, Brasil). O padrão de hemoglobina (Bioclin Quibasa®, Brasil) foi usado para preparação de uma curva padrão na qual foram interpolados os valores de D.O. medidos em comprimento de onda de 540 nm para determinar a concentração. Os valores de hemoglobina no BAL foram expressos em g de hemoglobina por dL de BAL. A dosagem de LDH foi utilizada para correlacionar com a celularidade encontrada no BAL. As dosagens foram realizadas por meio da adaptação do kit comercial Desidrogenase Láctica LDH UV K014 (Bioclin Quibasa, Brasil). Para o ensaio foi empregado um volume específico de BAL de 5 µL. As quantidades de reagente utilizadas foram ajustadas proporcionalmente a adaptação do volume da amostra e o ensaio foi conduzido conforme orientação do fabricante. Os resultados das concentrações foram expressos em U/L e a absorbância foi medida utilizando leitor de microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA).

5.10 Análises histopatológicas

5.10.1 Coleta e processamento de órgãos

Nos respectivos pontos de coleta, mencionados anteriormente, os camundongos foram eutanasiados e os lóbulos esquerdos dos pulmões e do fígado foram coletados e, em seguida, fixados em solução tamponada de formol 10% (Synth, Brasil) por 48 horas e, logo após, trocados para etanol 70% e mantidos até o momento do processamento. Para o processamento, os tecidos foram então gradualmente desidratados em etanol (80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e, após, incluídos em blocos de parafina.

Após a inclusão nos blocos de parafina, estes foram então desbastados e cortados com 4 µm de espessura e em seguida corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para avaliação das alterações histopatológicas decorrentes das alterações da inflamação provocada pela migração das larvas do parasito e/ou do câncer e também para avaliação dos focos metastáticos. Além do H&E, no pulmão e no fígado, foi realizada a coloração por Tricrômico de Masson com o objetivo de avaliar a deposição de fibras de colágeno para análise da formação de áreas de fibrose.

5.10.2 Análises semi-quantitativas e morfométricas

As lesões presentes no parênquima pulmonar e hepático foram descritas de acordo com a intensidade das lesões, necrose, inflamação, fenômenos vasculares (angiogênese, hemorragia e edema) e exsudativos. Além disso, para avaliação de metástases, foram considerados nódulos, agregados de células neoplásicas distribuídos ao longo do parênquima pulmonar, espaços alveolares e bronquíolos. Para as análises semi-quantitativas, as lâminas foram avaliadas por dois patologistas do Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do departamento de patologia da UFMG sem o conhecimento prévio dos animais componentes dos grupos experimentais. Para isto, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de imagem (SPOT 3.4.5 Basic®) acoplado a um microscópio (Olympus Bx-40). Para o estudo das lesões pulmonares, foi utilizado o *score* utilizado por Gazzinelli-Guimarães et al., (2018) classificando o padrão de inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular, inflamação do parênquima, e presença de hemorragia (**Tabela 5**). Para a avaliação das lesões hepáticas, foi utilizado *score* das lesões hepáticas e foi baseado em 4 graus para lesão do parênquima hepático (**Tabela 6**).

Tabela 5: Graus de *score* utilizados para a análise histológica semiquantitativa de lesão pulmonar das amostras de pulmão de camundongos BALB/c.

Análise semiquantitativa do pulmão	
Score	Inflamação das vias aéreas
Grau 0	Ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas (ausente)
Grau 1	Pequeno número de células inflamatórias em torno de algumas vias aéreas (discreta)
Grau 2	Algumas vias aéreas apresentam inflamação significativa (moderada)
Grau 3	Maioria das vias aéreas apresentam alguma inflamação (acentuada)
Grau 4	Maioria das vias aéreas estão significativamente inflamadas (intensa)
Grau 5	Todas as vias aéreas estão completamente inflamadas (grave)
Score	Inflamação perivascular
Grau 0	Ausência de células inflamatórias em torno dos vasos (ausente)
Grau 1	Alguns vasos possuem um pequeno número de células inflamatórias (discreta)
Grau 2	Alguns vasos possuem inflamação significativa (moderada)
Grau 3	A maioria dos vasos possuem alguma inflamação (acentuada)
Grau 4	A maioria dos vasos estão significativamente inflamados (intenso)
Grau 5	Todos os vasos estão completamente inflamados (grave)
Score	Inflamação do parênquima
Grau 0	≤ 1% do parênquima afetado
Grau 1	1-9% do parênquima afetado
Grau 2	10-29% do parênquima afetado
Grau 3	30-49% do parênquima afetado
Grau 4	50-69% do parênquima afetado
Grau 5	>70% do parênquima afetado
Score	Área hemorrágica
Grau 0	Ausência de hemorragia (ausente)
Grau 1	Presença de pequenas zonas hemorrágicas (discreta)
Grau 2	Presença de áreas hemorrágicas significativas (moderada)
Grau 3	Presença de áreas hemorrágicas exuberantes (intensa)

Fonte: Adaptado de Gazzinelli-Guimarães et al., 2018.

Tabela 6: Graus de *score* utilizados para a análise histológica semiquantitativa de lesão hepática das amostras de fígado de camundongos BALB/c.

Análise semiquantitativa do fígado	
Score	Lesão hepática
Grau 0	Ausência de células inflamatórias em torno dos hepatócitos, vasos sanguíneos, ductos biliares e capilares, ausência de zonas de necrose (ausente)
Grau 1	Algumas regiões do parênquima hepático contêm pequenos focos inflamatórios com reduzido número de células inflamatórias, pequenas zonas de necrose (discreto)
Grau 2	Parênquima hepático possui focos inflamatórios com número moderado de células, infiltrado inflamatório perivascular, bem como em torno dos ductos e pequenas zonas de necrose dispersas pelo parênquima (moderada)
Grau 3	Parênquima hepático apresenta focos inflamatórios maiores com frequência, infiltrado inflamatório difuso, inflamação perivascular exuberante e em torno dos ductos, zonas de necrose dispersas pelo parênquima (intenso)

Fonte: Adaptado de Leal-Silva et al., 2021

Para as análises morfométricas, foram capturadas 20 imagens de campos randomicamente selecionados dos cortes histológicos corados por H&E por animal no aumento de 20x. A morfometria da neoformação de fibras de colágeno foi realizada no fígado e no pulmão por meio da captura de 10 imagens de campos randomicamente selecionados dos cortes histológicos corados com tricrômico de Masson por animal no aumento de 20x conforme descrito previamente (Russo et al., 2009; 2011). As áreas de infiltrado inflamatório, áreas edemaciadas, áreas de necrose, focos metastáticos e áreas coradas pelo tricrômico de Masson, foram mensuradas manualmente com software digital ImageProPlus (Versão IPWIN 4.5.0.29). Para avaliação de metástases, nódulos ou agregados de células neoplásicas dispersos pelo parênquima pulmonar, espaços alveolares e bronquíolos foram considerados, conforme descrito previamente (Reis et al., 2019).

5.11 Coleta e processamento de tecidos para dosagem de citocinas e avaliação da atividade celular de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos

Após a eutanásia, o pulmão esquerdo, o lobulo esquerdo do fígado e tumor foram coletados e armazenados a -80°C até o momento do processamento. Para o processamento, os tecidos foram homogeneizados (Power Gen 125; Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) na

proporção de 100 mg para 1 mL de solução de PBS suplementado com inibidores de proteases (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina), 0,05% de Tween 20 e 0,5% BSA. Os homogenatos resultantes foram submetidos a centrifugação a 10.000 g, por 10 minutos, 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado para dosagem de citocinas teciduais conforme descrito no item a seguir, e o sedimento resultante foi utilizado para quantificação da atividade de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos nos respectivos tecidos conforme descrito no item 5.13.

5.12 Dosagem de citocinas séricas e teciduais

Para dosagem de citocinas séricas foi utilizado plasma obtido de acordo com o item 4.8.1 e as citocinas teciduais foram dosadas no sobrenadante obtido do processamento no item anterior (5.11). Para determinar a produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF- α presentes no soro e tecidos foi realizada utilizando o kit de CBA Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array (BD Biosciences, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A coleta de dados foi realizada utilizando citômetro LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA) e os resultados foram analisados no Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). As citocinas IL-5, IL-13 e TGF- β foram dosadas utilizando kit de ELISA sanduíche (R&D Systems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 492 nm. Densidades ópticas (DO) foram obtidas e a concentração de citocinas no plasma (pg/mL) ou no sobrenadante de tecido (pg/mg) de cada amostra foi calculada a partir da interpolação dos valores de DO em uma curva padrão ajustada por uma equação de cinco parâmetros logísticos (5-PL).

5.13 Avaliação da atividade celular de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos nos tecidos

A avaliação da atividade de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos nos tecidos foi realizada por meio da mensuração dos níveis de N-acetilglicosaminidase (NAG), mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) no sedimento resultante dos homogenatos de fígado, pulmão e tumor de acordo com metodologia descrita por Strath, Warren e Sanderson (1985) e modificado por Silveira et al., (2002). Basicamente, os tecidos foram submetidos a homogeneização (Power Gen 125; Fisher Scientific Pennsylvania, EUA)

com solução a 0,2% de NaCl seguido da adição de solução de solução a 1,6% de NaCl e 5% glicose. O homogenato resultante foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos, 4°C e o sedimento resultante foi utilizado para processamento e respectivas determinações das atividades de NAG, EPO e MPO.

5.13.1 Determinação dos níveis de NAG

Para o ensaio de atividade da NAG, o sedimento resultante descrito no item anterior foi homogeneizado em 800 µL de solução de NaCl 0,9% contendo 0,1% Triton 100 conforme Barcelos et al., (2005). As amostras foram então homogeneizadas em vórtex e, em seguida, centrifugadas a 3000 g, 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Dessa forma, 100 µl de sobrenadante foi distribuído em microplaca de 96 poços seguido da adição de 100 µl do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (Sigma Chemical Co®, EUA) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5). As amostras foram incubadas a 37 °C por 10 minutos, e após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de tampão glicina 0,8 M (glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M, pH 10,6) e a absorbância foi determinada a 405nm por um leitor de microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA).

5.13.2 Determinação dos níveis de MPO

Para o ensaio de atividade da MPO, o sedimento resultante descrito no item 4.15 foi homogeneizado em 200 µL de solução tampão 1 (NaCl 0,1M, Na₂HPO₄ 0,02M, Na₂EDTA 0,015M, pH 4,7) seguido de centrifugação a 10000 g, 10 minutos a 4°C conforme descrito por Barcelos et al., (2005). O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foi adicionado ao sedimento 800 µL de solução tampão 2 (Na₂HPO₄ 0,05 M, brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5%, pH 5,4). As amostras foram homogeneizadas e, em seguida, submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado novamente a 10000 g, 10 minutos a 4°C e o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio por método colorimétrico. Para a realização do ensaio, 25 µL das amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e seguidos da adição de 25 µL de substrato TMB 1,6mM (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente as amostras foram incubadas por cinco minutos à 37°C. Após esse período foi adicionado 100 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,002% diluído no tampão Na₃PO₄ HTAB seguido da incubação por 5 minutos à 37°C. Logo

após, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2M. A absorbância das amostras foi determinada conforme descrito no item 4.13.1 em um comprimento de onda de 450 nm.

5.13.3 Determinação dos níveis de EPO

Para o ensaio de EPO, o sedimento resultante descrito no item 4.11 foi homogeneizado em 950 µL de PBS e 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co®, EUA), em seguida as amostras foram homogeneizadas e foram realizados três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para a lise de vesículas conforme descrito por Silveira et al., (2002). O lisado foi então centrifugado a 10000 g, 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi distribuído em microplaca de 96 poços, sendo 75µL de sobrenadante, seguida da adição de 75 µL de substrato (1,5 mM OPD e 6,6 mM de H₂O₂ em 0,075 M em tampão Tris-HCl, pH 8,0). As amostras foram incubadas por 30 minutos T.A. e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 2M e a absorbância foi determinada conforme o item 4.13.1 a 492 nm.

5.14 Preparo de antígeno larval

Para dosagem de anticorpos específicos de *A. suum*, foi necessário a extração de antígenos brutos do parasito. Para isso, uma alíquota de ovos provenientes da cultura com mais de 100 dias de embrionamento foi submetida à eclosão das larvas conforme previamente descrito por Teixeira-Carvalho et al., (1998). Basicamente, uma alíquota de ovos foi centrifugada a 3.000 g, 10 minutos T. A. O sedimento foi suspenso em solução de hipoclorito de sódio 5% e submetido à incubação por 1 hora e 45 minutos à 37°C em atmosfera de 5% CO₂ (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA). Posteriormente a suspensão foi submetida ao processo de lavagem com a adição de PBS e centrifugação de 4.000g por 5 minutos T. A. O sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta sorológica e esse processo de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Após a última lavagem, foi adicionado solução salina Hanks (pH 2,0) ao sedimento e a suspensão foi incubada por 30 minutos a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Outra etapa de lavagem foi realizada e ao sedimento foi adicionado meio de cultura não suplementado Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma). A suspensão foi incubada à T.A. ao abrigo de luz durante 72 horas. Após esse período, o sedimento contendo as larvas foi coletado e sonicado a 60 Watts em 10 ciclos, durante 1 minuto

com intervalo de 30 segundos entre cada ciclo. Após a sonicação, o conteúdo foi centrifugado a 800g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas totais utilizando o Kit comercial BCA (Pierce, EUA), conforme instruções do fabricante. Após a dosagem, os antígenos foram aliquotados e congelados a -80°C para serem usados nos experimentos de quantificação de SIgA no BAL e IgG total sistêmico.

5.15 Dosagem de anticorpos IgG sérico total e SIgA no BAL

Após a produção de antígeno bruto larval (item 4.14) os anticorpos IgG total foram medidos no plasma e SIgA no BAL de animais infectados e não infectados por *A. suum*. Para medir os anticorpos, ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto foram realizados em duplicata, conforme descrito anteriormente por Gazzinelli-Guimarães et al. (2018). Resumidamente, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning-Costar, EUA) foram sensibilizadas com 100µL/poço do antígeno bruto larval diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) na concentração de 1µg por poço e foram incubadas *overnight* a 4°C. No segundo dia, as placas foram lavadas oito vezes com solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20) e foram adicionados 200µL da solução bloqueadora (PBS + 3% BSA), sendo incubadas por 1 hora a 37°C. Após o bloqueio, toda solução dos poços foi removida e 100µL de plasma diluído 1:1000 em PBS acrescido de 3% de BSA ou 100µL BAL diluído 1:20 em PBS com 3% de BSA seguidos da incubação *overnight* 4°C. No terceiro dia, as placas foram lavadas com a solução de lavagem e foram adicionados 100 µL de anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:2000 em PBS-3% BSA e SIgA diluído 1:10000. Após incubação a 37°C por 1 hora, as placas foram lavadas novamente e foram adicionados 100µL da solução reveladora contendo o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co., USA) acrescida de 10 µl de peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Alemanha), diluídos em 25 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5. As placas foram incubadas à T.A. no escuro por 20 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 0,2 M. A absorbância foi medida num leitor de microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) a uma absorbância de 492 nm.

5.16 Dosagens bioquímicas em amostras de plasma

5.16.1 Avaliação de danos hepáticos

Realizamos dosagens séricas de enzimas que indicam lesões nos hepatócitos ou obstrução extrahepática. Para isso, Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e Gama-Glutamil transpeptidase (GGT) foram dosadas em amostras de plasma por meio da adaptação dos kits comerciais ALT/TGP K034 (Bioclin Quibasa, Brasil), AST/TGO K034 (Bioclin Quibasa, Brasil) e GGT cinético K080 (Bioclin Quibasa, Brasil). Para cada ensaio foi empregado um volume específico de plasma: 10 µL para ALT, 20 µL para AST e 10 µL para GGT. As quantidades de reagente utilizadas foram ajustadas proporcionalmente a adaptação do volume por amostra e o ensaio foi conduzido conforme orientação do fabricante. Os resultados das concentrações enzimáticas foram expressos em U/mL para ALT e AST e em U/L para GGT e as absorbâncias foram medidas utilizando leitor de microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA).

5.17 Avaliação da função hepática

A função hepática foi avaliada por meio das dosagens de bilirrubina total (BT) e frações direta (BD) e indireta (BI), albumina e fosfatase alcalina (FAL) em plasma por meio da adaptação dos kits comerciais Bilirrubina K005 (Bioclin Quibasa, Brasil), Albumina monoreagente K040 (Bioclin Quibasa, Brasil) e Fosfatase Alcalina IFCC Cinético K224 (Bioclin Quibasa, Brasil). Para cada ensaio foi empregado um volume específico de plasma: 15 µL para BT, 15 µL para BD, 5 µL para albumina e 5 µL para FAL. Para determinação da concentração de BI, foi realizada pela fórmula: $BI = BT - BD$. As quantidades de reagente utilizadas foram ajustadas proporcionalmente a adaptação do volume por amostra e o ensaio foi conduzido conforme orientação do fabricante. Os resultados das concentrações foram expressos em mg/dL para BT e frações, g/dL para albumina e em U/L para FAL e as absorbâncias foram medidas utilizando leitor de microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA).

5.17.1 Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH)

Para fornecer maiores dados sobre a atividade de leucócitos, foi realizada a dosagem de LDH em amostras de plasma por meio da adaptação do kit comercial Desidrogenase Láctica

LDH UV K014 (Bioclin Quibasa, Brasil). Para o ensaio foi empregado um volume específico de plasma de 5 μ L. As quantidades de reagente utilizadas foram ajustadas proporcionalmente a adaptação do volume da amostra e o ensaio foi conduzido conforme orientação do fabricante. Os resultados das concentrações foram expressos em U/L e a absorbância foi medida utilizando leitor de microplacas VersaMax[®] ELISA (Molecular Devices, EUA).

5.18 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Inc., EUA). Inicialmente todas as amostras foram submetidas ao teste de Grubb para detectar possíveis *outliers* e, assim, excluídos. Em seguida, o teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliação da normalidade dos dados. Para análises entre médias de dois grupos foram utilizados os testes T (dados paramétricos) ou Mann-Whitney (dados não-paramétricos). Para as análises entre três ou mais grupos, foram utilizados os testes *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (dados paramétricos) ou os testes de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn (dados não-paramétricos) de acordo com a distribuição de dados ou *Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de Dunn. Para verificar e quantificar a existência de relação entre variáveis foi aplicado o teste de correlação linear de Pearson (dados paramétricos), ou o teste de correlação de Spearman (dados não paramétricos). Para as análises de curva de sobrevivência, foi realizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox), seguido do cálculo da Hazard Ratio. Os dados em heatmap foram ajustados e analisados por meio do software ClustVis (Metsalu; Vilo, 2015). Todos os testes foram considerados significativos quando o valor de p foi igual ou inferior a 0,05.

6 RESULTADOS

Com o intuito de contribuir com estudos na área a auxiliar nos temas propostos neste trabalho, inicialmente foram conduzidos estudos importantes para validar ferramentas auxiliares essenciais que ainda não foram abordadas por outros trabalhos. Assim, caracterizamos a expressão de genes de referência em diferentes tecidos afetados por *A. suum*, fornecendo contribuições importantes para estudos de biologia molecular envolvendo a quantificação da expressão gênica, metodologia importante na área de imunologia. Essa abordagem visou validar o modelo, servindo como uma ferramenta inicial não apenas para este estudo, mas também para outros na área.

Além disso, aplicamos essa metodologia no modelo de indução do carcinoma de mama 4T1 e na avaliação da progressão de metástases. Adicionalmente, incorporamos técnicas de imagem radiográficas como ferramenta auxiliar para monitorar a progressão do modelo de câncer. Essas iniciativas visam preencher lacunas e fornecer *insights* importantes para a compreensão abrangente dos mecanismos envolvidos, uma vez que não há trabalhos disponíveis sobre esse tema. Portanto, antes da investigação da relação entre a inflamação e a progressão do câncer após exposição ao *A. suum*, a atenção dos dois primeiros capítulos será direcionada para estudos de padronização dos modelos e investigação das respostas fisiopatológicas, imunológicas e alterações genéticas em estágios posteriores à migração das larvas, particularmente nos pulmões e no fígado (órgãos frequentemente afetados pela metástase do câncer de mama e pela passagem das larvas de *A. suum*). Para facilitar a compreensão, os dados serão então apresentados em quatro capítulos distintos para permitir uma compreensão mais abrangente da dinâmica da resposta à infecção, considerando as diferentes variáveis analisadas neste trabalho.

CAPÍTULO I

Validação de genes referência no modelo de infecção por *Ascaris suum* e no modelo de carcinoma de mama murino 4t1 e aplicação de técnicas com radioisótopos para monitoramento da evolução do câncer de mama em camundongos

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Delineamento experimental

O primeiro capítulo deste trabalho foi dedicado à padronização fundamental para o desenvolvimento subsequente dos próximos capítulos. Neste, na primeira parte, o principal objetivo foi caracterizar a expressão de genes de referência em diferentes tecidos afetados pela migração do *A. suum*, visando sua utilização em estudos posteriores de biologia molecular. Para isso, 55 camundongos C57BL/6j com oito semanas de idade foram utilizados e divididos em dois grupos distintos: **NI**, composto por animais não infectados e que receberam apenas água filtrada, e o grupo infectado, constituído por animais que foram infectados com 2.500 ovos larvados de *A. suum*. Os animais infectados foram eutanasiados em diferentes momentos, coincidindo com o pico da migração larval nos órgãos específicos: aos 4 dias pós-infecção (**4 dpi**) para coleta do fígado, aos **8dpi** para coleta do pulmão, e aos **12dpi** para coleta dos intestinos delgado e grosso (**Figura 12**). Os pontos de coleta foram selecionados de acordo com o estabelecido por Gazzineli-Guimarães et al., (2013). Os tecidos foram coletados para confirmação da infecção pela recuperação de larvas (n=21, 7 por grupo em cada ponto de coleta) e a coleta de tecidos para PCR (n=24, 6 por grupo em cada ponto de coleta).

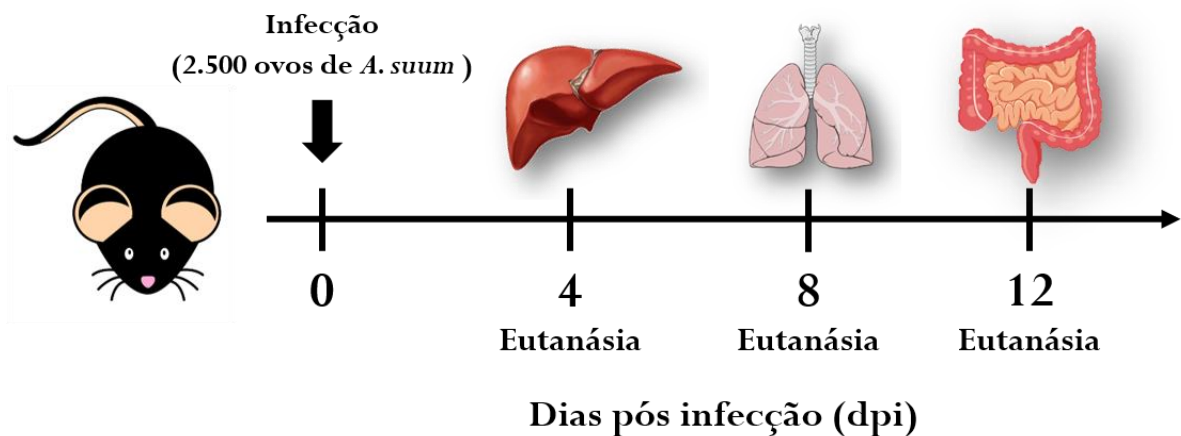


Figura 12: Primeira parte do delineamento experimental do capítulo I. Camundongos C57BL/6j foram divididos em dois grupos, sendo um não infectado (NI ou 0dpi) e outro que recebeu uma dose de 2.500 ovos larvados de *A. suum*. Os camundongos infectados foram eutanasiados no dia correspondente ao pico de migração larval, sendo uma parte dos animais destinado para recuperação de larvas (n=21, 7 por grupo) e outra para parte para coleta de tecidos para ensaios de PCR (n=24, 6 por grupo).

Fonte: Autoria própria.

Na segunda parte, visando os estudos focados no modelo experimental do carcinoma de mama murino 4T1, inicialmente, foi crucial avaliar o desenvolvimento do tumor e suas metástases para determinar os pontos exatos de coleta para o estudo com a infecção por *A. suum*. Para isso, camundongos BALB/c fêmeas com 10 semanas de idade foram divididos em dois grupos distintos: grupo **Controle (Ctl)**, composto por camundongos que receberam injeção de RPMI estéril, e o grupo **4T1**, composto por camundongos que receberam injeção de $1,0 \times 10^6$ células 4T1 no flanco esquerdo.

Selecionamos três diferentes pontos de coleta (14, 21 e 28 dias após a indução do câncer) para avaliar a evolução do câncer por histopatologia e para validar a aplicação de experimentos com radioisótopos no modelo. Para isso, utilizamos um total de 60 animais (n=24 para Ctl e n=36 para 4T1). Em cada ponto de coleta, foram eutanasiados 18 animais (n=6 para Ctl e n=6 para 4T1) destinados para os experimentos com radioisótopos, enquanto 6 animais do grupo 4T1 foram destinados a coleta de órgão para histopatologia e para PCR. 6 animais Ctl foram usados como controle para histopatologia e para análises de qPCR (**Figura 13**). Após as análises, somente os tecidos com confirmação de metástases em um único ponto de coleta foram selecionados para as análises de biologia molecular. As imagens cintilográficas foram realizadas utilizando os mesmos animais pertencentes ao grupo eutanasiado no 28º dia.

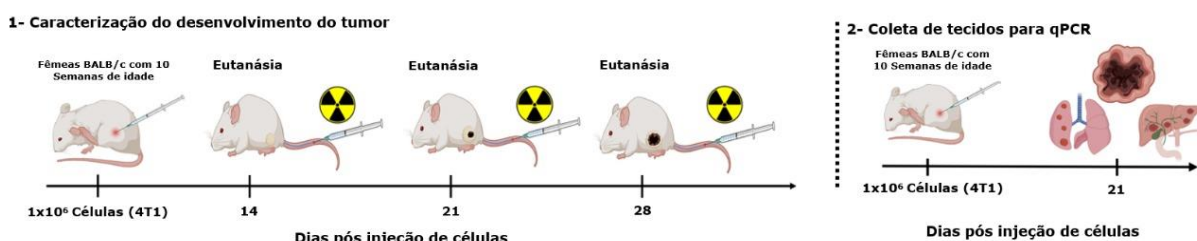


Figura 13: Segunda parte do delineamento experimental do capítulo I. Camundongos BALB/c fêmeas com 10 semanas de idade foram divididos em dois grupos, sendo controle (Ctl, n=24) e o que recebeu injeção de 1×10^6 células 4T1 no flanco esquerdo (4T1, n= 36).

Fonte: Autoria própria.

7.2 Avaliação da curva de sobrevivência e manifestações clínicas

Para avaliar os parâmetros clínicos resultantes da infecção e/ou da progressão do câncer, os camundongos foram acompanhados a cada dois dias, começando no dia da infecção até o dia 80 ou iniciando no dia da indução do câncer até o dia 40. Os animais foram pesados nos dias de observação e a progressão da doença foi avaliada por escores clínicos e ponderados, adaptados de Vandermosten et al. (2017). Neste estudo foram avaliados a piloereção (PE),

tremores (TR), respiração anormal (RA) e curvatura do tronco (CuT). Para cálculo do *score* de gravidade da doença foi atribuída uma pontuação de 0 (ausente) ou 1 (presente) para PE, TR, RA e CuT. O *score* clínico total foi calculado pela seguinte fórmula: (PE+TR+RA+CuT).

Além disso, desenvolvemos um *score* para avaliação das áreas ulceradas no tumor primário nos camundongos com câncer. Acreditamos que essa contribuição não se limita apenas a este estudo, mas também poderá beneficiar outros trabalhos que empregam o modelo *in vivo* 4T1. O *score* foi construído com base nas observações realizadas a cada dois dias nos animais durante o período do estudo. As informações para classificação do *score* estão disponíveis na **Tabela 7** e podem ser visualizadas para melhor percepção na **figura 14**.

Tabela 7: Graus de *score* de acordo com a evolução de áreas ulceradas no tumor primário de camundongos BALB/c com carcinoma de mama 4T1.

Score	Evolução de úlcera
Grau 0	Ausência de tumores ou de áreas ulceradas no tumor primário (ausente)
Grau 1	Presença de uma pequena área ulcerada ainda em fase inicial, ocupando 1/3 ou menos da circunferência do tumor (discreta)
Grau 2	Presença de uma área ulcerada ocupando mais de 1/3 da circunferência do tumor com coloração de vermelho escuro a preto (acentuada)
Grau 3	Presença de área ulcerada ocupando mais de 50% da circunferência do tumor primário e infiltrando para dentro (intensa)
Grau 4	Área ulcerada se aprofundando para o interior formando bordas no tumor ou com sinais de perda de tecido do membro inferior

Fonte: Autoria própria.

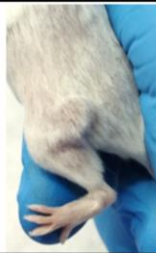
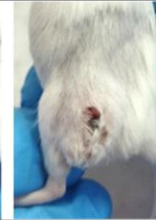
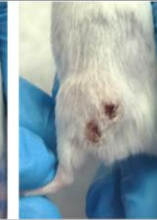
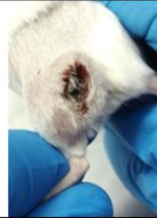
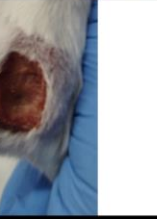
Score	Representação das áreas ulceradas					
0						
1						
2						
3						
4						

Figura 14: Imagens representativas do score de classificação da evolução de áreas ulceradas no tumor primário de camundongos BALB/c com carcinoma de mama 4T1.

Fonte: Autoria própria.

7.3 Recuperação de larvas de *A. suum* nos tecidos

Esta etapa foi realizada para confirmação da presença de larvas nos tecidos dos animais para os ensaios de PCR em tempo real. Para isso, os animais foram eutanasiados utilizando cetamina (225 mg/kg) e xilazina (27 mg/kg) via intraperitoneal nos dias correspondentes ao pico da migração de larvas (4, 8 e 12dpi), conforme descrito no item 6.1, para coleta do fígado, pulmão e intestinos. Após a eutanásia, os tecidos foram coletados, extensivamente picotados

com tesoura cirúrgica e colocados em aparato de Baermann-Moraes modificado com PBS e incubados por 4 horas a 37°C conforme descrito por Gazzinelli-Guimarães et al., 2013. Após a incubação, o sedimento foi coletado com pipeta Pasteur e transferidos para tubos cônicos de 15mL, os quais foram submetidos à centrifugação a 800 g, por 10 minutos a T.A. Os sobrenadantes foram reduzidos a aproximadamente 2mL e ressuspensos em 10mL de solução tamponada de formaldeído a 4% e armazenados para posterior contagem em microscopia de luz. Para a contagem, os tubos foram centrifugados a 800 g, por 10 minutos a T.A. e os sobrenadantes foram reduzidos para 2 mL e todo conteúdo foi utilizado para contagem total das larvas recuperadas.

7.4 Biologia molecular

7.4.1 Delineamento de iniciadores (*Primers*)

Para o delineamento dos iniciadores as sequências específicas de nucleotídeos de camundongos foram obtidas a partir das sequências disponíveis no NCBI. Em seguida, utilizamos a ferramenta on-line *Primer 3 Input* (Version 4.1.0) (<https://primer3.ut.ee/>) para projetar as sequências de iniciadores. Para o delineamento foram adotados os seguintes critérios: quantidade de nucleotídeos entre 18-22; quantidade de Guanina e Citosina entre 45-55%; temperatura de melting (T_m) entre 59-60°C e amplicon entre 90-150 ou 200 pb. Posteriormente, foram verificadas as possíveis formações de grampos por meio do servidor da web RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) e a averiguação da formação de dímeros a partir do software autodimer (National Institute of Standards and Technology, USA). Por fim, para verificar a especificidade, as sequências esperadas dos amplicons foram alinhadas com as depositadas em bancos de dados internacionais por meio do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). As sequências obtidas juntamente com todas as informações dos pares de iniciadores estão presentes na **Tabela 8**.

Tabela 8: Iniciadores, sequências e características do amplicon e número de acesso na base de dados dos iniciadores utilizados na PCR para avaliação da expressão gênica. pb – pares de bases.

GENE	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	TAMANHO DO AMPLICON (PB)	NCBI ACCESSION NUMBER
GAPDH	F: ACCCAGAAGACTGTGGATGG R: CACATTGGGGGTAGGAACAC	171 pb	NM_001289726.1
18S	F: GCCGTTCTTAGTTGGTGGAG R: AACGCCACTTGTCCTCTAA	129 bp	NR_003278.3
ACTB	F: TGTTACCAACTGGGACGACA R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	165 pb	NM_007393.5
B2M	F: TCTCACTGACCGGCTGTAT R: GTATGTTTCGGCTTCCCATTC	125pb	NM_009735.3
HPRT1	F: TTGGGCTTACCTCACTGCTT R: CTAATCACGACGCTGGGACT	125pb	NM_013556.2
GUSB	F: TCCAAGGGGTCAATAAGCAC R: GGGATAGTGGCTGGTACGAA	128 pb	NM_010368.2
PGK1	F: ATGGATGAGGTGGTGAAAGC R: CAGTGCTCACATGGCTGACT	118 pb	NM_008828.3
CCER2	F: GAATCTCACCCCGATGCTTA R: ACACAAAACCTGGCCAGAAC	115 pb	XM_036158858.1
SYMPK	F: AAGCCATCTACACCCCTGTG R: GCTCCTCCTTGCACTGTTTC	135 pb	NM_026605.3
ANKRD17	F: CCCTCACAAGACTCCAGCTC R: CGAAGGTAGCTGGACAGAGG	106 pb	XM_006535287.5
TNF- α	F:TATGGCTCAGGGTCCAACCTC R:CTCCCTTTGCAGAACTCAGG	174pb	NM_013693.3
VEGF	F: TGAATTTCTTGGCCACCTTC R: GCCCTGATCTTTCCATTTC	117pb	NM_001025250.3
CXCL9	F: TGAATTTCTTGGCCACCTTC R: GCCCTGATCTTTCCATTTC	103 pb	NM_008599.4

Fonte: Autoria própria.

7.4.2 Coleta de tecidos, extração de RNA total e síntese de cDNA

Os tecidos de interesse foram coletados e inseridos em solução de RNAlater, congelados e armazenados a -80°C até o momento da extração de RNA total. Para a extração de RNA total dos tecidos, as amostras foram processadas utilizando o Kit NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando 30 mg de tecido. O precipitado de RNA total foi eluído em 50 µL de água ultrapura livre de nucleases e, posteriormente, a concentração e pureza do RNA foram medidas usando o

Espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Amostras com uma relação de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm na faixa de 1.8-2.1 foram consideradas puras, livres de proteínas e etanol, indicando que eram adequadas para a subsequente síntese de cDNA, e a integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Schroeder et al., 2006) (**Figura 15**). Para síntese de cDNA foi utilizado 2µg de RNA total extraído de cada amostra de tecido utilizando Kit de Transcriptase Reversa cDNA (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

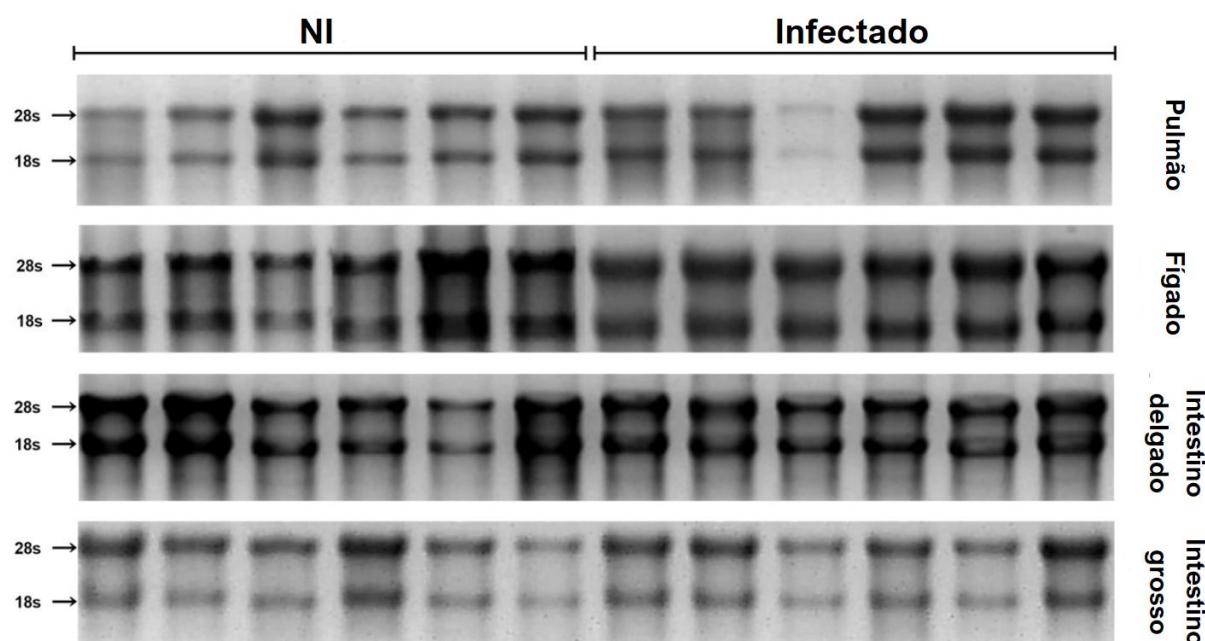


Figura 15: Integridade total do RNA das amostras extraídas em gel de agarose a 1%. A figura mostra as bandas estruturais do RNA ribossômico (28S e 18S). As primeiras seis amostras correspondem ao grupo NI, e as seis últimas representam os grupos infectados por *Ascaris*, com seus respectivos órgãos indicados na imagem. NI: não infectado.

7.4.3 Reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para as reações de qPCR foi utilizado o termociclador 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems™) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o kit PowerUP™ Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems™). Reações de volume de dez microlitros, contendo 5µL do kit, 2µL de cDNA (equivalente a 25 ng), 0,5µL de *primers forward* e *reverse* (10µM) e 2µL de água ultrapura livre de nucleases foram usadas para a reação. Duplicatas de cada amostra e uma reação sem molde (controle negativo ou branco) foram incluídas. A análise da curva de fusão foi realizada a partir de 70 °C a 95 °C a 0,1 °C/s para todos os genes estudados. A temperatura de Melting (T_m - do inglês *Temperature of melting*) foi definida como o pico da

curva e, se o ponto mais alto fosse um patamar, então o ponto médio foi identificado como Tm. Os valores do ciclo de limiar (Ct) foram determinados na mesma linha de limiar de fluorescência para todos os genes e os valores de Ct para cada amostra foram obtidos calculando a média aritmética das duplicatas. Após a determinação do melhor gene referência (ver item 6.4.5) para o respectivo tecido, foram feitos os cálculos de normalização entre os grupos para determinação do ΔCT de acordo com a fórmula: $\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do transcrito normalizador}$. Após a normalização dos resultados baseada na expressão do gene referência, a determinação do valor da expressão gênica se deu por meio do método de Livak, calculado pela fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak; Schmittgen, 2001).

7.4.4 Especificidade e eficiência de amplificação dos iniciadores

Inicialmente, para determinar a eficiência de amplificação (E%) e o coeficiente de determinação (R^2), foram realizadas diluições seriadas das amostras para os iniciadores deste estudo, e os resultados foram utilizados para construir uma curva padrão. Em seguida, uma regressão linear foi realizada para determinar a inclinação da linha para calcular o R^2 e a eficiência (E%) usando a fórmula: $E\% = 10^{(-1/\text{slope})} \times 100$ (Pfaffl, 2001). Consideramos pares de iniciadores dentro da faixa de 90% a 115% como ideais para um funcionamento adequado. A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada visualizando o tamanho esperado do amplicon em eletroforese em gel de agarose a 2%.

7.4.5 Padronização e escolha de genes referência para normalização dos dados de expressão e análise de estabilidade

Inicialmente, devido a falta de dados na literatura, e, a fim de garantir uma normalização dos dados mais confiável para as etapas envolvendo a aplicação da análise de expressão gênica, foi necessário a realização de uma padronização para estudos envolvendo a infecção experimental por *A. suum* e o carcinoma de mama murino 4T1. Para isso, foi conduzido um estudo prévio que foram testados cinco genes referência (GAPDH, 18S, ACTB, B2M e HPRT1) no fígado, pulmão, intestino delgado e grosso de animais eutanasiados no pico da migração larval em cada órgão conforme padronizado por Gazzinelli-Guimarães et al., (2013). Para as análises envolvendo o modelo de câncer, por ser uma doença que afeta diversas vias metabólicas, avaliamos 10 genes referência, sendo os cinco genes já citados, e outros cinco

(GUSB, PGK1, CCSER2, SYMPk, ANKRD17) no tumor primário e órgãos com confirmação de metástases (pulmão e fígado).

Os valores do coeficiente de variação Ct (CtCv%) usando a fórmula: $CtCv\% = (\text{Desvio Padrão} / \text{Média}) \times 100$ de cada iniciador foi calculado. Em seguida, para avaliar com precisão a estabilidade da expressão dos genes candidatos, analisamos inicialmente a distribuição dos valores de Ct e, em seguida, utilizamos cinco programas de software diferentes para calcular e identificar o gene mais estável em cada tecido exposto aos diferentes tratamentos: **geNorm**: calcula os valores de estabilidade de expressão (valor M) para cada gene, faz comparações dos valores entre o grupo controle e o grupo tratado e realiza a exclusão gradual do gene menos estável, calculando os valores M (valores $>1,5$ não são adequados e o menor valor M entre os genes indica a maior estabilidade) (Vandesompele et al., 2002); **BestKeeper**: uma ferramenta baseada no Microsoft Excel que classifica os genes de referência por meio de análise de correlação em pares, calcula o desvio padrão [$\pm$ CP] e coeficiente de variação (CV) para cada gene a partir do valor de Ct e do valor de amplificação de eficiência (valores mais baixos de Desvio Padrão [$\pm$ DP] indicam maior estabilidade) (Pfaffl et al., 2004); **NormFinder**: também é uma ferramenta baseada no Microsoft Excel que fornece valores de estabilidade para cada gene entre grupos e dentro dos grupos (valores menores de estabilidade indicam maior estabilidade) (Andersen et al., 2004); **O Método Comparativo Delta-Ct**: ferramenta que classifica os genes de referência com base no desvio padrão (DP) das médias de Delta-Ct por comparação em pares de cada gene de referência, resultando no gene mais estável (DP abaixo de 1 indica expressão estável) (Silver et al., 2006); **RefFinder**: uma ferramenta de análise on-line que integra médias geométricas e atribui um peso aos valores de estabilidade apresentados por essas outras ferramentas, classificando o gene mais estável (Xie et al., 2012; Xie F et al., 2023).

7.5 Imagens cintilográficas e experimentos *ex vivo* com radioisótopos

Os materiais necessários para o desenvolvimento das metodologias com radioisótopos foram adquiridos em colaboração com o Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG. Desses materiais, o complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi adquirido da GL Biochem (China) e utilizado para acompanhamento da progressão do câncer de mama nos diferentes órgãos. O Tecnécio (^{99m}Tc) usado para a marcação dos fármacos foi obtido de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ adquirido do Instituto de Pesquisas Energéticas e

Nucleares (IPEN/Brasil) em parceria com o setor de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da UFMG. Essa parceria foi fundamental para viabilizar a realização dos experimentos com radioisótopos, garantindo a disponibilidade dos materiais e a segurança nas manipulações.

7.5.1 Radiomarcção do complexo peptídico HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) com ^{99m}Tc

Para radiomarcção do complexo peptídico HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) para posterior determinação do rendimento de radiomarcção foram utilizadas metodologias previamente padronizadas por De Barros et al. (2013) e Fuscaldi et al. (2014). Basicamente, em um frasco âmbar selado, foi adicionado solução salina a 0,9% (p/v) contendo 20 mg de tricina e 5 mg de ácido etilenodiamino-*N, N'*-diacético (EDDA) para cada 0,5 mL. Em seguida, foram adicionados 10 µg do complexo peptídico HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) e 10 µL de cloreto estanoso (SnCl_2) em HCl 0,25N/mL. O pH foi ajustado para 7-8 com NaOH 0,1N e adicionamos 37 MBq de Pertecnetato de Sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$). A solução foi aquecida a 100 °C durante 15 minutos e arrefecida até à temperatura ambiente.

7.5.2 Controle de qualidade dos fármacos radiomarcados

Para verificar o rendimento da radiomarcção, foi realizado cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como fase estacionária a sílica-gel e como fase móvel metiletilcetona para determinação do percentual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e solução de acetonitrila e água na proporção de 1:1 para avaliação da quantidade de $^{99m}\text{TcO}_2$. O rendimento da marcação foi considerado de acordo com a fórmula: **% marcação = 100 - (% $^{99m}\text{TcO}_4^-$ + % $^{99m}\text{TcO}_2$)**.

7.5.3 Imagens cintilográficas

A obtenção das imagens cintilográficas foi realizada de acordo com Fuscaldi et al. (2014). Foram administrados por via intravenosa na veia caudal, 3,7 MBq de solução de ^{99m}Tc -HYNIC-βAla-Bombesina(7-14). As imagens foram adquiridas 4 horas após a administração do peptídeo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados utilizando cetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) e em seguida mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria) no Laboratório de Radioisótopos.

7.5.4 Experimentos de biodistribuição *ex vivo*

Os ensaios de biodistribuição foram conduzidos de acordo com Fuscaldi et al. (2014). Após a aquisição das imagens cintilográficas, os animais foram eutanasiados para coleta de órgãos. Os órgãos coletados foram pesados e tiveram a radiação quantificada por um contador de radiação gama - Wizard (Turku/Finlândia). Foram utilizados padrões de dose contendo a mesma dose injetada nos camundongos para correção do decaimento da radiação de ^{99m}Tc e para calcular o percentual da Dose Injetada (%DI) em cada órgão. A radiação do padrão de dose foi determinada simultaneamente com a dos órgãos dos animais. A %DI e a %DI/g para cada órgão foi calculada por meio das fórmulas: **%DI = (cpm órgão/cpm do padrão) x 100** e **%DI/g = [(cpm órgão/massa órgão)/cpm padrão] x 100**.

7.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Inc., EUA). Inicialmente todas as amostras foram submetidas ao teste de Grubb para detectar possíveis *outliers* e, assim, excluídos. Em seguida, o teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliação da normalidade dos dados. Para análises entre médias de dois grupos foram utilizados os testes T (dados paramétricos) ou Mann-Whitney (dados não-paramétricos). Para as análises entre três ou mais grupos, foram utilizados os testes *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (dados paramétricos) ou os testes de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn (dados não-paramétricos) de acordo com a distribuição de dados ou *Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de Dunn. Para verificar e quantificar a existência de relação entre variáveis foi aplicado o teste de correlação linear de Pearson (dados paramétricos), ou o teste de correlação de Spearman (dados não paramétricos). Para as análises de curva de sobrevivência, foi realizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox), seguido do cálculo da Hazard Ratio. Todos os testes foram considerados significativos quando o valor de p foi igual ou inferior a 0,05.

7.7 Resultados

7.7.1 Avaliação de genes referência para análises de expressão gênica por PCR em tempo real em diferentes tecidos de camundongos infectados por *A. suum*

Inicialmente, visando os experimentos realizado nos próximos capítulos caracterizamos a expressão de genes referência em diferentes tecidos afetados pela migração do *A. suum*. Essa etapa não apenas contribuirá para estudos futuros que empreguem a técnica de PCR em tempo real como ferramenta auxiliar em estudos envolvendo a infecção por *A. suum*, mas também foi essencial para aplicação nos resultados apresentados mais à frente neste trabalho. Os resultados apresentados neste tópico do capítulo I foram publicados na revista **Microbial Pathogenesis** sob título *Evaluation of reference genes for gene expression analysis by quantitative real-time PCR (qPCR) in different tissues of mice infected by Ascaris suum* (<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106567>) (Anexo III).

7.7.2 Análises parasitológicas

Não há dados na literatura que descrevam genes de referência ideais para estudos experimentais na infecção por *A. suum*. Muitos estudos utilizam camundongos como modelo experimental para estudar aspectos relacionados à infecção por *A. suum* [2,3,5,24–26]. Porém, o uso do qPCR como técnica nesses estudos pode se tornar uma limitação sem a padronização de um gene de referência ideal para normalização dos dados. Por meio da recuperação de larvas nos tecidos, conseguimos confirmar a presença de larvas nos respectivos tecidos, alterando de alguma forma toda a fisiopatologia. O fígado e o pulmão foram os tecidos com mais larvas recuperadas (**Figura 16**).

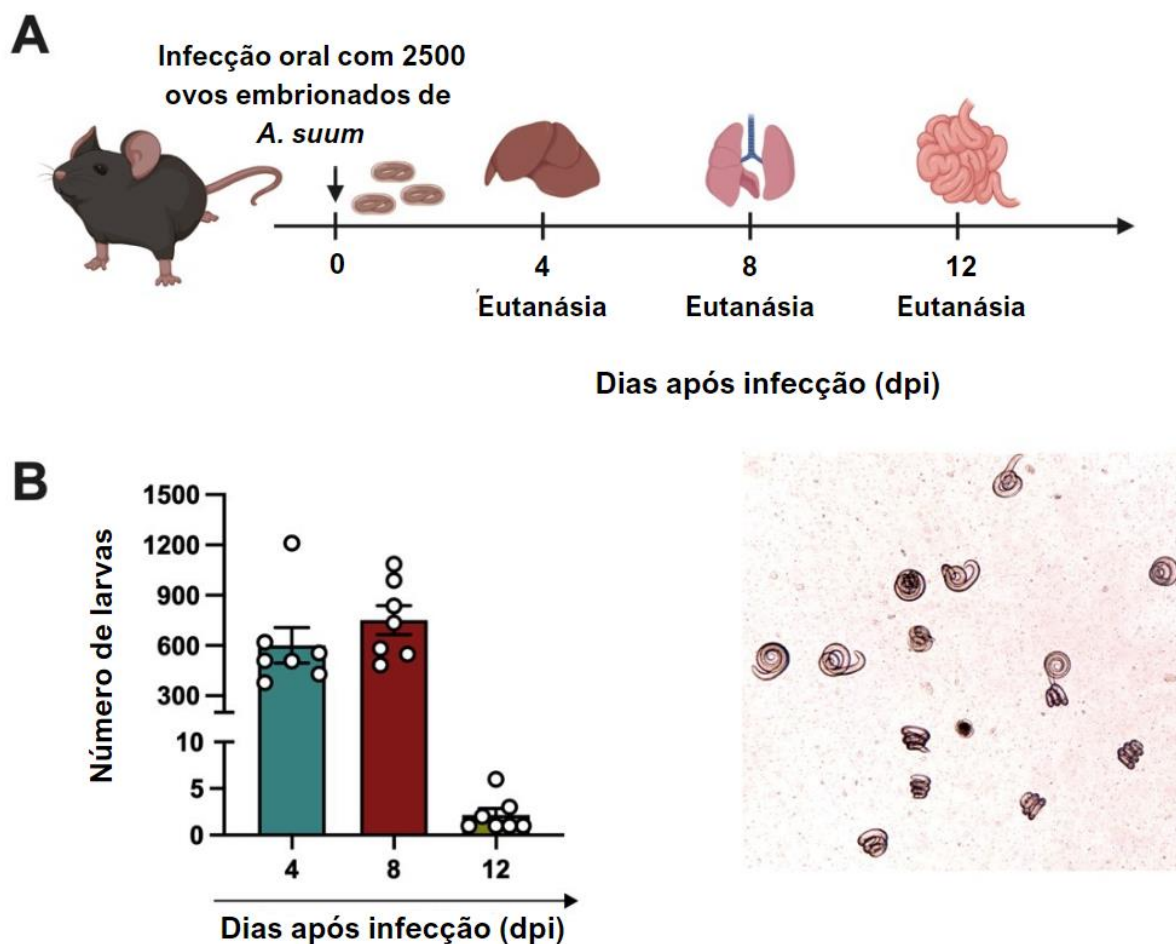


Figura 16: A: Desenho experimental da infecção com 2500 ovos de *A. suum* aos 4, 8 e 12 dias pós infecção e B: Recuperação larval.

Fonte: Souza et al., 2024.

7.7.3 Eficiência de amplificação e especificidade dos iniciadores

Os valores de eficiência de amplificação variaram de 100,5% (18S) a 114,8% (B2M), e o coeficiente de determinação (R^2) variou de 0,914 (HPRT1) a 1.000 (18S) (**Tabela 9**). Curvas de dissociação foram utilizadas para confirmar a especificidade dos primers nos ensaios de qPCR observando um único pico e foram visualizados fragmentos únicos do tamanho esperado na eletroforese em gel de agarose (**Figura 17**). Não observamos formação de produtos inespecíficos na análise da curva de dissociação para o branco das amostras.

Tabela 9: Informações a respeito eficiência dos iniciadores utilizados no capítulo I. Slope; E: Eficiência de amplificação em %; R²: eficiência de correlação e temperatura de Melting de cada gene utilizado.

GENE	SLOPE	E (%)	R ²	MELTING TEMPERATURE (TM)
GAPDH	-3,27	102,2	0,997	87,18
18S	-3,31	100,5	1,000	84,34
ACTB	-3,22	104,4	0,997	86,23
B2M	-3,01	114,8	0,983	81,41
HPRT1	-3,16	107,2	0,914	88,77
CXCL9	-3,29	101,35	1,000	80,36

Fonte: Autoria própria.

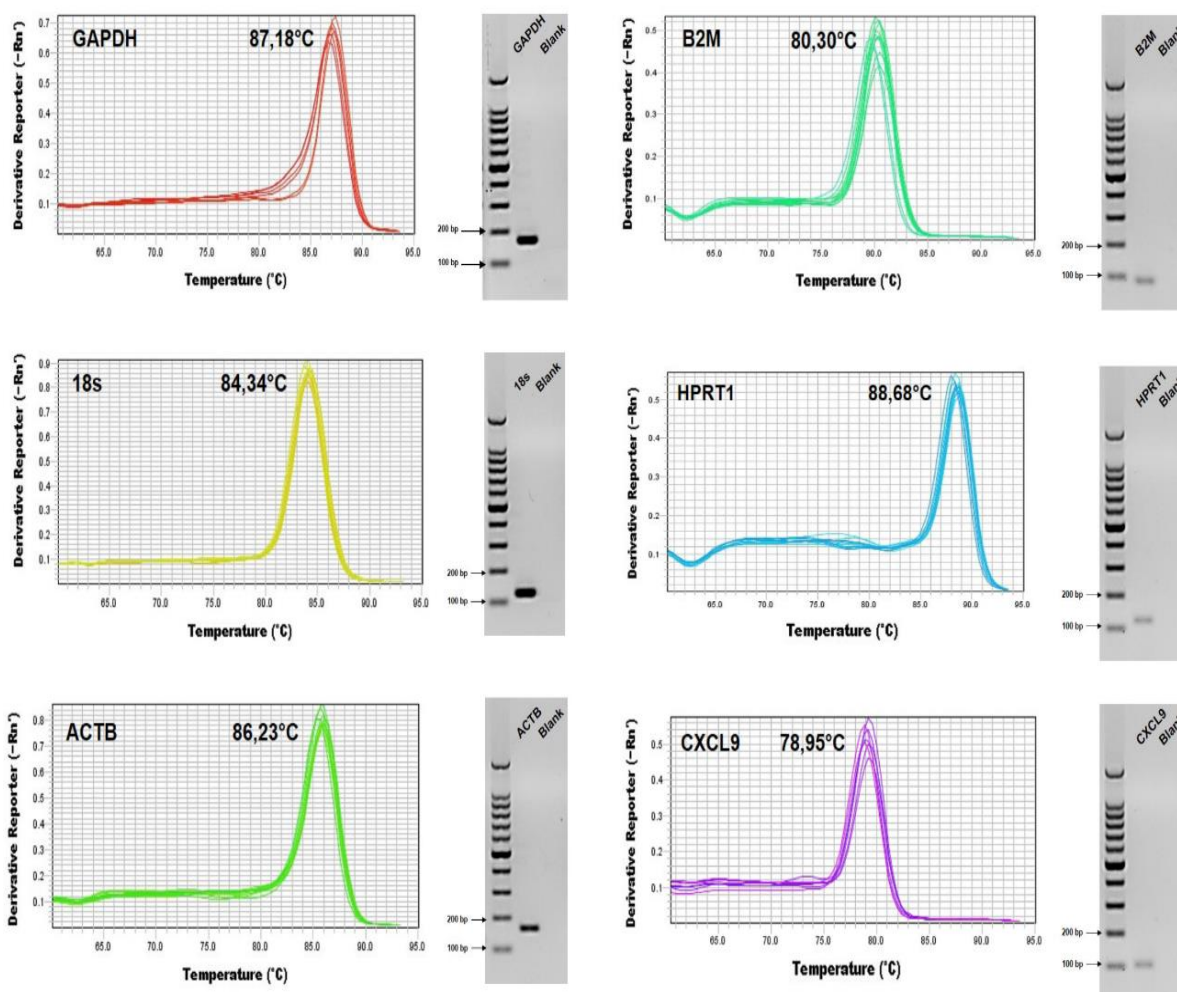


Figura 17: Curvas de dissociação (incluindo temperaturas de fusão) e eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação dos cinco genes candidatos de referência e do gene alvo CXCL9. Foi utilizado peso de DNA de 100 pb; em branco representamos controle negativo de reação.

7.7.4 Expressão dos genes referência candidatos nos diferentes tecidos

Nossos resultados mostraram que 18S foi o gene mais expresso devido ao menor valor de Ct em todos os tecidos avaliados, enquanto HPRT1 apresentou a menor expressão devido aos maiores valores de Ct no fígado, pulmão e intestino grosso e B2M no intestino delgado (**Figura 18**). Além dos valores brutos de Ct, os resultados de CV variaram nos diferentes tecidos. O 18S foi o gene com maior variação, enquanto o B2M foi o menor no fígado. No pulmão e intestino delgado o ACTB foi maior e o HPRT1 foi menor variação, enquanto no intestino grosso o 18S apresentou valor maior e o HPRT1 menor (**Tabela 10**). Em todos os tecidos, o GAPDH foi o gene mediano em termos de valores de expressão (**Figura 18**).

Valores de Ct

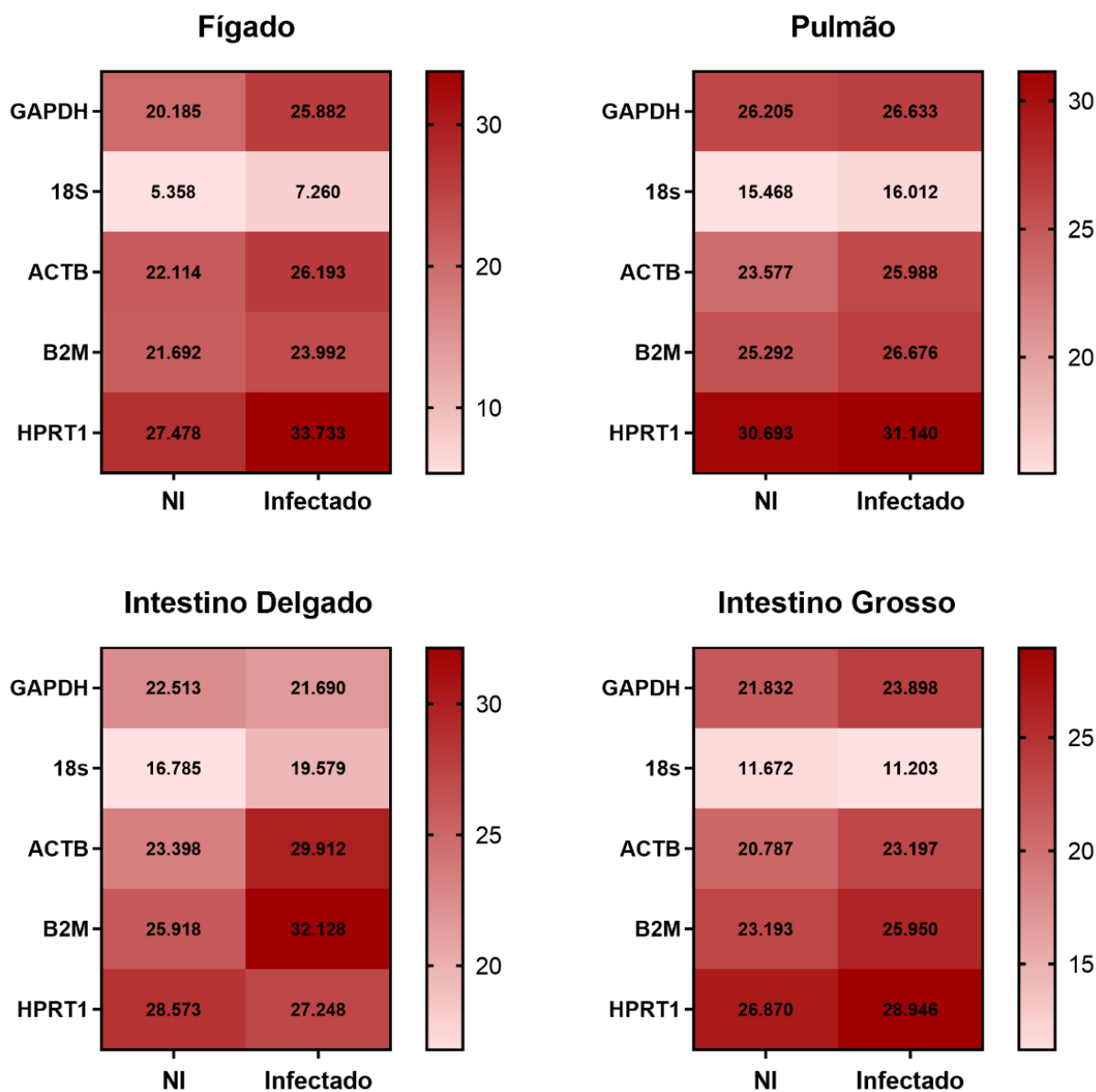


Figura 18: Distribuição da frequência dos níveis de expressão, baseados nos valores de Ct, para cada um dos cinco genes referência candidatos, separados por grupo (NI e infectado) em cada tecido avaliado.

Tabela 10: Média $\pm$ Desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos valores de Ct dos cinco genes referência candidatos para o pulmão, fígado, intestino delgado e grosso.

GENE	Fígado		Pulmão		Intestino delgado		Intestino grosso	
	Média do Ct $\pm$ DP	CV (%)	Média do Ct $\pm$ DP	CV (%)	Média do Ct $\pm$ DP	CV (%)	Média do Ct $\pm$ DP	CV (%)
GAPD	23,03 $\pm$ 3,09	13,41	26,42 $\pm$ 1,50	5,69	22,14 $\pm$ 1,15	5,19	22,86 $\pm$ 1,67	7,31
18S	6,34 $\pm$ 1,25	19,65	15,74 $\pm$ 0,76	4,80	18,05 $\pm$ 1,85	10,25	11,44 $\pm$ 1,67	14,62
ACTB	24,23 $\pm$ 2,14	8,85	24,67 $\pm$ 1,70	6,89	26,36 $\pm$ 3,57	13,55	21,88 $\pm$ 1,86	8,51
B2M	22,84 $\pm$ 1,40	6,11	25,92 $\pm$ 1,25	4,84	29,02 $\pm$ 3,48	11,99	24,44 $\pm$ 2,16	8,82
HPRT1	30,60 $\pm$ 3,33	10,87	30,90 $\pm$ 1,16	3,74	27,97 $\pm$ 1,09	3,90	27,81 $\pm$ 1,64	5,89

Fonte: Autoria própria.

7.7.5 Identificação do gene referência mais estável nos diferentes tecidos

A estabilidade da expressão em diferentes algoritmos apresentou resultados diferentes para cada tecido. Segundo o RefFinder, o B2M foi o gene mais estável no fígado, o 18S no pulmão e no intestino delgado e o ACTB no intestino grosso (**Figura 19**). No fígado, além do B2M, o geNorm indicou uma combinação da média geométrica do valor Ct com 18S, Normfinder e Delta Ct classificou ACTB, e Bestkeeper classificou 18S como mais estável (**Figura 20**). No pulmão, observamos que houve consenso entre quase todos os softwares. O 18S foi classificado como o gene mais estável nos algoritmos Bestkeeper, normfinder, Delta Ct e RefFinder, enquanto a combinação entre ACTB e B2M foi classificada pelo geNorm (**Figura 19**). Além disso, o 18S também foi classificado como o gene mais estável no intestino delgado de acordo com Normfinder, Delta Ct e RefFinder, enquanto o Bestkeeper classificou o HPRT1 como o mais estável e o geNorm sugeriu uma associação entre ACTB e B2M (**Figura 20**). No intestino grosso, ACTB foi listado como mais estável pelo Normfinder e Delta Ct, enquanto Bestkeeper listou GAPDH e geNorm indicou uma combinação entre GAPDH e ACTB (**Figura 19**). Observamos que no fígado, pulmão e intestino grosso, o HPRT1, segundo todos os algoritmos, foi gene menos estável (**Figura 20**).

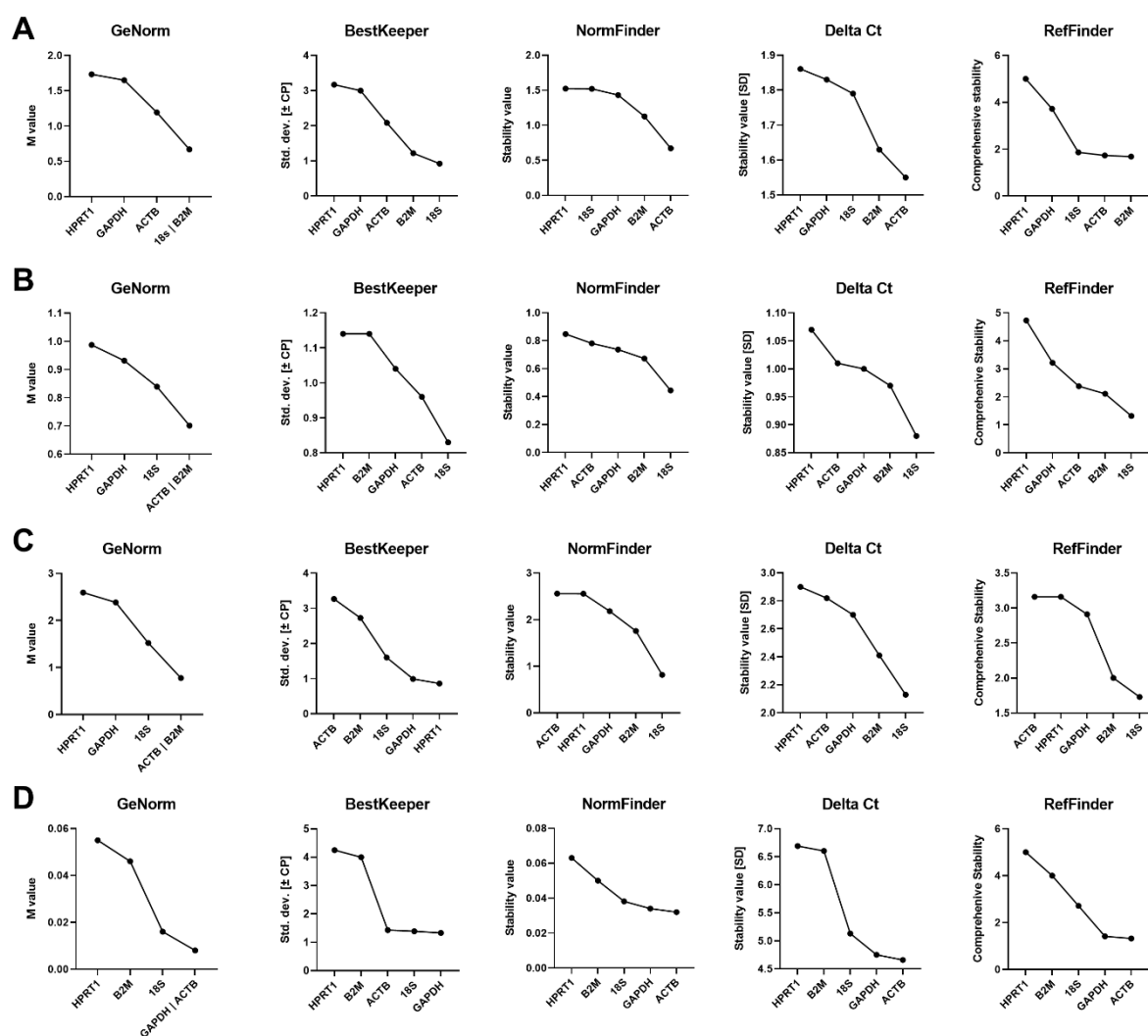


Figura 19: Resultado do teste de estabilidade calculado por cinco diferentes softwares (GeNorm, Bestkeeper, Normfinder, Comparative Delta Ct e RefFinder). Em A: fígado, B: pulmão, C: intestino delgado and D: intestino grosso

7.7.6 Validação dos genes referência candidatos

Para avaliar o efeito da normalização dos resultados de RT-qPCR com base nos genes de referência candidatos avaliados, um experimento de validação foi conduzido em todos os tecidos de camundongos não infectados e infectados no pico de infecção de *A. suum*. A expressão do gene CXCL9 foi normalizada utilizando os genes avaliados neste estudo, conforme demonstrado na **Figura 20**. No fígado, os níveis de expressão de CXCL9 foram significativamente menores nos animais infectados em comparação aos grupos não infectados quando a expressão relativa foi normalizada por todos os genes (**Figura 20**). HPRT1, que foi considerado o gene menos estável neste tecido, aparentemente o valor da expressão gênica em

animais infectados mostrou que a expressão não é tão baixa. Porém, ao normalizarmos com B2M, observamos que, de fato, o gene não é tão expresso comparado ao grupo não infectado (**Figura 20**). No pulmão, observamos que os níveis de expressão de CXCL9 foram significativamente maiores em animais infectados em comparação com animais não infectados para todos os genes, exceto ACTB. Observamos que o intestino delgado teve uma superestimação quando normalizamos a expressão com ACTB (menos estável). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os animais infectados e não infectados no intestino grosso.

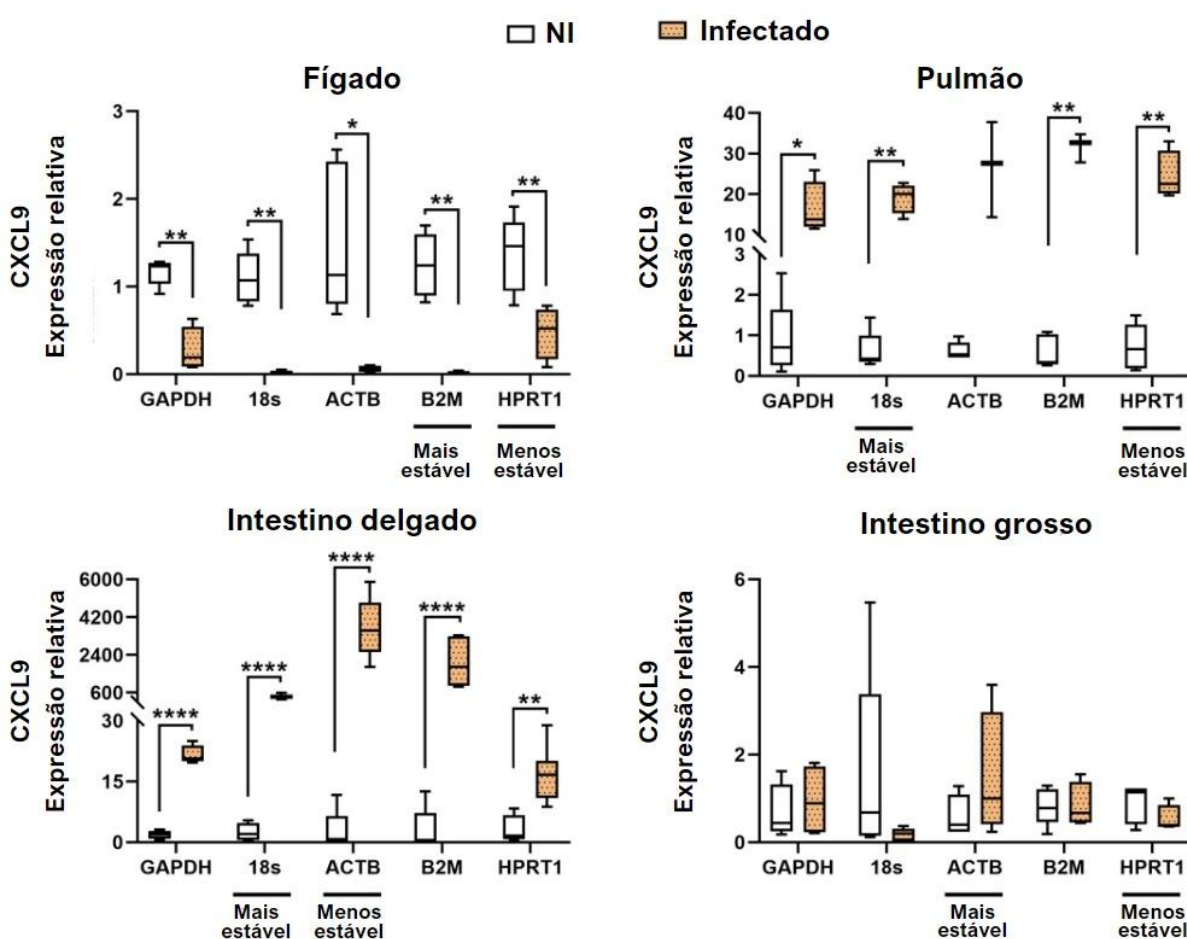


Figura 20: Normalização da expressão de CXCL9 com diferentes genes referência no fígado, pulmão, intestino delgado e grosso em camundongos infectados com *A. suum* no pico da migração larval. *indica diferença significativa (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). Foi usado teste T com correção de Welch.

7.8 Triagem e validação de diferentes genes referência para ensaios de PCR em tempo real no modelo de carcinoma de mama murino 4T1 e respectivas metástases

Diante da complexidade do câncer, e devido a necessidade de padronização do modelo de carcinoma de mama 4T1 para aplicação no estudo do papel da exposição prévia ao *A. suum*, inicialmente caracterizamos a expressão de genes referência no tumor primário e nos diferentes tecidos afetados por metástases. Além disso, aplicamos uma abordagem abrangente e complementar para o estudo no modelo *in vivo* 4T1, já utilizado em outros modelos de câncer. Além da histopatologia, integramos técnicas de cintilografia e experimentos *ex vivo* para avaliação de biodistribuição utilizando radiofármacos para uma visão mais dinâmica da disseminação do câncer. Enquanto a histopatologia oferece uma perspectiva estática, a cintilografia proporciona uma avaliação em tempo real e o sem a necessidade de realização de eutanásia do animal para acompanhamento da cinética de desenvolvimento tumoral, destacando nuances e padrões sutis.

Essa combinação de métodos fortalecerá a validade dos resultados e proporcionará uma compreensão mais abrangente do comportamento do tumor, facilitando o desenho experimental para utilização no nosso estudo e para outros trabalhos que utilizem o modelo de câncer de mama 4T1. Os resultados apresentados neste tópico foram submetidos na revista **Scientific Reports** sob título: ***Screening and validation of different reference genes for real-time PCR assays in the 4T1 murine breast carcinoma model and metastases*** (Apêndice).

7.8.1 Evolução do carcinoma de mama murino 4T1 e confirmação de metástases em órgãos alvo

Um dos primeiros passos foi analisar a evolução dos tumores e a sobrevida dos animais, sendo essencial para determinar os pontos de coleta para as análises deste trabalho. Para indução do câncer nos camundongos, foram inoculados 1×10^6 células 4T1 no flanco esquerdo e em seguida os animais foram monitorados a cada dois dias para observação de sinais clínicos e para o acompanhamento da evolução do tumor. A análise de sobrevida revelou que os camundongos com câncer apresentam mediana de sobrevida de 34 dias, com valor da Hazard Ratio de 17,94 (**Figura 21**). Aos 30 dias após a indução do câncer observamos mortalidade de 30% dos animais, atingindo pico de mortalidade aos 34 dias, quando foi alcançado letalidade de 50% e aos 36 dias observamos que os camundongos restantes, representados por 20%, morreram

totalmente (**Figura 21**). A evolução do tamanho do tumor, avaliação clínica e evolução de áreas ulceradas foram representados até o dia 30.

Os animais começaram a apresentar sinais avaliados no *score* clínico a partir do 12º dia, iniciando com piloereção e com o passar dos dias foram se agravando progressivamente (**Figura 21**). Quanto ao tamanho dos tumores, observamos que a partir do 6º dia tornou-se possível a palpação, seguida de crescimento exponencial, atingindo um tamanho médio de 3800 mm³ no 30º dia (**Figura 21**). Vale ressaltar que após o 30º dia, o tamanho máximo atingido foi 4598,20 mm³, observado em um animal que sucumbiu aos 34 dias. Além disso, também avaliamos a progressão da formação de úlceras nos tumores, com os primeiros sinais em alguns animais evidentes a partir do 10º dia e um agravamento ao longo do tempo, com alguns animais chegando a pontuação três, indicativo da presença de área ulcerada ocupando mais de 50% da circunferência do tumor primário e infiltrando-se para o interior (intensa) (**Figura 21**).

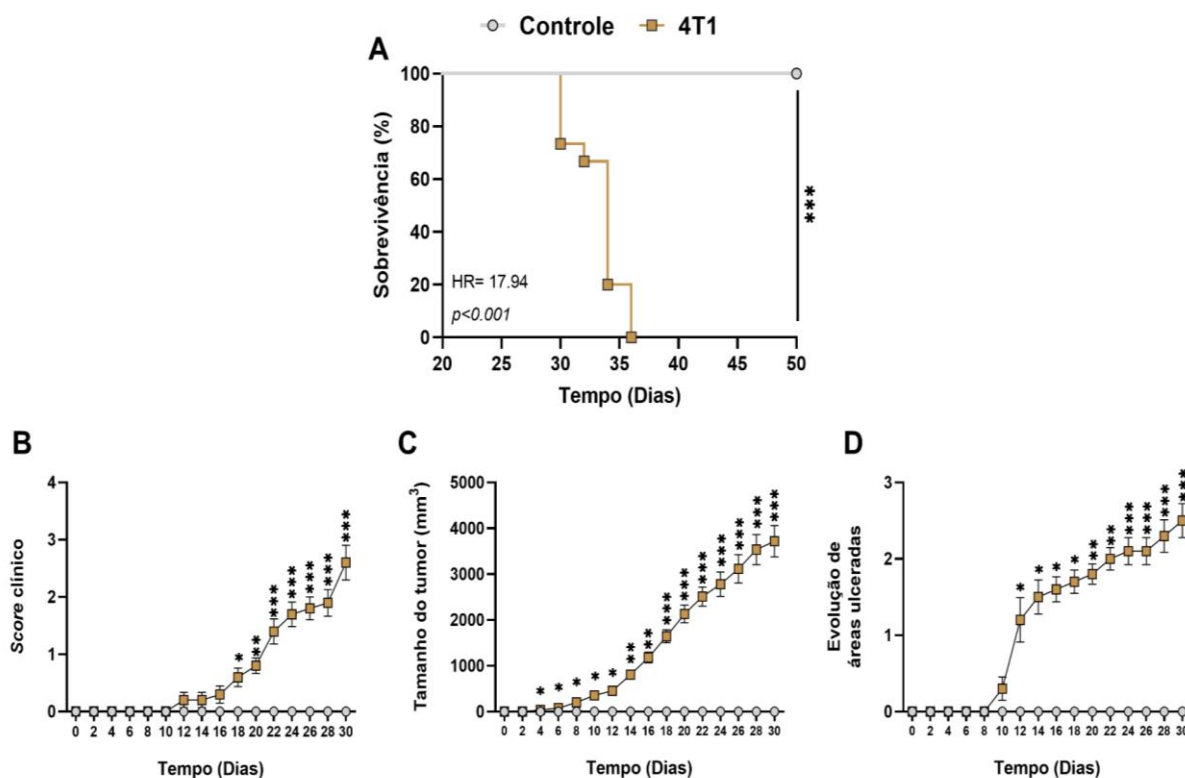


Figura 21: Aspectos clínicos da evolução do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c. A: Curva de sobrevivência dos animais; B: Score clínico ao longo de 30 dias; C: Crescimento do tumor (mm³) ao decorrer de 30 dias; D: Evolução das áreas ulceradas no tumor primário ao longo de 30 dias. O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi usado para avaliação de sobrevivência e para cálculo da Hazard Ratio o teste de Mantel-Haenszel foi utilizado (n=15 para grupo 4T1 e n=6 para grupo controle). Para avaliação do score clínico e de evolução de áreas ulceradas (B e D) o teste de Mann-Whitney foi utilizado. Para avaliação do curso do crescimento do tumor (C) foi usado teste-t. Dados representados em média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M.). Diferenças significativas são representadas por *, sendo * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Fonte: Autoria própria.

Para a coleta dos órgãos para os ensaios de qPCR, foi necessário a escolha de um ponto em que houvésssemos confirmado a presença de metástases. Assim, procedemos com as coletas dos principais órgãos alvos do carcinoma de mama 4T1 (cérebro, fígado e pulmão) para determinar o melhor ponto para as análises. Após 14 dias, houve confirmação de metástase no fígado e ausência no pulmão. Aos 21 dias, foram encontradas metástases no fígado e no pulmão, as quais se intensificaram aos 28 dias. Metástases no cérebro não foram evidenciadas em nenhum dos pontos de coleta por análise histopatológica (**Tabela 11; Figura 22**).

Tabela 11: Presença de metástases no fígado, pulmão e cérebro em camundongos BALB/c em diferentes dias após inoculação de células 4T1.

TECIDOS	14 DIAS PÓS INDUÇÃO DO TUMOR		21 DIAS PÓS INDUÇÃO DO TUMOR		28 DIAS PÓS INDUÇÃO DO TUMOR	
	Animais com metástase	Extensão das metástases	Animais com metástase	Extensão das metástases	Animais com metástase	Extensão das metástases
Fígado	6/6	Multifocal	6/6	Multifocal	6/6	Multifocal
Pulmão	0/6	-	6/6	-	6/6	-
Cérebro	0/6	-	0/6	-	0/6	-

Fonte: Autoria própria.

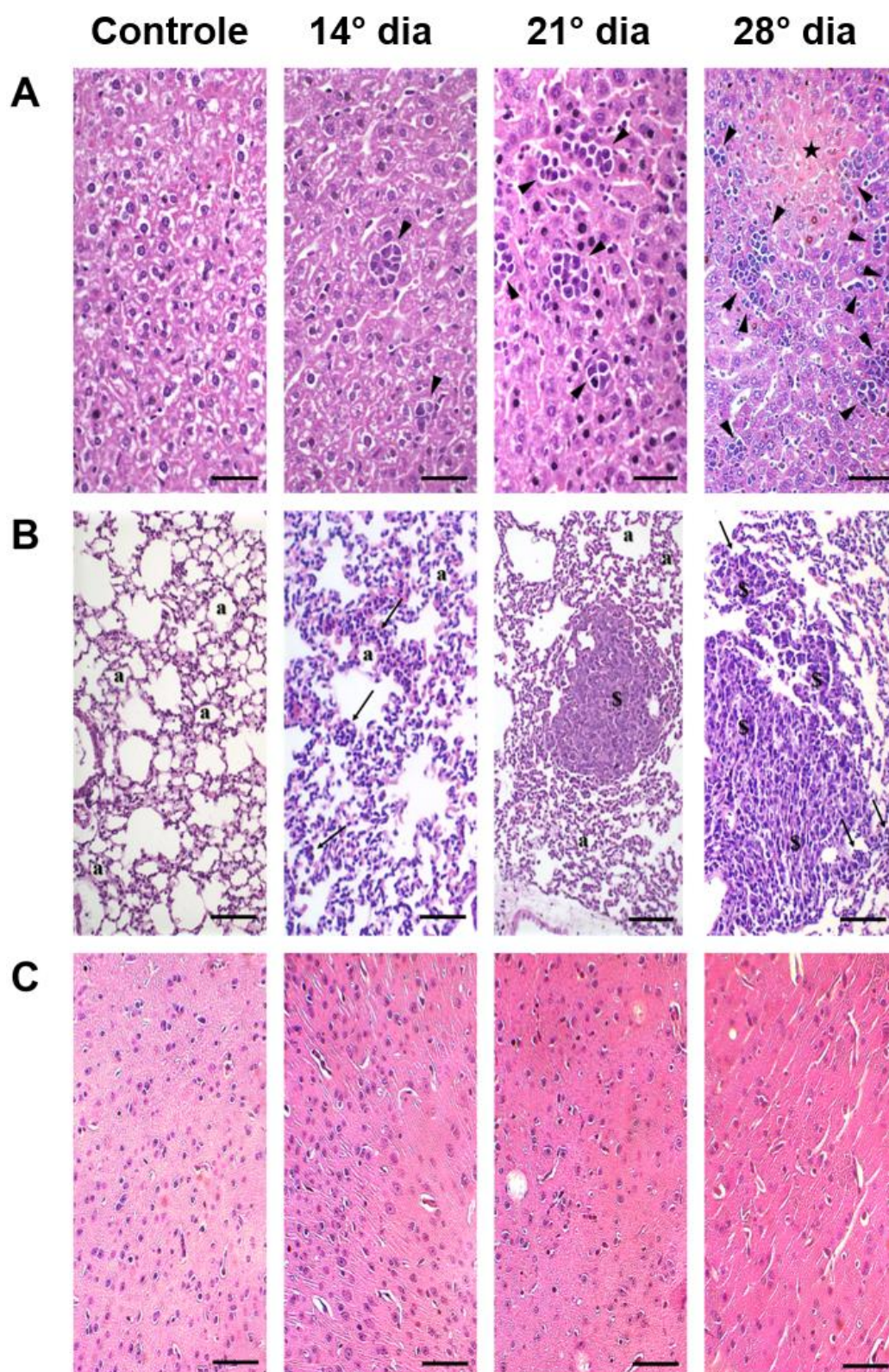


Figura 22: Coloração representativa da histopatologia dos tecidos analisados aos 14, 21 e 28 dias após a injeção das células. A: Coloração de cortes de fígado; B: Coloração de cortes de pulmão; C: Coloração de cortes de cérebro; No fígado (A), os símbolos representam focos metastáticos (ponta de seta) e área de necrose (estrela), enquanto no pulmão (B), os símbolos representam alvéolos (a), focos de infiltração inflamatória (seta) e focos metastáticos em (\$). No cérebro (C) não foram observadas diferenças ao longo dos dias no parênquima. Barra = 50 µm.

Diante da complexidade das metástases no câncer de mama, incluindo em modelo experimental, implementamos uma abordagem abrangente e complementar para o estudo do modelo *in vivo* 4T1. Além da tradicional histopatologia, integramos cintilografia e experimentos de biodistribuição (*ex vivo*) para uma visão mais dinâmica da disseminação tumoral, uma estratégia já empregada em outros modelos *in vivo* de câncer. Enquanto a histopatologia oferece uma perspectiva estática, a cintilografia proporciona uma avaliação em tempo real, destacando nuances e padrões discretos que podem ser negligenciados. Essa combinação de métodos fortalece a validade dos resultados e proporciona uma compreensão mais abrangente do comportamento do modelo de carcinoma de mama 4T1.

Portanto, para avaliação da progressão de metástases nos diferentes órgãos, os animais receberam injeção de HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ radiomarcada com ^{99m}Tc após 14, 21 e 28 dias da indução do câncer. A partir dos 14 dias após a indução do câncer foi possível observar o surgimento de captação de radiação no fígado que se intensificou nos demais pontos de coleta. Por outro lado, não foi possível captar com precisão a radiação ao longo dos dias no pulmão e cérebro (**Figura 23 A**). Por se tratar de um resultado qualitativo, realizamos a quantificação da radiação *ex vivo* da biodistribuição da HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ radiomarcada com ^{99m}Tc para obtenção de dados quantitativos e para melhor entendimento da biodistribuição do tumor (**Figura 23 B**).

Os resultados obtidos no experimento *ex vivo* exibiram padrões distintos das impressões resultantes nas imagens cintilográficas, com exceção do fígado, onde houve aumento da captação progressivamente ao longo do tempo (**Figura 23 B**). Por outro, observamos um aumento significativo na captação no pulmão a partir dos 21 dias, o que se agravou ainda mais aos 28 dias, sugerindo o agravamento de metástases no órgão (**Figura 23 B**). Digno de nota, não foram observadas alterações na captação no cérebro, sugerindo não haver áreas de metástases em nenhum desses pontos de coleta (**Figura 23 B**), assim como observado nas análises histopatológicas (**Figura 22**).

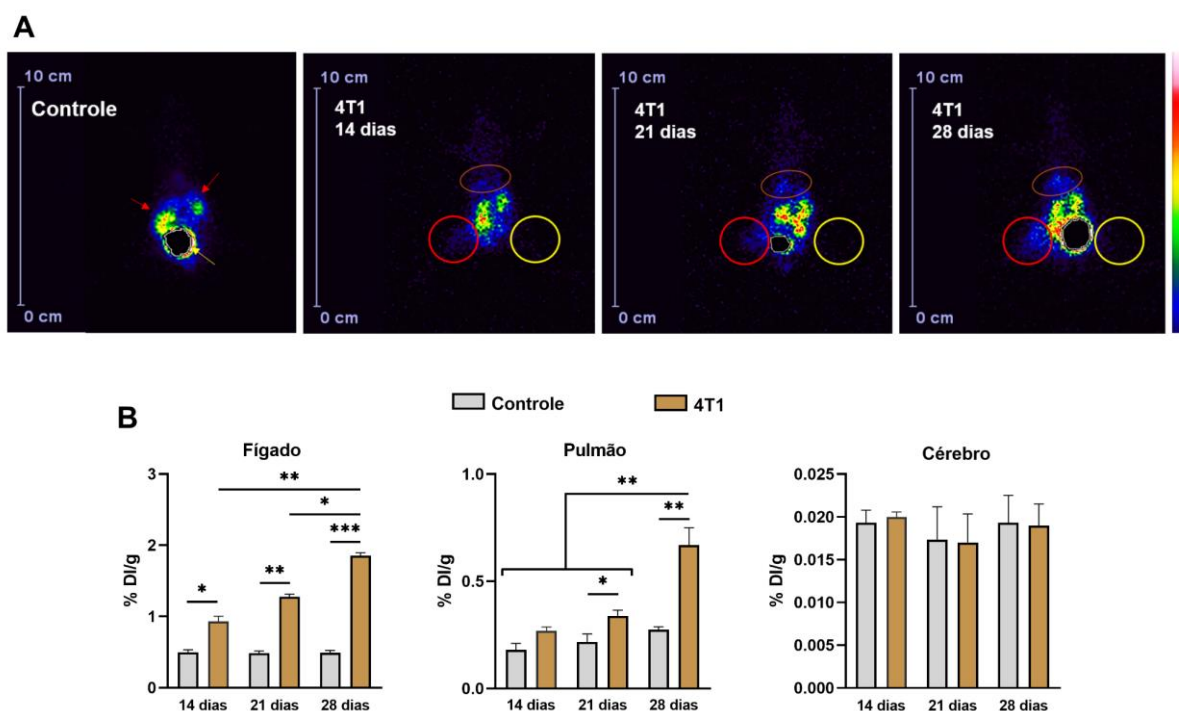


Figura 23: Imagens cintilográficas e biodistribuição da HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) radiomarcada com ^{99m}Tc em diferentes órgãos. A: Cintilografia de camundongos BALB/c com carcinoma de mama murino 4T1 aos 14, 21 e 28 dias pós indução do tumor e grupo controle sem indução de câncer; B: Percentual de dose injetada (% DI/g) no fígado, pulmão e cérebro. Para avaliação de diferenças entre os grupos em dias alternados, foi usado teste-t. Dados representados em média ± erro padrão da média (S.E.M). Diferenças significativas entre os grupos são representadas por * com barra para indicar diferenças entre os grupos em dias diferentes. Sendo *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Setas vermelhas: depuração da HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) radiomarcada nos rins; Seta amarela: ROI da bexiga para melhor distribuição da captação de radiação; Círculo vermelho: indica a presença do tumor devido a captação de radiação; Círculo amarelo: representa o não alvo, local contrário a indução do tumor para evidenciar a diferença; Círculo laranja: indica a presença de metástases no fígado.

Fonte: Autoria própria.

7.8.2 Eficiência de amplificação e especificidade dos iniciadores de genes candidatos

Após a observação do comportamento da evolução do câncer e da formação de metástases, optamos por realizar a coleta de amostras no ponto 21 para as análises de biologia molecular. Antes de conduzir as análises de expressão gênica, foram analisados os padrões de especificidade e eficiência de amplificação dos iniciadores, uma etapa crucial que influencia diretamente na precisão dos resultados que serão obtidos na normalização dos dados na PCR em tempo real.

Todos os iniciadores delineados obtiveram boa eficiência, com valores de E% variando entre 95,30% (PGK1) a 111,71% (ANKRD17). Além disso, o valor de R² variou de 0,968 (CCER2) a 1,000 (PGK1 e SYMPK) (**Tabela 12**). As curvas de dissociação foram reproduzidas para confirmar a especificidade dos ensaios de PCR em tempo real pela observação de um único

pico. Não foram observadas a formação de produtos inespecíficos nas curvas e nos respectivos brancos para cada gene (**Figura 24**).

Tabela 12: Eficiência de amplificação dos diferentes iniciadores. Slope obtido para diferentes genes; E: Eficiência de amplificação; R²: Coeficiente de determinação; T_m: Temperatura de melting.

GENE	SLOPE	E (%)	R ²	TM (°C)
GUSB	-3,10	110,17	0,997	82,64
PGK1	-3,44	95,30	1,000	81,81
CCER2	-3,16	107,23	0,968	79,38
SYMPK	-3,33	99,96	1,000	85,99
ANKRD17	-3,07	111,71	0,999	80,74
VEGF	-3,27	105,82	0,984	83,20
TNF- α	-3,32	100,08	0,980	83,23

Fonte: Autoria própria.

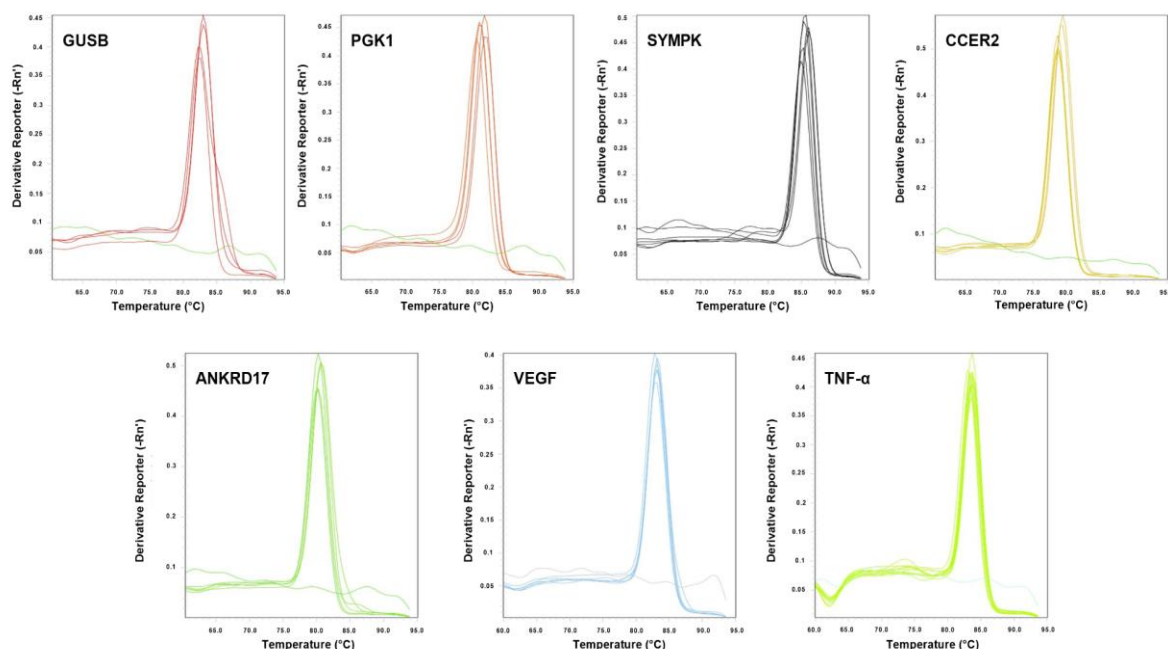


Figura 24: Curvas de dissociação dos cinco genes referência candidatos (GUSB, PGK1, SYMPK, CCER2 e ANKRD17) e dois genes alvo (VEGF e TNF- α).

Fonte: Autoria própria.

7.8.3 Variação dos valores de Ct dos genes candidatos nos diferentes tecidos

Nossos resultados revelam que o 18S apresentou a maior valor de Ct em todos os tecidos avaliados, enquanto o GUSB foi o gene com menor valor de Ct no tumor e no pulmão, e SYMPK e CCER2 no fígado (**Figura 25**). Além disso, destacamos que a expressão dos genes referência variou entre o grupo câncer e o grupo controle em alguns tecidos, sendo as variações maiores observadas no tumor primário e no fígado. O CCER2 não apresentou variação nos valores de Ct em nenhum dos tecidos analisados, enquanto o SYMPK variou consistentemente em todos. No tumor primário, os valores de Ct variaram nos genes SYMPK, B2M, HPRT1, ACTB, 18S e GAPDH (**Figura 25 A**), enquanto no fígado, houve variação em SYMPK, PGK1, GUSB, B2M, HPRT1 e 18S (**Figura 25 B**). No pulmão, observamos variações apenas nos genes ANKRD17, SYMPK e GAPDH (**Figura 25 C**). Esses resultados demonstram que o câncer pode induzir variações nos valores de Ct, indicando possíveis alterações na expressão gênica.

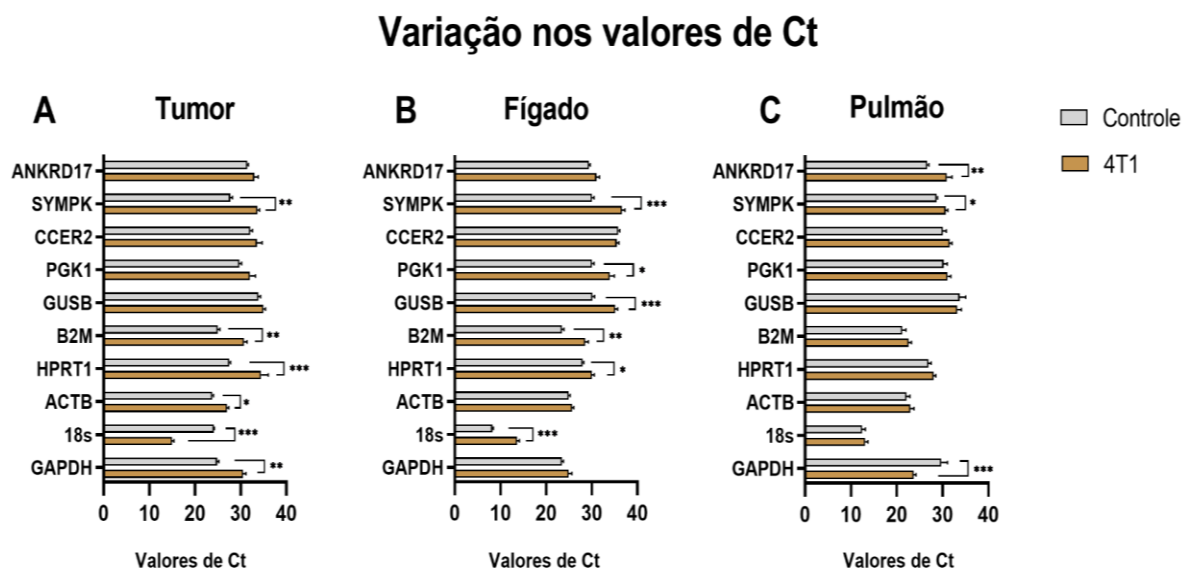


Figura 25: Distribuição dos valores Ct para cada um dos 10 genes referência candidatos separados por grupo nos três tecidos avaliados. A: Valores de Ct no tumor; B: Valores de Ct no fígado; C: Valores de Ct no pulmão. Dados representados em média $\pm$ S.E.M. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar diferenças entre os grupos e são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

7.8.4 Análises de estabilidade dos genes referência candidatos

Inicialmente, o software geNorm (versão 3.5) foi utilizado para calcular a média da estabilidade de expressão (Valor M) entre os genes nos diferentes tecidos. É importante ressaltar

que nem todos os genes apresentaram valores inferiores a 1,5 (considerado o limiar para considerar um ótimo gene referência). No tumor, detectamos que o 18S foi o gene com maior valor M, enquanto cinco genes (ACTB, GUSB, ANKRD, PGK1 e CCER2) obtiveram valores abaixo de 1,5, embora com variabilidade significativa (**Figura 26 A**). Nesse contexto, CCER2 ou a combinação entre PGK1/CCER2 emergiram como as melhores opções para normalização dos dados de expressão no tumor primário. Nos outros tecidos, foi observado que o SYMPK, apresentou o maior valor de M. Além disso, o fígado foi o tecido com a menor quantidade de genes (HPRT1, ANKRD17, GAPDH e ACTB) que alcançou valores abaixo de 1,5 (**Figura 26 B**). Dentre as opções, ACTB ou a combinação entre GAPDH/ACTB foram as melhores para normalização dos dados nesse órgão com metástase (**Figura 26 B**). Já no pulmão, órgão com a maior diversidade de genes abaixo de 1,5, totalizando oito (ANKRD17, GUSB, ACTB, HPRT1, CCER2, 18S, B2M e PGK1). No entanto, destacamos que 18S, B2M, PGK1 ou a combinação entre B2M/PGK1 foram as melhores opções (**Figura 26 C**).

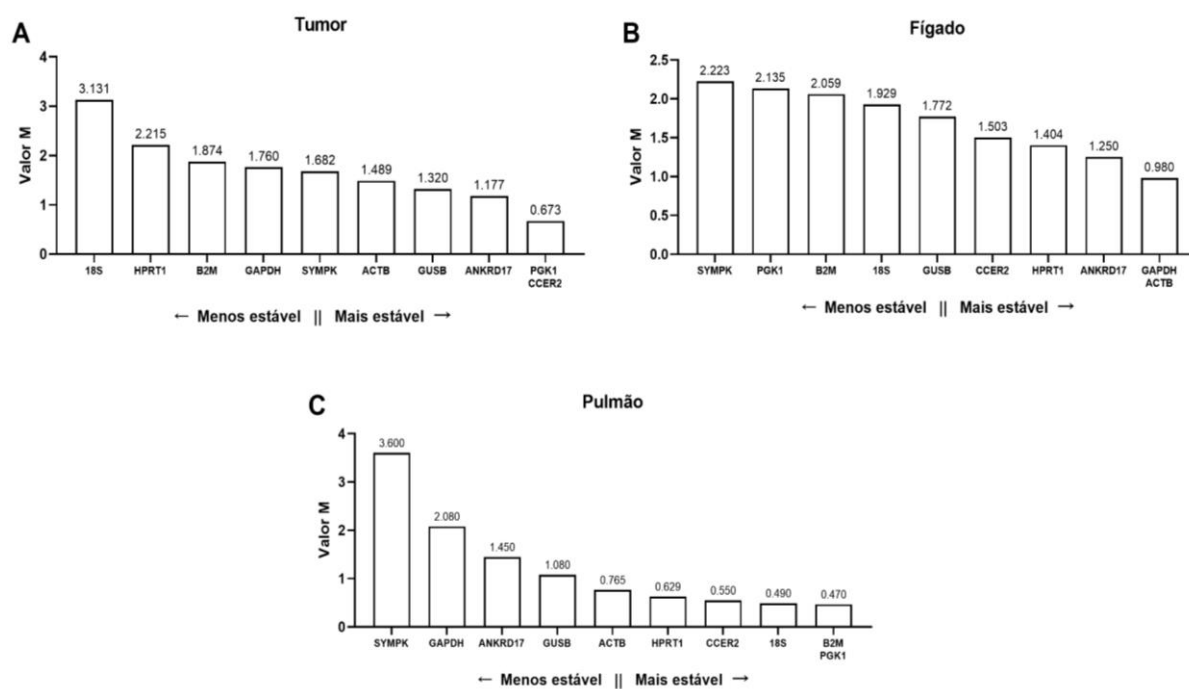


Figura 26: Análise da estabilidade da expressão dos 10 diferentes genes referência candidatos pelo geNorm em diferentes tecidos. A: Avaliação da estabilidade gênica no tumor; B: Avaliação da estabilidade gênica no fígado; C: Avaliação da estabilidade gênica no pulmão.

Fonte: Autoria própria.

Em seguida, o software NormFinder foi usado para avaliação do melhor gene referência. Na comparação com os outros valores, o gene com menor valor S é o mais estável. No caso do

tumor primário, GAPDH foi classificado como o gene mais estável (**Figura 27 A**), enquanto no fígado e no pulmão, foi o HPRT1 (**Figura 27 B e C**). Por outro lado, o 18S foi classificado como o menos estável no tumor e no pulmão, enquanto no fígado o menos estável foi o CCER2. Esses resultados também exibem algumas discrepâncias com o geNorm, classificando os genes em diferentes posições, exceto no tumor, onde o 18S foi consistentemente classificado como estável (**Figura 27 A**). Em relação às análises realizadas no BestKeeper, diferente dos programas usados anteriormente, o ACTB foi o gene com maior estabilidade em todos os tecidos, enquanto o CCER2 foi o gene com menor estabilidade no tumor e SYMPK registrou a menor estabilidade no fígado e pulmão (**Tabela 13**).

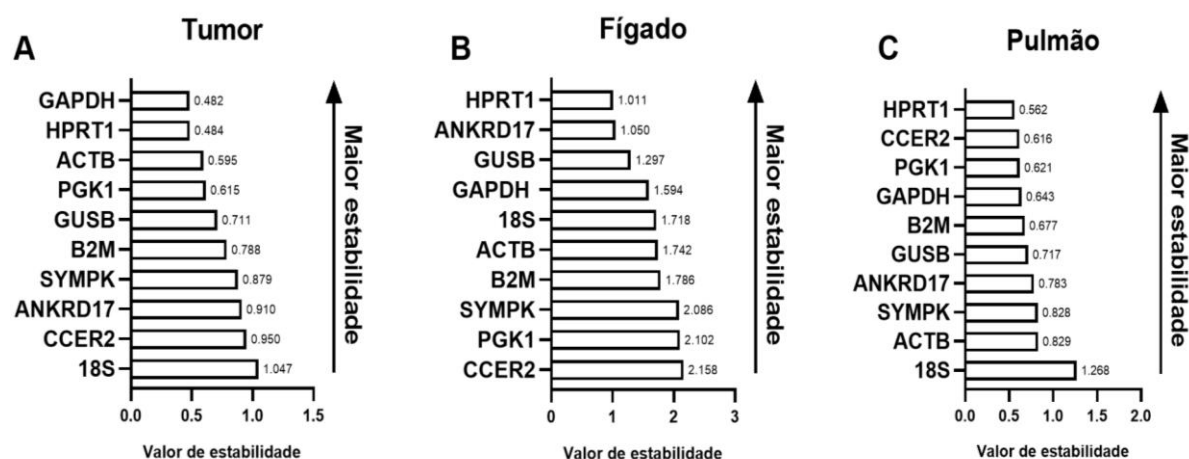


Figura 27: Análise da estabilidade da expressão dos 10 diferentes genes referência candidatos pelo NormFinder em diferentes tecidos. A: Avaliação da estabilidade gênica no tumor; B: Avaliação da estabilidade gênica no fígado; C: Avaliação da estabilidade gênica no pulmão.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13: Análise da estabilidade da expressão dos 10 diferentes genes referência candidatos pelo BestKeeper em diferentes tecidos.

TUMOR			FÍGADO			PULMÃO		
Classificação	Gene	SD [± CP]	Classificação	Gene	SD [± CP]	Classificação	Gene	SD [± CP]
1	ACTB	1.60	1	ACTB	0.75	1	ACTB	1.69
2	B2M	2.32	2	CCER2	0.92	2	GAPDH	2.42
3	GAPDH	2.77	3	ANKRD17	1.13	3	18S	3.42
4	18S	4.15	4	HPRT1	1.25	4	B2M	3.72
5	HPRT1	4.17	5	GAPDH	1.33	5	HPRT1	4.67
6	PGK1	6.25	6	PGK1	2.42	6	PGK1	8.22
7	GUSB	6.72	7	B2M	2.51	7	CCER2	8.25
8	SYMPK	11.01	8	GUSB	2.58	8	GUSB	8.89
9	ANKRD17	11.31	9	18S	2.75	9	ANKRD17	10.46
10	CCER2	11.56	10	SYMPK	3.17	10	SYMPK	10.88

Fonte: Autoria própria.

Como as análises de estabilidade dos genes foram discrepantes de um programa para o outro, o software RefFinder foi utilizado para hierarquizar os genes mais estáveis por tecido (**Figura 28**). No tumor, o gene que apresentou maior estabilidade, assim como mencionado pelo NormFinder, foi o GAPDH, enquanto o CCER2 foi o gene com menor estabilidade em concordância com os resultados gerados pelo Bestkeeper (**Figura 28 A**). No fígado, HPRT1 foi evidenciado como o gene mais estável, conforme indicado pelo NormFinder, enquanto o PGK1 foi classificado como menos estável, apesar de nenhum software ter o classificado como tal (**Figura 28 B**). No pulmão, o CCER2 foi o gene mais estável, sem concorrência com os outros softwares, enquanto o SYMPK foi colocado como menos estável, em concordância com os valores gerados pelo geNorm e BestKeeper (**Figura 28 C**).

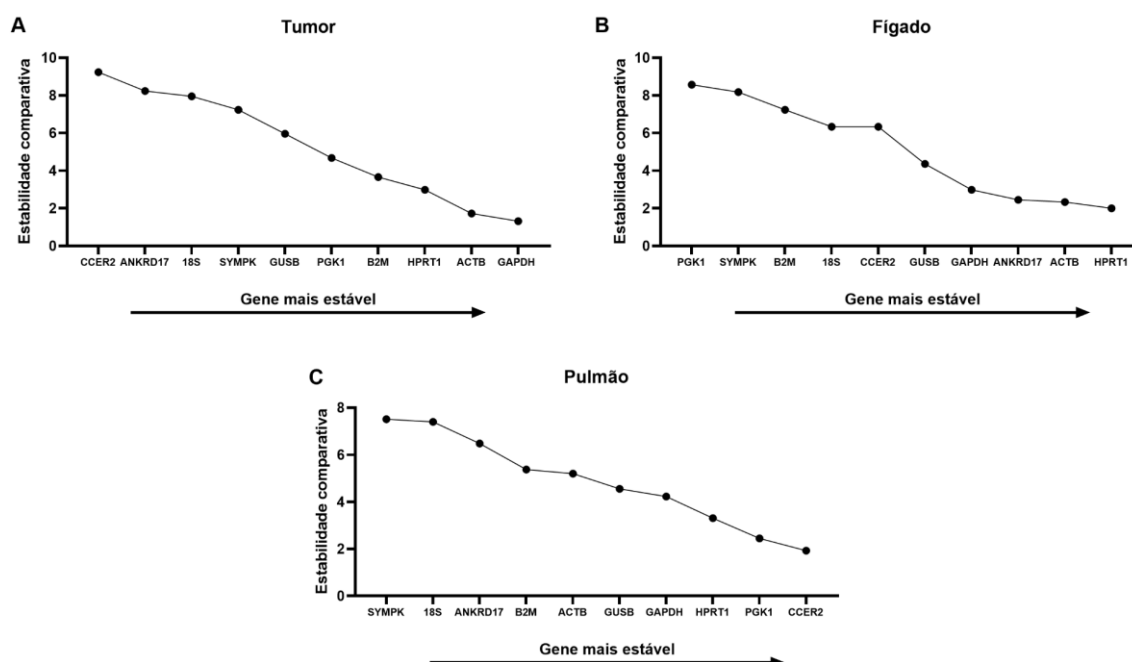


Figura 28: Classificação dos 10 diferentes genes referência candidatos em diferentes tecidos com base no RefFinder. A: Avaliação da estabilidade gênica no tumor; B: Avaliação da estabilidade gênica no fígado; C: Avaliação da estabilidade gênica no pulmão.

Fonte: Autoria própria.

7.8.5 Validação de análises de estabilidade dos genes referência candidatos

Após a seleção dos genes mais estáveis por tecidos, avaliamos o efeito destes e dos outros menos estáveis, para normalizar a expressão de VEGF e TNF- α nos tecidos dos camundongos controle e dos animais com câncer e com metástases confirmadas pelas análises histopatológicas e pelas técnicas envolvendo radioisótopos. Em todos os tecidos, observamos que os genes avaliados como menos estável foram capazes de superestimar a expressão quando normalizados com o respectivo gene referência, ou demonstrar expressão mais baixa em comparação com o controle. Por outro lado, isso não foi observado nos genes escolhidos como mais estáveis. No tumor, a expressão tanto do VEGF quanto do TNF- α , quando normalizados pelo GAPDH, foram maiores em relação ao respectivo controle (**Figura 29 A**). No fígado, a expressão de VEGF e TNF- α ao ser normalizada por HPRT1 demonstrou ser eficiente, sendo constatado aumento da expressão desses genes (**Figura 29 B**). No pulmão, a normalização por CCER2 também demonstrou ser eficiente, tanto para VEGF quanto para TNF- α (**Figura 29 C**).

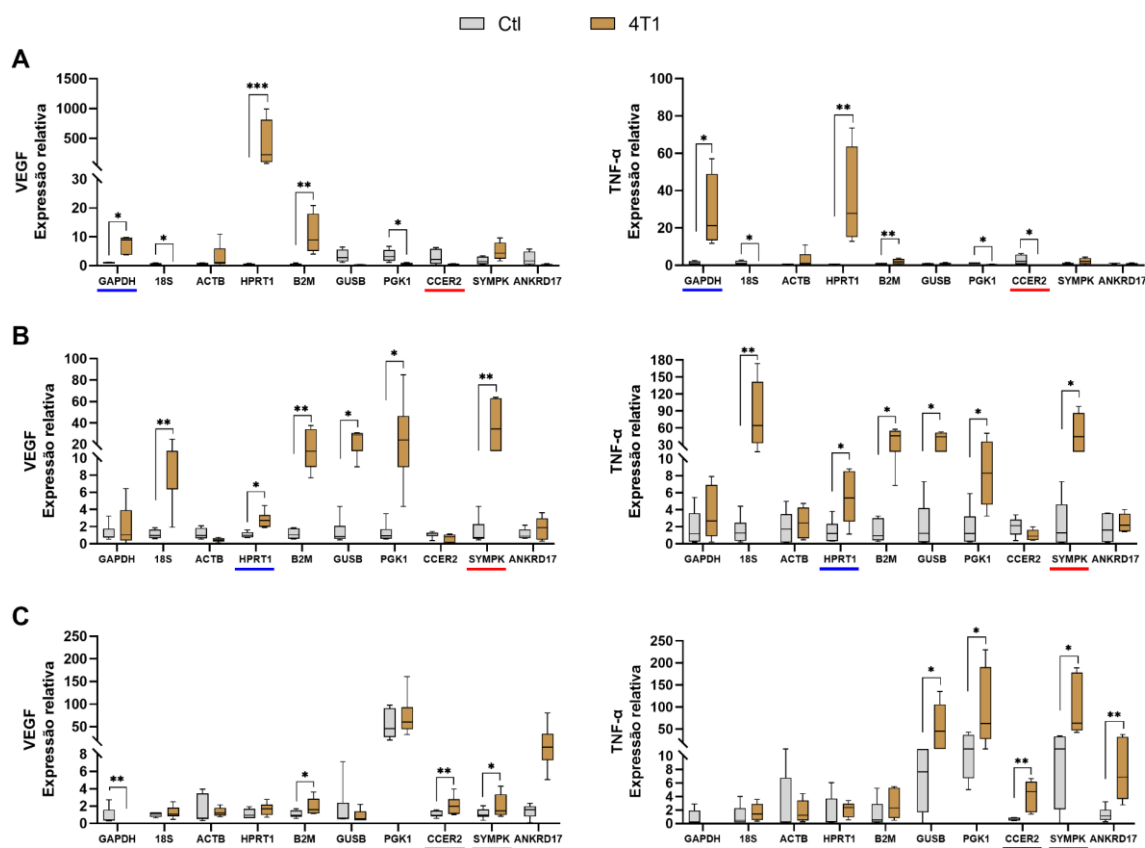


Figura 29: Normalização da expressão de VEGF e TNF- utilizando diferentes genes referência candidatos em diferentes tecidos. A: Avaliação da expressão gênica de VEGF e TNF no tumor; B: Avaliação da expressão gênica de VEGF e TNF no fígado; C: Avaliação da expressão gênica de VEGF e TNF no pulmão. O teste-t foi utilizado para avaliação de diferenças entre os grupos. Diferenças significativas são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Dados não significativos não foram mostrados. Sinalização azul indica o gene escolhido como mais estável para normalização no respectivo tecido, enquanto a sinalização vermelha indica o gene menos estável.

Fonte: Autoria própria.

7.9 Discussão

A padronização prévia de Housekeeping Genes (HKGs) para utilização em estudos envolvendo análise de expressão gênica é fundamental para minimizar a possibilidade de resultados imprecisos, já que a existência de um HKG universal que não varie entre os diferentes tratamentos experimentais é praticamente impossível (Razavi et al., 2019). Portanto, para condução das etapas posteriores deste trabalho, neste capítulo discutimos e padronizamos a utilização de HKG para análises de qPCR em diferentes órgãos afetados pela infecção de *A. suum* (**Anexo III**) e pela evolução do carcinoma de mama murino 4T1.

Destacamos que não foram encontrados estudos avaliando a estabilidade de HKGs em modelos de infecção por nematódeos em camundongos, incluindo a infecção por *A. suum*. Entretanto, em animais de produção, essa abordagem tem sido extensivamente estudada (Zaros et al., 2007; Bricarello et al., 2008; Regitano et al., 2008; Zaros et al., 2010; Toscano et al., 2018; Souza et al., 2023). Da mesma forma, no contexto de câncer de mama, a padronização de HKGs tem sido extensivamente estudada, tanto em amostras humanas (Majidzadeh-A et al., 2011; Jo et al., 2019) quanto em modelos experimentais (Shah and Faridi, 2011; Liu et al., 2015; Tilli et al., 2016; Jain et al., 2020; Gorji-Bahri et al., 2021), exceto no modelo *in vivo* 4T1. Apesar disso, a análise de expressão gênica por qPCR tem sido empregada tanto em estudos avaliando os impactos da infecção por *A. suum* (Gazzineli-Guimarães et al., 2019; Nogueira et al., 2021; Wu et al., 2021; Oliveira et al., 2024) quanto no modelo *in vivo* 4T1 (Chou et al., 2013; Kaplanov et al., 2019; Hou et al., 2023).

Dessa forma, nossos resultados demonstram que ambos os modelos influenciam na expressão de HKGs comumente utilizados para normalização de dados, incluindo a expressão em diferentes órgãos. Embora muitos dos trabalhos citados não tenham sido realizados no mesmo modelo que o nosso, nossos dados de variação de diferentes genes em diferentes órgãos corroboram com o observado em outros estudos (Toscano et al., 2018; Zhang et al., 2019; Fan et al., 2020; Jain et al., 2020; Gorji-Bahri et al., 2021; Coelho et al., 2022; Souza et al., 2023). Diferentes genes podem ser usados para normalização, incluindo os genes escolhidos para análise neste estudo, como GAPDH, 18S, ACTB, B2M e HPRT1 (Majidzadeh-A et al., 2011; Guo et al., 2012; Lu et al., 2013; Liu et al., 2015; Jain et al., 2020; Gorji-Bahri et al., 2021) para análises de infecção, e como o câncer é uma doença que impacta diferentes vias metabólicas, além desses genes, incluímos também a utilização de outros cinco, GUSB e PGK1 (Majidzadeh-A et al., 2011; Jain et al., 2020) e também incluímos CCSER2, SYMPK e

ANKRD17, descritos por ferramentas de bioinformática que se demonstraram potenciais candidatos para o uso como HKGs (Tilli et al., 2016).

Desses, o GAPDH, 18S e ACTB são os genes mais utilizados para normalização de dados de qPCR e são considerados genes universais por alguns autores (Bustin et al., 2002; Bustin et al., 2005; Lu et al., 2013). Todavia, a variabilidade desses genes em resposta a diferentes tratamentos experimentais já foi amplamente documentada (Al-Bader et al., 2005; Bricarello et al., 2008; Zaros et al., 2010; Pelleto et al., 2011; Sun et al., 2012), abrangendo desde modelos de infecções por nematóides (Zaros et al., 2010; Toscano et al., 2018; Souza et al., 2023) a estudos em modelos de câncer (Lyng et al., 2008; Jo et al., 2019). Esta variabilidade ressalta a importância de uma análise prévia de diferentes HKGs em diferentes contextos experimentais para garantir a confiabilidade e a precisão das análises de expressão gênica.

Em nosso trabalho, no modelo de infecção por *A. suum*, observamos que o GAPDH não foi uma opção adequada como HKG em nenhum dos tecidos analisados (fígado, pulmão, intestino delgado e grosso). Em contraste, ACTB foi classificado como melhor opção para normalização de dados de expressão no intestino grosso e 18S no pulmão e intestino delgado. No modelo de câncer, observamos o contrário, GAPDH foi listado como melhor opção no tumor primário, e observamos variabilidade na expressão de 18s e ACTB entre os grupos, conforme relatado em células MCF-7 e MDA-MB231 (Jain et al., 2020; Gorji-Bahri et al., 2021) e em amostras de fibroadenoma extraídas de humanos (De Kok et al., 2005). Nossos dados corroboram com estudos realizados em amostras de carcinoma invasivo humano (Killic et al., 2014), incluindo amostras positivas para receptores de estrogênio e progesterona (Lyng et al., 2008; Jo et al., 2019).

Para os outros genes, observamos variabilidade na expressão tanto do B2M quanto o PGK1, sendo ineficazes em nosso estudo conforme relatado em outros trabalhos (Gur-Dedeoglu et al., 2009; Jain et al., 2020; Gorji-Bahri et al., 2021). Entretanto, destacamos o B2M como melhor opção para normalização dos dados de expressão no fígado no modelo de infecção por *A. suum*, assim como pontuado em alguns estudos (Matsuzaki et al., 2015). Controversamente, alguns autores destacam que o B2M não é a melhor opção para normalização de genes no fígado (Wang et al., 2010; Zhai et al., 2013; Hildyard et al., 2019; Chen et al., 2020; Ho et al., 2021), o que corrobora com os nossos resultados do modelo 4T1. Da mesma forma, observamos que a expressão de GUSB variou entre grupos em todos os órgãos analisados nos diferentes modelos, consistente com outros achados (McNeill et al., 2007; Lyng et al., 2008).

Apesar da variabilidade na expressão de HPRT1 em diferentes tecidos no modelo de infecção por *A. suum*, nossos resultados sugerem que o HPRT1 pode ser uma escolha ideal para normalização no fígado no modelo 4T1, o que diverge de estudos anteriores em outros contextos experimentais (Liu et al., 2015; De Kok et al., 2005). Dado que muitos estudos não exploraram metástases em vários órgãos, acreditamos que esta seja a primeira documentação do HPRT1 como uma opção viável para análises de expressão gênica no fígado afetado por metástases do modelo 4T1. No entanto, investigações adicionais são necessárias para avaliar a aplicabilidade do HPRT1 na avaliação de metástases hepáticas utilizando outros modelos celulares.

Além dos genes já citados, para os estudos no modelo 4T1, avaliamos a expressão de CCSER2, ANKRD17 e SYMPK, conforme documentado por ferramentas de bioinformática como potenciais candidatos a HKGs (Tilli et al., 2016). Entretanto, no modelo 4T1, observamos significativa variação na estabilidade desses HKGs entre os diferentes órgãos analisados. Tanto ANKRD17 quanto SYMPK foram identificados como os genes menos estáveis em todos os tecidos examinados, enquanto CCSER2 foi considerado ideal apenas no pulmão. Esses resultados diferem de estudos anteriores realizados em *in silico* que sugerem o uso do CCSER2, ANKRD17 e SYMPK como fortes candidatos a HKGs em estudos de câncer de mama (Tilli et al., 2016). Curiosamente, encontramos apenas um estudo avaliando a expressão de CCSER2 em células MCF-7, que se mostrou eficaz juntamente com o uso de GAPDH (Jain et al., 2020). No entanto, não encontramos estudos que avaliaram ANKRD17 e SYMPK, destacando a necessidade de mais pesquisas nesse campo.

Observamos que a variabilidade nos resultados de expressão de diferentes HKGs em modelos de câncer de mama se correlaciona com a diversidade fenotípica de vários tipos e modelos celulares (Shah; Faridi, 2011). Além disso, também destacamos que a infecção por *A. suum* promove diversos danos associados ao parênquima e induz diferentes mecanismos de reparo (Nogueira et al., 2016; Gazzinelli-Guimarães et al., 2021), o que acreditamos influenciar na expressão de diferentes HKGs em diferentes tecidos. Dessa forma, consideramos que a avaliação de HKGs deve sempre ser realizada e relatada de acordo com as diferentes condições experimentais, como testes de novos medicamentos, infecção em modelos experimentais, utilização de diferentes quantidades e tipos celulares, uma vez que o câncer pode influenciar a expressão de diferentes HKGs e comprometer as análises de expressão gênica (Zhao et al., 2018; Razavi et al., 2019) e, como observamos em nossos estudos e em outros, a infecção por *A. suum* também influencia nesses resultados.

Por fim, destacamos que esta etapa foi essencial para padronização do modelo 4T1 quanto à evolução do tumor, aspectos clínicos e presença de metástases. Apesar do uso generalizado do modelo de carcinoma de mama 4T1, uma observação notável é a falta de padronização quanto ao ponto de coleta para experimentos envolvendo metástases (Bailey-Downs et al., 2014). Além disso, também observamos diferentes formas de utilização do modelo, quanto a quantidade de células injetadas e área de aplicação. Essa variabilidade nos protocolos experimentais pode dificultar a interpretação e discussão entre resultados de diferentes estudos. Acreditamos que a padronização para estudos envolvendo metástase seja crucial para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade nos resultados da pesquisa usando este modelo.

Assim, antecedendo a avaliação dos HKGs no modelo 4T1, avaliamos o ponto ideal para a coleta de órgãos para garantir a presença de metástases nos diferentes órgãos. Nossos resultados de metástases hepáticas diferiram de estudos anteriores, onde evidências demonstram surgimento em número limitado de animais aos 28 dias após a inoculação de células (Aslakson et al., 1992) e em alguns estudos de 20 dias (Bailey-Downs et al., 2014; Franco et al., 2019), enquanto observamos em nosso estudo em todos os animais do grupo aos 14 dias. Em comparação, encontramos apenas um estudo que relatou a presença de metástases pulmonares e hepáticas no 8º dia, sendo as metástases hepáticas mais intensas que as metástases pulmonares (DuPré et al., 2007). Ressaltamos que foram encontrados poucos estudos de metástases hepáticas comparadas às pulmonares.

Numerosos estudos relataram a presença de metástases pulmonares utilizando o modelo 4T1 a partir de 20 dias (Wenzel et al., 2010; Kim et al., 2011; Reis et al., 2019; Franco et al., 2019). Os resultados que observamos são muito semelhantes aos documentados em estudos anteriores, nos quais metástases pulmonares foram detectadas 21 dias após a injeção de células. Além do envolvimento pulmonar, foram relatados casos de metástases cerebrais seis semanas após a inoculação (Tao et al., 2008; Bailey-Downs et al., 2014), contrastando com nossos achados, onde não detectamos metástases no cérebro. Notamos que a determinação de um ponto de coleta varia de acordo com o número de células injetadas (Pulaski e Ostrand-Rosenberg, 1998; Muraoka et al., 2002; Ma et al., 2010; Kim et al., 2011) e área de aplicação (Bailey-Downs et al., 2014; Tabariès et al., 2015; Kocatürk e Versteeg, 2015; Reis et al., 2019; Franco et al., 2019). Em nosso estudo, injetamos células no flanco conforme feito em outros estudos (Reis et al. 2019; Franco et al., 2019; Reis et al., 2021; Abdel-Salam et al., 2021), e usamos 1×10^6 células conforme Gao et al. (2011). Nossos resultados somam-se aos observados por

outros estudos que empregam a mesma metodologia (Reis et al., 2019; Franco et al., 2019; Reis et al., 2021; Abdel-Salam et al., 2021) e sugerem que a quantidade de células ou área de injeção pode não ser eficiente para estudar a evolução da metástase cerebral em 4T1. No entanto, mais investigações são necessárias para essa validação.

Adicionalmente, além da histopatologia, também aplicamos uma ferramenta utilizando radioisótopos para monitorar a progressão tumoral e áreas metastáticas que ainda não foram utilizadas no modelo *in vivo* 4T1. Para isso, utilizamos o peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ radiomarcado com ^{99m}Tc para rastrear áreas de metástase, metodologia já utilizada em outros modelos de câncer, como o de próstata (Fuscaldi et al., 2014; 2015), tumor de Ehrlich (Barros et al., 2010) e modelo de câncer de mama MDA-MB-231 (Barros et al., 2012), mas ainda não relatado no modelo 4T1. As ferramentas de diagnóstico por imagem para monitoramento de metástases no modelo 4T1 têm sido utilizadas, principalmente com células 4T1 bioluminescentes (Hiraga et al., 2004; Smith et al., 2004; Tao et al., 2008) e com radiomarcagem em outros fármacos utilizando ^{99m}Tc (Tesan et al., 2019; Ekinci et al., 2023). Nossos achados ressaltaram a eficácia promissora desse peptídeo no modelo *in vivo* 4T1, particularmente no acompanhamento de metástases hepáticas, como evidenciado pela captura bem-sucedida de radiação em imagens cintilográficas. Além disso, os resultados da biodistribuição *ex vivo* foram consistentes com os achados histopatológicos em todos os órgãos.

7.10 Conclusão

Nesta parte do estudo, observamos que tanto a infecção por *A. suum* quanto a progressão do câncer no modelo 4T1 influenciam na expressão de genes comumente utilizados para normalização nos dados de expressão em qPCR. Também reforçamos que não há um gene referência comum para utilização em todos os tecidos. Nossos resultados ressaltam a importância crítica de selecionar genes de referência apropriados para normalização precisa em estudos de expressão gênica e a importância da validação prévia para experimentos que utilizam a técnica qPCR.

Para estudos envolvendo a infecção por *A. suum* definimos que o B2M foi o gene mais estável no fígado, 18S no pulmão e intestino delgado e ACTB no intestino grosso (**Figura 30**). Em estudos utilizando o modelo de carcinoma de mama murino 4T1, definimos que GAPDH foi o gene expresso mais estável no tumor primário, HPRT1 no fígado e CCSE2 no pulmão (**Figura 31**). Em contraste, a utilização de genes de referência estáveis aumenta a confiabilidade e validade das análises de expressão gênica, fornecendo uma descrição mais precisa dos fenômenos biológicos. Ao considerar a incorporação de genes alternativos, recomendamos a realização de testes comparativos para avaliar diretamente sua adequação, comparando com outros relatos em literatura.

Encorajamos fortemente a utilização desses genes específicos dentro de seus respectivos tecidos para a normalização dos dados de RT-qPCR em estudos envolvendo infecção por *A. suum* e estudos envolvendo a utilização do modelo de carcinoma de mama murino 4T1.

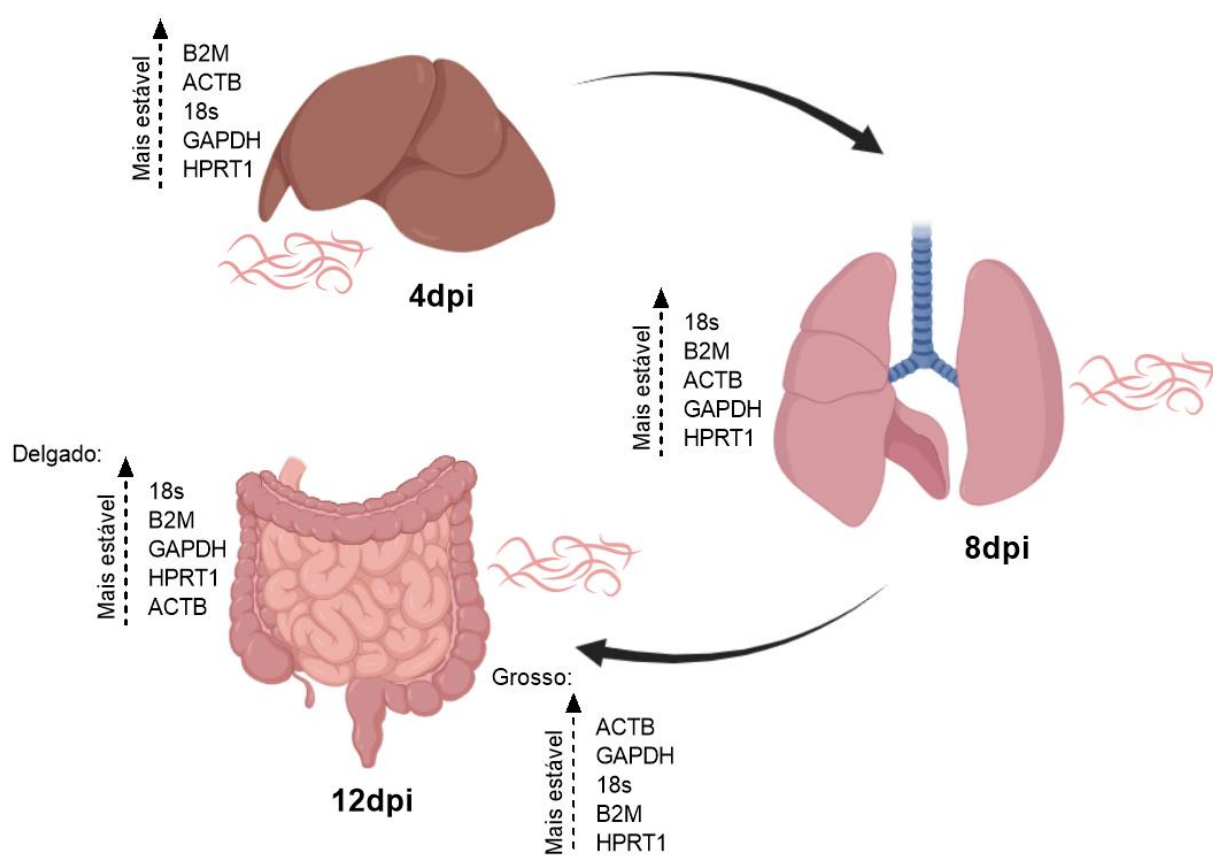
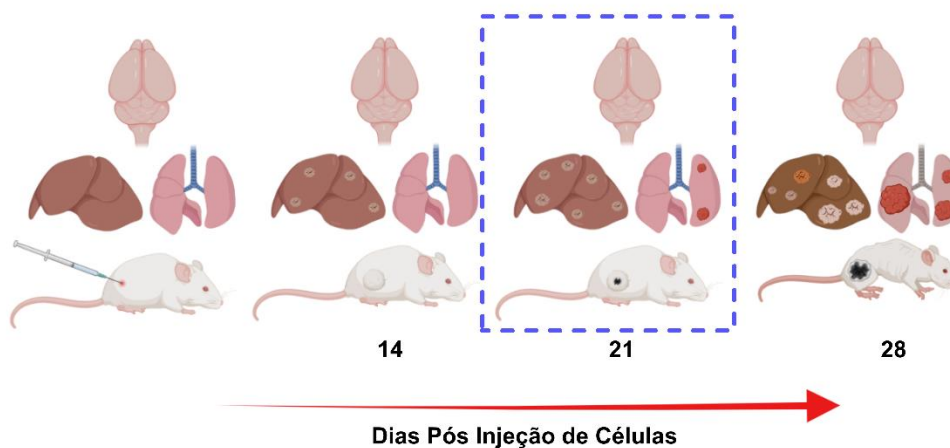


Figura 30: Principais resultados da primeira parte do capítulo I da avaliação dos genes referência em diferentes tecidos de camundongos BALB/c afetados pela migração de *A. suum*.

Fonte: Autoria própria.

1º passo:

*Estudo da evolução do carcinoma de mama 4T1
Escolha do melhor ponto de coleta dos tecidos*

**2º passo:**

Avaliação do Housekeeping gene mais estável no tumor primário e nos tecidos afetados por metástases



Figura 31: Principais resultados da segunda parte do capítulo I da avaliação dos genes referência em diferentes tecidos de camundongos BALB/c afetados pela dinâmica de desenvolvimento do carcinoma de mama murino 4T1. 1º Passo representa a evolução do tumor para escolha do melhor ponto de coleta, observou-se que, aos 28 dias, os camundongos apresentavam sinais intensos de dor, além de ausência de metástases no cérebro, mas com presença no fígado e pulmões da mesma forma que aos 21 dias, só que com menor intensidade. Dessa forma, optou-se por realizar os estudos no 21º dia, com o objetivo de minimizar o sofrimento dos animais, como destacado em azul.

Fonte: Autoria própria.

CAPÍTULO II

Avaliação da persistência dos danos teciduais e estudo da inflamação crônica resultantes da infecção por *A. suum* em função da dose infecciosa e frequência de exposições

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 Delineamento experimental

O segundo capítulo deste trabalho visou caracterizar e descrever os aspectos imunoparasitológicos e fisiopatológicos da inflamação crônica da ascaridose larval na primoinfecção (única exposição) e na reinfecção (duas exposições) ao *A. suum* em diferentes doses de ovos totalmente embrionados (250, 1250 e 2500), os quais foram utilizados no modelo de indução do câncer de mama. Para isso, 172 camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade foram divididos nos seguintes grupos: grupo não infectado (**NI**), composto por animais não infectados e que receberam água filtrada; grupo primoinfectado (**PI**), os quais receberam uma única dose contendo ovos totalmente larvados de *A. suum*, sendo o **PI 250**, grupo que recebeu dose de 250 ovos totalmente larvados; **PI 1250**, recebeu dose de 1.250 ovos totalmente larvados e **PI 2500** que recebeu dose de 2.500 ovos totalmente larvados; grupo reinfestado (**RE**), os quais receberam duas doses de ovos totalmente larvados de *A. suum*, com intervalo de 14 dias, sendo o **RE 250**, grupo que recebeu doses de 250 ovos totalmente larvados, **RE 1.250** que recebeu doses de 1250 ovos totalmente larvados e **RE 2.500**, recebeu doses de 2500 ovos totalmente larvados. Os animais do grupo **PI** foram infectados com oito semanas de idade, conforme padronizado por Gazzineli-Guimarães et al., (2013) e Nogueira et al., (2016) e os do grupo **RE** foram infectados com seis semanas (**Figura 32**). Aos 35 dias pós infecção (dpi) (n=86, n=8 por grupo ou n=6 por grupo para PCR) e 100dpi (n=86, n=8 por grupo ou n=6 por grupo para PCR), os animais foram eutanasiados para as respectivas análises.

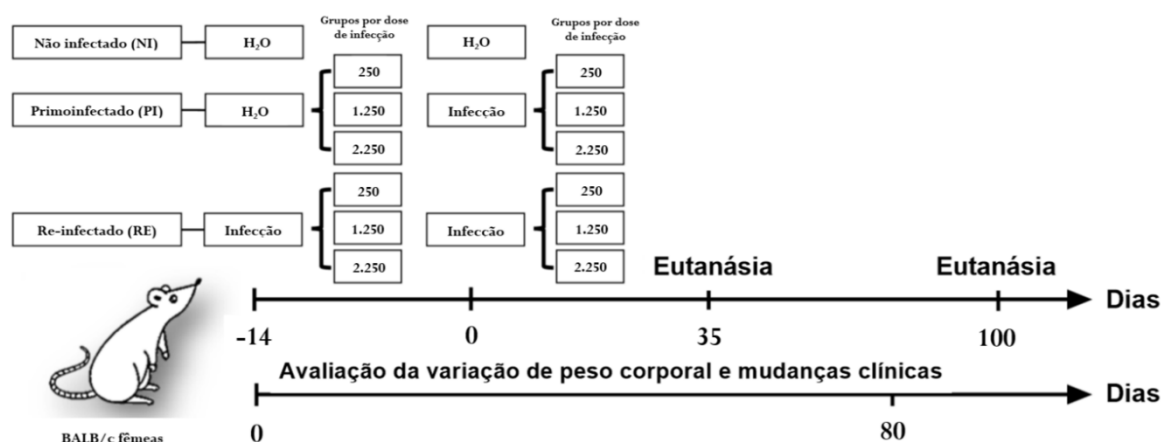


Figura 32: Delineamento experimental do capítulo II para os estudos de pulmão. Camundongos BALB/c com seis semanas de idade foram divididos em três grupos, sendo um não infectado (NI), um primoinfectado (PI), que é infectado uma única vez por três diferentes doses de ovos larvados de *A. suum*, e um grupo reinfestado (RE), que recebe duas vezes três diferentes doses de ovos larvados de *A. suum* com intervalo de 14 dias e a eutanásia foi

realizada aos 35dpi (n=86, 8 por grupo) e 100dpi (n=86, 8 por grupo) contadas a partir do ponto 0 conforme ilustrado na figura.

Fonte: Autoria própria.

Para a segunda parte do capítulo envolvendo os estudos de fígado, e de acordo com os resultados obtidos dos dados de pulmão, optamos por trabalhar apenas com as doses de 250 e 2500 ovos. Para isso, 158 camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade foram divididos nos seguintes grupos: grupo não infectado (**NI**), composto por animais não infectados e que receberam água filtrada; grupo primoinfectado (**PI**), os quais receberam uma única dose contendo ovos totalmente larvados de *A. suum*, sendo o **PI 250**, grupo que recebeu dose de 250 ovos totalmente larvados e **PI 2500** que recebeu dose de 2.500 ovos totalmente larvados; grupo reinfectado (**RE**), os quais receberam duas doses de ovos totalmente larvados de *A. suum*, com intervalo de 14 dias, sendo o **RE 250**, grupo que recebeu doses de 250 ovos totalmente larvados e **RE 2.500**, recebeu doses de 2500 ovos totalmente larvados. Os animais do grupo **PI** foram infectados com oito semanas de idade, conforme padronizado por Gazzineli-Guimarães et al., (2013) e Nogueira et al., (2016) e os do grupo **RE** foram infectados com seis semanas (**Figura 33**). Aos 35 dias pós infecção (dpi) (n=70, n=8 por grupo ou n=6 por grupo para PCR) e 100dpi (n=56, n=8 por grupo ou n=6 por grupo para PCR), os animais foram eutanasiados para as respectivas análises. Além disso, 32 animais foram usados para as análises de carga parasitária aos 4dpi divididos entre **PI/RE 250 e 2500 (Figura 33)**

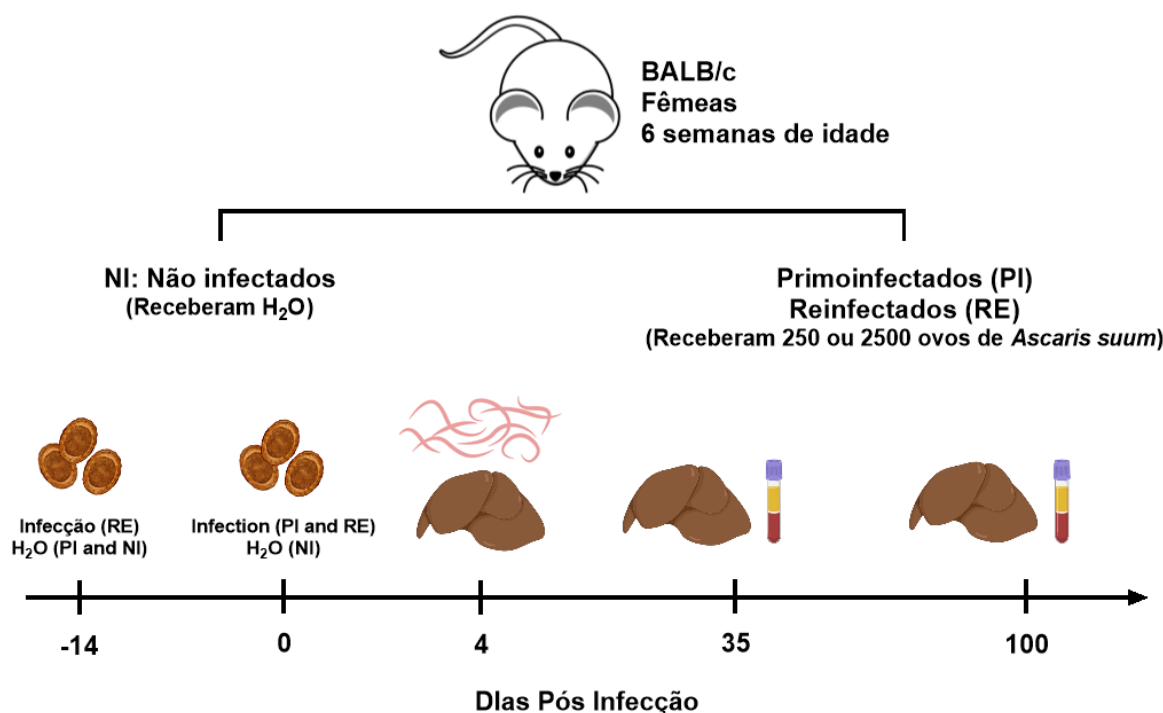


Figura 33: Delineamento experimental do capítulo II para os estudos de fígado. Camundongos BALB/c com seis semanas de idade foram divididos em três grupos, sendo um não infectado (NI), um primoinfectado (PI), que é infectado uma única vez por duas diferentes doses de ovos larvados de *A. suum*, e um grupo reinfectado (RE), que recebe duas vezes duas diferentes doses de ovos larvados de *A. suum* com intervalo de 14 dias e a eutanásia foi realizada aos 4dpi (n=32, n=8 por grupo), 35dpi (n=70, n=8 por grupo ou n=6 por grupo para PCR) e 100dpi (n=56, n=8 por grupo ou n=6 por grupo para PCR) contadas a partir do ponto 0 conforme ilustrado na figura.

Fonte: Autoria própria.

Os pontos de infecção seguindo o intervalo de 14 dias foram feitos de acordo com Gazzinelli-Guimarães et al., (2013) e Nogueira et al., (2016), os quais demonstraram que tanto em cenário de uma única exposição quanto em reinfecção, após esse tempo, não são encontradas larvas nos órgãos dos camundongos, ficando apenas os mecanismos imunopatológicos resultantes dos danos causados pela migração das larvas. Vale destacar que os pontos de coleta foram ajustados seguindo a padronização com o modelo de câncer que leva em consideração a idade do camundongo para indução (10 a 11 semanas) e em média a eutanásia ocorrendo entre 21 e 28 dias após a indução, conforme demonstrado por Reis et al., (2019) e padronizado previamente neste trabalho, o que totaliza 35 dias após a última infecção do *A. suum*. A escolha da eutanásia com 100 dpi justifica-se pela necessidade de entender por quanto tempo o microambiente inflamatório nos órgãos causado pela infecção pelo parasito pode persistir no hospedeiro e gerar o desfecho para a exploração realizada neste trabalho.

8.2 Recuperação de larvas de *A. suum* nos tecidos

Esta etapa foi realizada para avaliação da carga parasitária nos tecidos dos animais infectados com diferentes doses de infecção. Para isso, os animais foram eutanasiados utilizando cetamina (225 mg/kg) e xilazina (27 mg/kg) via intraperitoneal nos dias correspondentes ao pico da migração de larvas (4 e 8dpi), conforme descrito no item 8.1, para coleta do fígado e pulmões. Após a eutanásia, os tecidos foram coletados, extensivamente picotados com tesoura cirúrgica e colocados em aparato de Baermann-Moraes modificado com PBS e incubados por 4 horas a 37°C conforme descrito por Gazzinelli-Guimarães et al., 2013. Após a incubação, o sedimento foi coletado com pipeta Pasteur e transferidos para tubos cônicos de 15mL, os quais foram submetidos à centrifugação a 800 g, por 10 minutos a T.A. Os sobrenadantes foram reduzidos a aproximadamente 2mL e ressuspensos em 10mL de solução tamponada de formaldeído a 4% e armazenados para posterior contagem em microscopia de luz. Para a contagem, os tubos foram centrifugados a 800 g, por 10 minutos a T.A. e os sobrenadantes foram reduzidos para 2 mL e todo conteúdo foi utilizado para contagem total das larvas recuperadas.

8.3 Procedimentos com biologia molecular

Para o delineamento dos iniciadores as sequências específicas de nucleotídeos de camundongos foram obtidas a partir das sequências disponíveis no NCBI. Em seguida, utilizamos a ferramenta on-line Primer 3 Input (Version 4.1.0) (<https://primer3.ut.ee/>) para projetar as sequências de iniciadores assim como abordado no capítulo I. Foram delineadas sequências para os genes que codificam a produção de citocinas no fígado (IL-12/40, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10 e TGF- β) para avaliação da expressão aos 35dpi e aos 100dpi (**Tabela 14**).

Além disso, também investigamos se os achados em camundongos C57BL/6 utilizados na padronização inicial deste trabalho eram reprodutíveis nos camundongos BALB/c da mesma forma que foi feita no capítulo I, só que aqui utilizamos apenas o fígado dos animais conforme estabelecido no capítulo I por meio da análise dos diferentes *softwares*.

Tabela 14: Iniciadores, sequências e características do amplicon e número de acesso na base de dados dos iniciadores utilizados na PCR para avaliação da expressão gênica. pb – pares de bases.

GENE	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	TAMANHO DO AMPLICON (PB)	NCBI ACCESSION NUMBER
IFN- γ	F: GCGTCATTGAATCACACCTG R: TGAGCTCATTGAATGCTTGG	129pb	NM_008337.4
IL-12/p40	F: TCTTCTGCTTGTTGGCTTT R: CTCTGCGGGCATTTAACATT	90pb	NM_001303244.1
IL-1 β	F: CAGGCAGGCAGTATCACTCA R: AGGTGCTCATGTCCTCATCC	95pb	NM_008361.4
IL-4	F: CCAAGGTGCTTCGCATATTT R: ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT	105pb	NM_021283.2
IL-5	F: CACCAGCTATGCATTGGAGA R: TCCTCGCCACACTTCTCTTT	146pb	NM_010558.1
IL-6	F: CCGGAGAGGAGACTTCACAG R: TCCACGATTTCCCAGAGAAC	102pb	NM_031168.2
IL-13	F: CAGCATGGTATGGAGTGTGG R: AGGCCATGCAATATCCTCTG	117pb	NM_008355.3
IL-17	F: TTCAGGGTCGAGAAGATGCT R: AAACGTGGGGGTTTCTTAGG	112pb	NM_010552.3
IL-10	F: CCAGGGAGATCCTTTGATGA R: AACTGGCCACAGTTTTCAGG	96pb	NM_010548.2
TGF- β	F: GACTCTCCACCTGCAAGACC R: GACTGGCGAGCCTTAGTTTG	99pb	NM_011577.2

Fonte: Autoria própria.

8.4 Resultados

8.4.1 A infecção por *Ascaris suum* desencadeia inflamação pulmonar persistente, anemia e doença pulmonar obstrutiva crônica dose-dependente de ovos em camundongos primo e reinfectedos

Dada a escassez de trabalhos que avaliam aspectos imunológicos e fisiopatológicos decorrentes dos danos causados pela infecção por *A. suum* tempos após a migração de larvas em modelo experimental, um estudo preliminar foi conduzido para aprofundar nossa compreensão dos mecanismos do hospedeiro infectado e avaliar o cenário imunológico presente. Esse estudo foi fundamental por permitir uma análise mais aprofundada dos efeitos da inflamação induzida por *A. suum* e seu impacto na progressão do carcinoma de mama murino 4T1, abordado nos próximos capítulos. Os resultados apresentados nesta parte do capítulo focaram nos achados relacionados ao pulmão e resultaram em um trabalho que foi submetido na revista **Heliyon** sob o título ***Single and re-infection with Ascaris suum triggers anemia, persistent inflammation, and chronic pulmonary disease in a dose-dependent manner*** (Apendice).

8.4.2 Impacto da dose de ovos e frequência de exposições na dinâmica do peso e manifestações clínicas na ascarirose larval

Existem poucos trabalhos que exploram a fisiopatologia da infecção por *A. suum* em fases tardias após o pico da migração larval, e mesmo os disponíveis, utilizam uma dose alta de ovos (2500), a qual não reflete adequadamente a realidade da infecção natural. Essa lacuna destaca a necessidade de mais informações. Portanto, procuramos determinar os efeitos imunológicos e fisiopatológicos de diferentes doses de infecção (250, 1250 e 2500) e da frequência de exposições (única e reinfecção) tempos após o pico da migração larval.

Um dos primeiros passos foi avaliar a variação de massa corporal dos animais e os parâmetros clínicos ao longo de 80 dias após a primeira dose administrada em todos os grupos (**Figura 34; A-F**). Os resultados mostraram que os camundongos infectados com a dose alta de ovos (2500) tiveram perda abrupta da massa corporal entre 4º e 10º dia pós-infecção (dpi). Contudo, esses animais igualaram o ganho de massa corporal aos animais do grupo controle não infectado (NI) de forma mais rápida, tanto na primo-infecção quanto na reinfecção, quando comparados às demais doses de infecção (**Figura 34 A e B**).

Curiosamente, nos camundongos que receberam a metade dessa dose (1250 ovos), apenas o grupo reinfestado (RE 1250) perderam massa na fase aguda da infecção (**Figura 34 D**) enquanto os animais do grupo primoinfectado (PI 1250) PI e RE que receberam a dose de infecção mais baixa (250 ovos); a perda de massa durante a fase de migração das larvas não foi observada (**Figura 34; C-F**). Adicionalmente, observamos que nos camundongos desses grupos (PI e RE 250 e 1250) houve atraso no ganho de massa e levaram mais tempo para igualar a massa corpórea com camundongos do grupo NI (**Figura 34; C, D, E e F**). Na dose intermediária no grupo primoinfectado (PI 1250), o retardo no ganho de massa persistiu até o 24º dia, se igualando com grupo NI a partir do 48º dia, onde permaneceu constante (**Figura 34 C**), enquanto no grupo reinfestado (RI 1250), a diferença de massa foi observada no 6º dia e iniciaram a retomada de ganho no 12º dia. Entretanto, a massa corpórea se igualou ao grupo NI no 54º dia (**Figura 34 D**). Em contraste, os grupos que receberam as menores cargas de ovos tiveram o atraso mais prolongado no ganho de massa, sendo observado partir do 28º dia (PI 250) e 10º dia (RE 250), onde os camundongos se igualaram ao grupo NI no 66º dia (PI) e 54º dia (RE) (**Figura 34 E e F**).

Além disso, as alterações clínicas foram mais visíveis nos grupos que receberam doses altas e intermediárias de infecção (2500 e 1250). Observamos alterações a partir do 6º dpi e persistiram até o 12º dia para ambos os grupos (PI e RE) (**Figura 34 G e H**). Nos grupos RE, não foram observadas alterações nos camundongos que receberam 1250 ovos, diferente dos animais que receberam 2500 ovos, os quais observamos o aparecimento de sintomas a partir do 6º dia após a segunda exposição até o 10º dpi (**Figura 34 H**). Esses resultados sugerem uma dinâmica distinta na recuperação de massa corporal, influenciada pelas diferentes doses de infecção e pelo histórico de exposições.

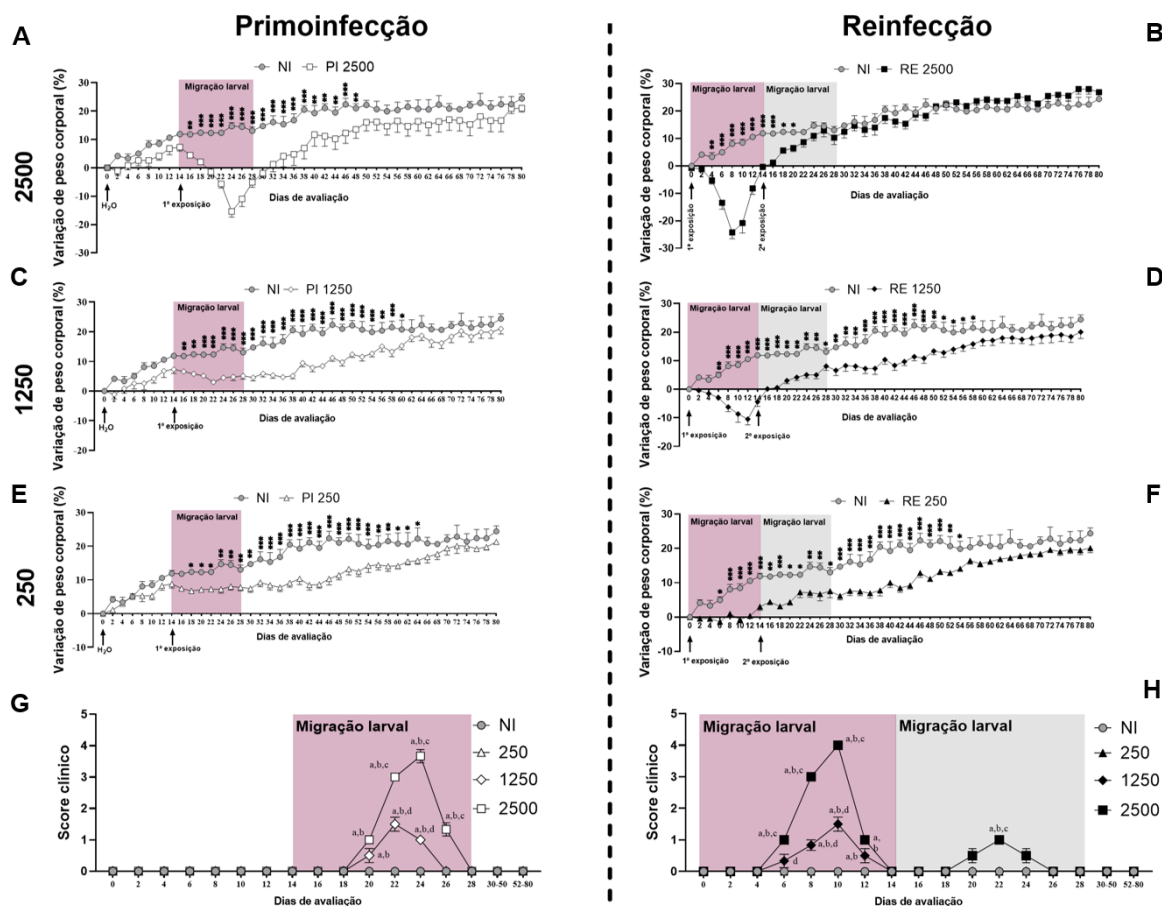


Figura 34: Aspectos clínicos da infecção por *A. suum* em camundongos BALB/c infectados com diferentes doses de ovos e frequência de exposição. (A-F) Variação de massa corporal em relação à massa no dia 0, expressa em porcentagem após a primeira exposição aos ovos de *A. suum*. (G e H) Avaliação do score clínico ao longo de 80 dias. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (S.E.M.). Para as análises estatísticas foram utilizados múltiplos testes-t para avaliar variações da massa corporal ao longo de 80 dias (A-F). Foram utilizados o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, para avaliar variações nos sinais clínicos (G e H). Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos são representados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ou (a) representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) com o grupo NI, (b) grupo 250, (c) grupo 1250 e (d) grupo 2500. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.4.3 Doses intermediárias e mais baixas de ovos de *A. suum* causam anemia persistente e aumento de leucócitos em camundongos primoinfectados

Após observar que a dinâmica da infecção varia com a dose de infecção e a frequência de exposições, investigamos como as doses influenciam no número de larvas que chegam aos pulmões. Para isso, os camundongos foram eutanasiados para coleta do pulmão e do BAL para contagem de larvas aos 8 dpi, correspondendo ao pico de migração larval (Gazzineli-Guimarães et al., 2013). No grupo PI, os camundongos infectados com 2500 ovos foram recuperadas uma média de 200 larvas que chegaram aos pulmões, enquanto na infecção com 1250 e 250 ovos

tiveram menos larvas (uma média de 100 e 5, respectivamente) (**Figura 35**). Em contraste, em uma segunda exposição, houve uma redução significativa no número de larvas em todos os grupos, com reduções de 96,94%, 96,97% e 85,71% para as doses de 2.500, 1.250 e 250 na reinfecção, respectivamente (**Figura 35**)

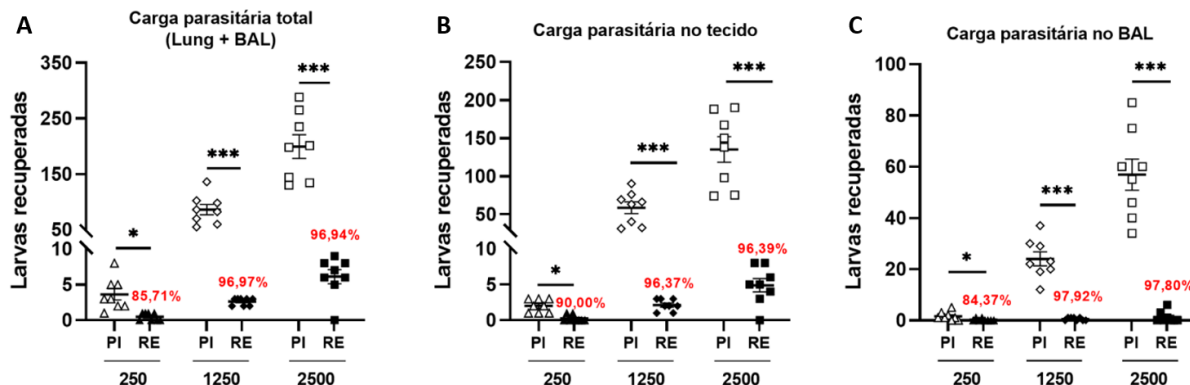


Figura 35: Larvas recuperadas no pulmão dos animais aos 8dpi. (A) Número total de larvas recuperadas do Pulmão e das vias aéreas (BAL); (B) Número de larvas recuperadas do tecido; (C) Número de larvas recuperadas das vias aéreas (BAL). Os resultados são expressos em média $\pm$ SEM. Os valores vermelhos em A indicam uma redução (%) nas larvas em comparação com a primeira exposição, e um teste T foi usado para avaliar as diferenças entre os grupos ($n=8$ por grupo). As diferenças estatísticas são representadas por um asterisco, onde * sem a barra representa diferenças com o grupo NI e as diferenças entre a quantidade de exposição (SI x RE) na respectiva dose são representadas por asterisco com barra onde $p < 0,05$, * $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Autoria própria.

Em seguida, avaliamos possíveis alterações hematológicas para identificar danos sistêmicos. Na avaliação do hemograma, observamos a presença de anemia nos camundongos PI 250 e 1250 por meio da dosagem de hemoglobina (**Figura 36 A**) e hematócrito (**Figura 36 B**) aos 35 dpi. Além disso, os índices hematimétricos como Volume Corpuscular Médio (VCM) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), confirmaram a anemia microcítica e hipocrômica (**Figura 36 C e D**). Essas alterações não foram observadas nos grupos RE 250, 1250 e 2500 e no grupo PI 2500. Embora a presença de anemia nos grupos PI 250 e 1250 aos 35 dpi, observamos que aos 100 dpi ocorre recuperação completa do quadro (**Figura 36 E e F**). Os dados de recuperação desta condição coincidem com os tempos observados nas análises de variação da massa corporal (**Figura 36 C-F**). Os camundongos do grupo PI 2500 permaneceram com níveis de hemoglobina e hematócrito semelhantes ao grupo NI, incluindo os 100 dpi (**Figura 36 E e F**), independente da dose de infecção. Os camundongos dos grupos RE, permaneceram com os níveis de hemoglobina e hematócrito aos 100 dpi sem variação em comparação com o grupo NI e ao observado aos 35dpi (dados não mostrados).

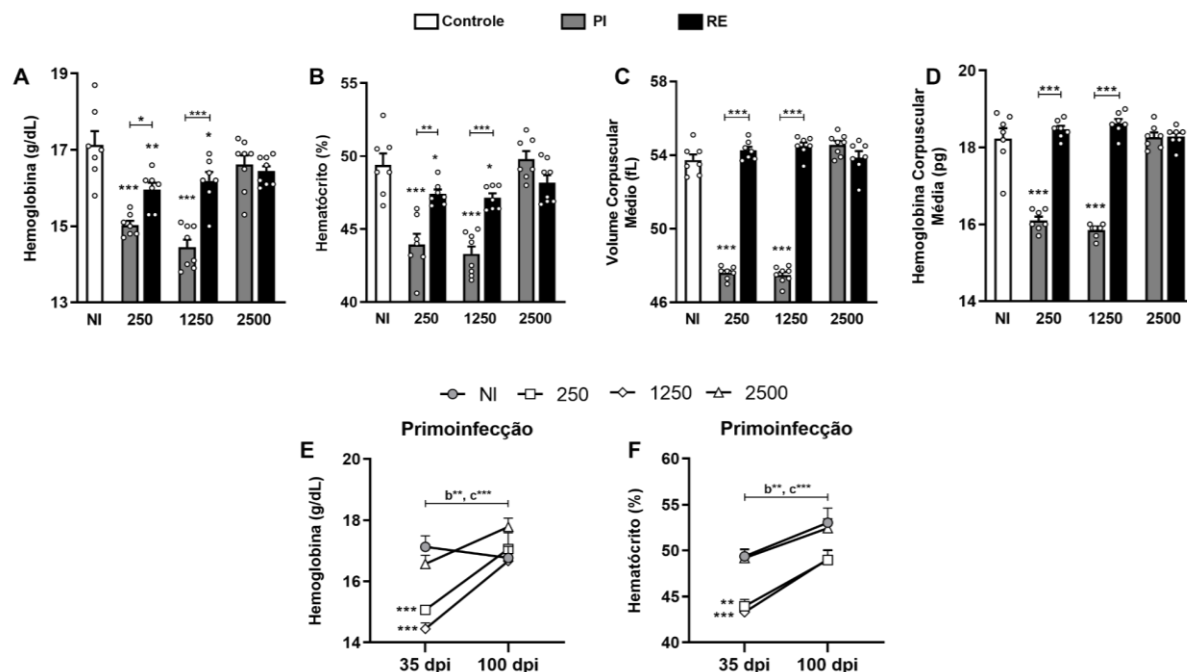


Figura 36: Análise hematológica entre grupos de camundongos BALB/c infectados por *A. suum* em diferentes doses de ovos e frequência de exposições aos 35 dpi e 100 dpi. (A) Dosagem de hemoglobina de acordo com diferentes doses nos grupos PI e RE 35dpi (B) Determinação de hematócrito de acordo com diferentes doses nos grupos PI e RE 35 dpi. (C) Cálculo do volume corpuscular médio de acordo com diferentes doses nos grupos PI e RE 35 dpi. (D) Cálculo da hemoglobina corpuscular média de acordo com diferentes doses nos grupos PI e RE 35 dpi. (E) Variação da dosagem de hemoglobina de acordo com diferentes doses nos grupos PI aos 35 dpi e 100 dpi. (F) Variação da determinação do hematócrito de acordo com diferentes doses nos grupos PI aos 35 dpi e 100 dpi. Dados apresentados em média ± SEM. Para as análises estatísticas o teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, foram usados para avaliar diferenças entre os grupos NI, PI e RE em cada dose nos gráficos A, B, C e D e para avaliar diferenças entre os grupos em 35 dpi e 100 dpi de acordo com a dose administrada em E e F. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre dois grupos com a mesma dose de infecção, representado pelo asterisco com barra nos gráficos A, B, C e D. Nos gráficos E e F o asterisco sem barra representa diferenças entre a dose administrada e o grupo NI no mesmo tempo da infecção, e o asterisco com barra representa diferenças entre as mesmas doses em 35dpi e 100dpi. (a) grupo NI, (b) grupo 250, (c) grupo 1250 e (d) grupo 2500. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Além de analisar as alterações hematológicas, avaliamos o perfil leucocitário no sangue periférico dos grupos aos 35dpi. Foi observado que os animais dos grupos PI 250 e 1250 e o grupo RE 2500 apresentaram aumento dos leucócitos totais (**Figura 37**). Em contrapartida, os demais grupos não apresentaram alterações. Em relação à contagem diferencial, foi observado aumento no número de eosinófilos em todos os grupos infectados, independente da dose, porém, diferenças entre os grupos PI e RE foram observadas na dose mais baixa (250) sendo o grupo PI com eosinofilia mais intensa (**Figura 37**). Os neutrófilos estavam aumentados apenas nos grupos PI com a dose mais baixa e intermediária (250 e 1250), enquanto os linfócitos

aumentaram apenas no grupo PI 1250, e os monócitos aumentaram nos grupos RE 250 e PI 1250 (Figura 37). A contagem de leucócitos totais aos 100 dpi exibiu valores normais e nivelados ao grupo NI tanto nos grupos PI e RE (dados não mostrados).

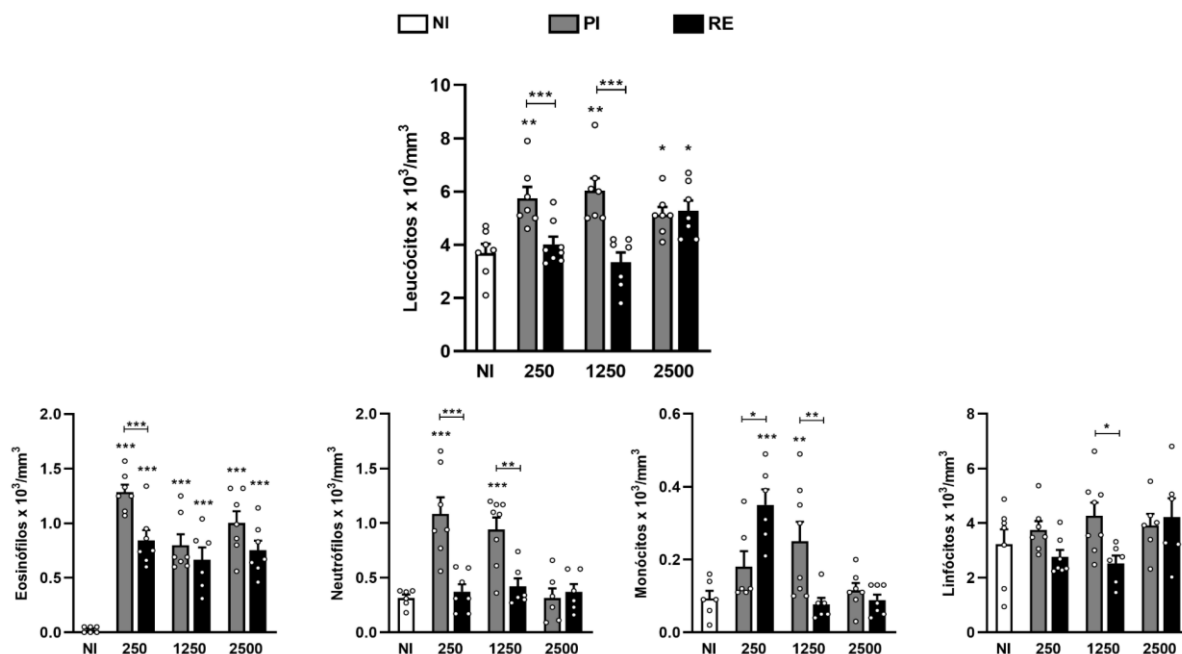


Figura 37: Contagem total e diferencial de leucócitos aos 35 dpi no sangue periférico de camundongos BALB/c infectados com *A. suum* em diferentes doses de ovos e quantidade de exposições. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, foram usados para avaliar diferenças entre os grupos NI, PI e RE em cada dose. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. A barra branca representa o grupo controle (NI), as barras cinza representam camundongos primoinfectados (PI) e as barras pretas representam camundongos reinfectados (RE). As diferenças entre cada grupo com controle NI é representado por asterisco sem barra, e entre dois grupos com a mesma dose de infecção, representado pelo asterisco com barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.4.4 Camundongos infectados apresentam hemorragia alveolar aos 35 dpi quando infectados com doses menores e intermediárias de ovos de *A. suum*

Devido a anemia observada nos camundongos infectados, juntamente com um atraso na recuperação dos grupos infectados com as doses de 250 e 1250 ovos, levantamos a hipótese de que nessas doses aos 35 dpi ainda ocorre hemorragia alveolar nos camundongos, como já observado no pico da infecção com 2500 ovos (Nogueira et al., 2016). Assim, o BAL aos 35 dpi evidenciamos o aumento de proteínas totais e hemoglobina (Figura 38 A e B) na mesma proporção nos camundongos do grupo PI 250 e 1250, o que foi correlacionado com o aumento de hemoglobina e proteínas totais (Figura 38 D), sendo um indicador de hemorragia nas vias

aéreas. Em contraste com estes resultados, a contagem de plaquetas nos grupos PI 250 e 1250 aumentou em comparação ao grupo NI e ao respectivo grupo RE que receberam as mesmas doses (**Figura 38 C**). Também avaliamos a presença de hemorragia alveolar nos grupos aos 100dpi e observamos que neste tempo os animais não apresentam alterações nos níveis de proteínas totais e hemoglobina, corroborando com os dados hematológicos (Dados não mostrados).

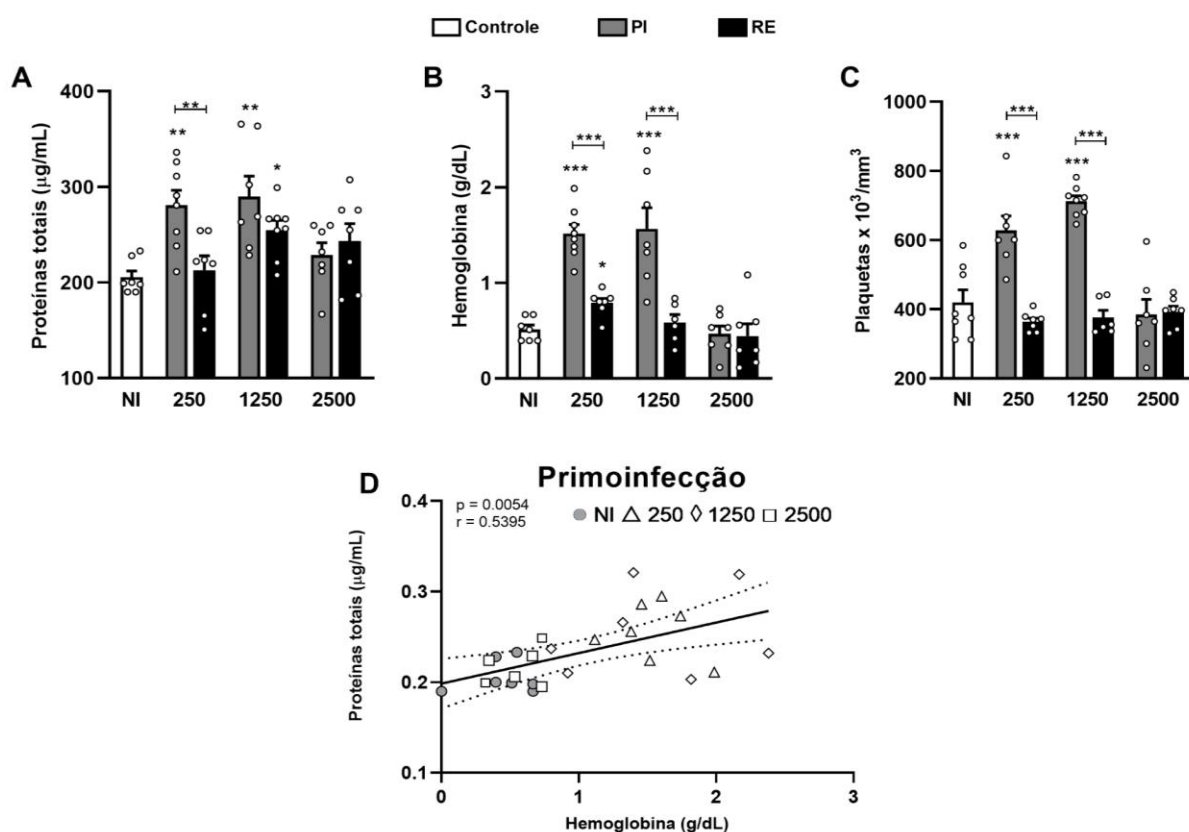


Figura 38: Padrão de hemorragia alveolar e contagem de plaquetas nos camundongos BALB/c infectados com *A. suum* em diferentes doses de ovos e frequência de exposições aos 35 dpi. (A) Dosagem de proteínas totais no BAL de acordo com diferentes doses nos grupos PI e RE aos 35dpi (B) Dosagem de hemoglobina no BAL de acordo com diferentes doses nos grupos PI e RE aos 35 dpi (C) Contagem de plaquetas no sangue periférico dos camundongos de acordo com diferentes doses nos grupos PI e RE aos 35 dpi (D) Correlação entre a dosagem de proteínas totais e hemoglobina no BAL dos camundongos dos grupos PI. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, foram usados para avaliar diferenças entre os grupos NI, PI e RE em cada dose nos gráficos A, B e C e para correlação foi realizado o teste de correlação de Pearson em D. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com controle NI é representado por asterisco sem barra, e entre dois grupos com a mesma dose de infecção, representado pelo asterisco com barra nos gráficos A, B e C. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Além disso, após observar o aumento na contagem global de leucócitos no sangue periférico e observar a presença de hemorragia alveolar nos camundongos aos 35 dpi, procedemos com a contagem de leucócitos no BAL nos tempos 35 e 100 dpi. De forma geral, observamos um aumento da celularidade no BAL nos grupos que receberam as maiores doses (1250 e 2500), tanto nos grupos PI quanto RE (**Figura 39 A**). Digno de nota, nesses grupos foram observados macrófagos com morfologia atípica tanto aos 35 quanto aos 100 dpi. Com base nas descrições de Wu et al. (2021), os diferenciamos como macrófagos carregados com grânulos de hemossiderina (**Figura 39 B**) e, devido ao processo hemorrágico observado, decidimos contabilizá-los. Nesse sentido, observamos aumento no número de macrófagos e macrófagos com grânulos de hemossiderina nos grupos 1250 e 2500 (**Figura 39 C e D**). Os eosinófilos estavam aumentados nos grupos que receberam as maiores doses de ovos, principalmente no grupo PI 1250 e RE 2500 (**Figura 39 E**). Os linfócitos aumentaram em todos os grupos, sem diferença entre PI e RE, que receberam 250 ovos, e em RE 1250 e PI 2500 (**Figura 39 F**) e os neutrófilos estavam aumentados nos grupos PI 1250 e 2500 (**Figura 39 G**).

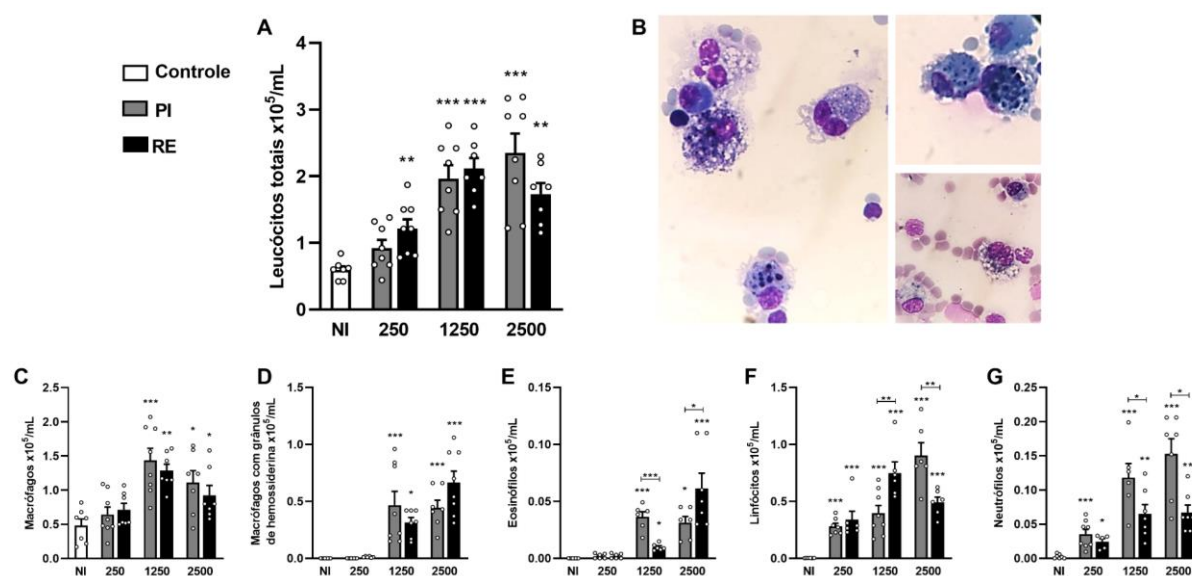


Figura 39: Contagem aos 35dpi de leucócitos totais e diferenciais no BAL de camundongos BALB/c infectados com *A. suum* em diferentes doses de ovos e frequência de exposições. (A) Contagem de leucócitos totais nos grupos PI e RE infectados com diferentes doses de ovos (B) Registro de macrófagos carregados com grânulos de hemossiderina (C) Contagem de macrófagos nos grupos PI e RE infectados com diferentes doses de ovos (D) Contagem diferencial de macrófagos carregados com grânulos de hemossiderina nos grupos PI e RE infectados com diferentes doses de ovos (E) Contagem de eosinófilos nos grupos PI e RE infectados com diferentes doses de ovos (F) Contagem de linfócitos nos grupos PI e RE infectados com diferentes doses de ovos (G) Contagem de neutrófilos nos grupos PI e RE infectados com diferentes doses de ovos. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, foram usados para avaliar diferenças entre os grupos NI, PI e RE em cada dose nos gráficos A, C, D, E, F e G. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com controle NI é representado por asterisco sem barra, e entre dois grupos com a mesma dose de infecção, representado pelo asterisco com barra nos gráficos A, C, D, E e F. Dados não significativos não foram mostrados. **Fonte:** Autoria própria.

Além disso, observamos que no cenário de primo-infecção, os camundongos normalizaram os níveis de leucócitos no BAL após 100 dias de infecção, exceto no grupo PI 2500 (**Figura 40 A**). Nas outras doses (250 e 1250), apesar da normalidade da contagem total de leucócitos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, e da diminuição em comparação ao tempo 35 dpi, estavam aumentados aos 100 dpi em comparação ao grupo NI (**Figura 40 A**). Por outro lado, observamos que nos camundongos infectados com a dose intermediária e a maior dose de ovos no cenário de reinfecção, após 100 dias, os níveis de leucócitos permaneceram elevados desde a avaliação aos 35 dias, enquanto o grupo RE 250 nivelou a contagem com grupo NI. Curiosamente, aos 100 dias de infecção, ainda observamos a presença de macrófagos carregados com grânulos de hemossiderina nos grupos RE 1250 e 2500, sendo possível perceber um aumento no número em comparação aos 35 dpi no RE 2500 (**Figura 40 B**), além disso, todos os grupos RE permaneceram com a contagem de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos alta aos 100 dpi (**Figura 40 B**).

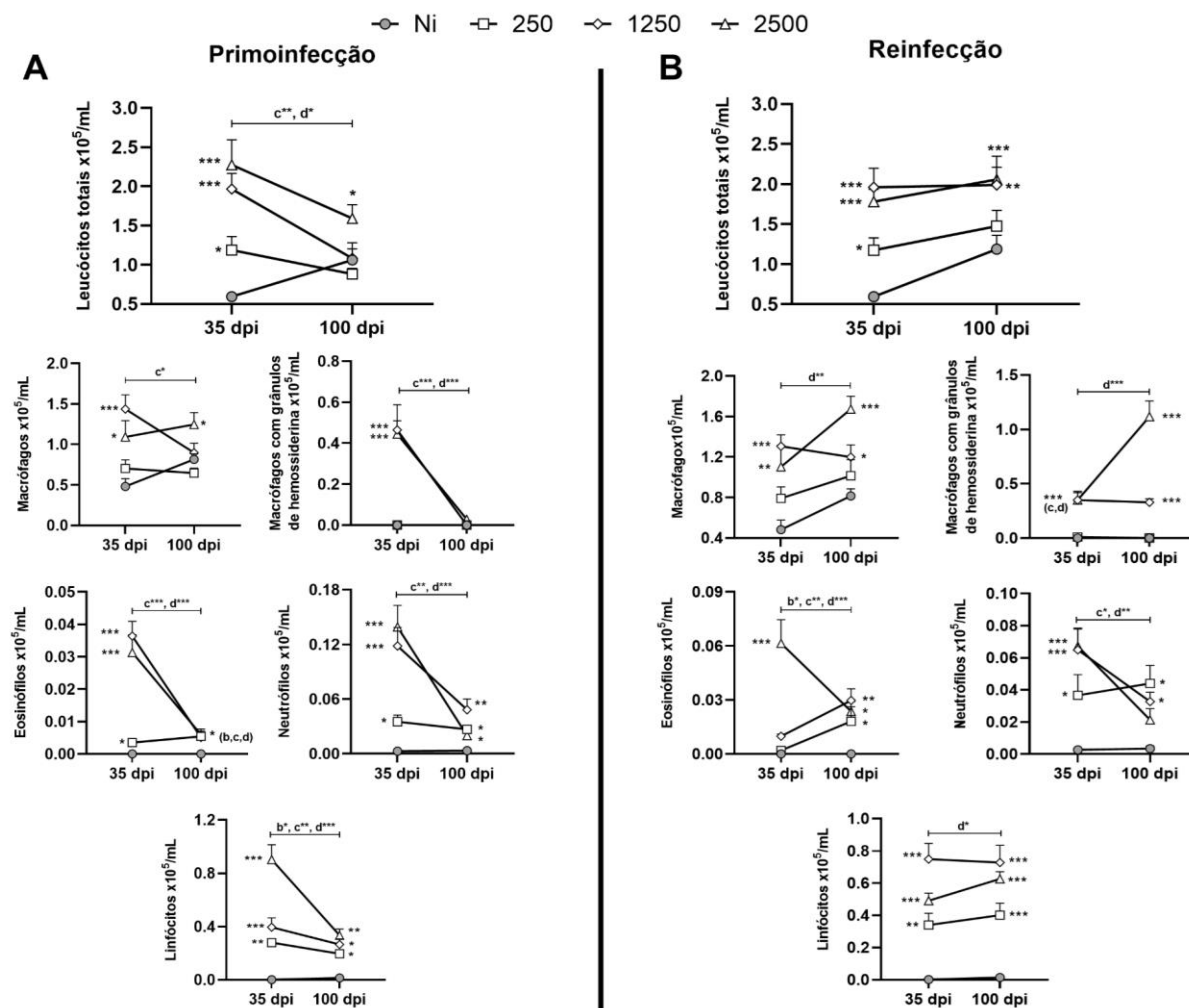


Figura 40: Contagem aos 35 dpi e 100 dpi de leucócitos totais e diferenciais no BAL de camundongos infectados com *A. suum* com diferentes doses de ovos e frequência de exposições. (A) Contagem de leucócitos totais e diferenciais nos grupos PI com as diferentes doses aos 35dpi e 100dpi (B) Contagem de leucócitos totais e diferenciais nos grupos RE com as diferentes doses aos 35 dpi e 100 dpi. Em ambos, foram quantificados os macrófagos, macrófagos com grânulos de hemossiderina, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, foram usados para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35 e 100dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos em tempos diferentes com asterisco e barra. (a) representa o grupo NI, (b) grupo 250, (c) grupo 1250 e (d) grupo 2500. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.4.5 Apesar de induzir rápida melhora no hospedeiro, a infecção com 2500 ovos favorece a expansão persistente do infiltrado inflamatório no pulmão

Com base nos resultados apresentados até o momento, hipotetizamos que as doses mais elevadas podem recrutar muitas células para o local dos danos causados pela infecção, o que pode estar associado ao reparo mais rápido, ao contrário das doses mais baixas. Assim, procedemos com a avaliação da inflamação nos pulmões dos animais. Como esperado, a

infecção por *A. suum*, independentemente da carga de ovos e do número de exposições, induziu um processo inflamatório que ainda estava presente aos 35 dpi, porém com intensidade variável entre os grupos (**Figura 41**). Observamos um aumento gradual nos níveis de NAG e EPO (**Figura 41 A**) nos grupos que receberam doses mais elevadas (2500) tanto nos grupos PI e RE quanto no grupo RE 1250. Entretanto, nos animais PI 250 e 1250 não observamos aumento na atividade de NAG e EPO (**Figura 41 A**). Por outro lado, observamos aumento da atividade da MPO apenas nesses grupos (PI 250 e 1250), enquanto os demais apresentaram níveis semelhantes ao grupo controle (**Figura 41 A**).

Além da variação nos níveis de NAG, EPO e MPO, a histopatologia revelou resultados que corroboram com o observado no BAL e nas dosagens de NAG, EPO e MPO. Macrófagos com grânulos de hemossiderina foram observados no tecido dos grupos infectados com a dose de 1250 e 2500 independentemente da quantidade de exposições (**Figura 41 B**). Na análise semi-quantitativa do pulmão, observamos nos grupos PI 250 e 1250 áreas hemorrágicas mais evidentes (**Figura 41 C e D**). Aos 35 dpi, independente da dose de infecção e quantidade de exposição, foram encontradas áreas de infiltrado inflamatório, perda de integridade vascular e edema. Na análise morfométrica, observamos que os grupos infectados com 1250 e 2500 ovos, independentemente da quantidade de exposição, induziram aumentos nas áreas de infiltrado inflamatório (**Figura 41 D**). Ocorreram alterações importantes associadas aos brônquios, inflamação perivascular e no parênquima (**Figura 41 D**). A primo-infecção induziu a inflamação nos brônquios e ao redor de vasos de forma mais intensa em comparação com a reinfecção que apresentou diminuição do escore, independente da dose (**Figura 41 D**). Por outro lado, foi observado aumento da intensidade da inflamação parenquimatosa principalmente nos grupos de reinfecção (**Figura 41 C e D**). Foram observados focos de hemorragia apenas nos grupos PI, principalmente nos grupos 250 e 1250, enquanto 2500 apresentaram diminuição (**Figura 41 D**). Além disso, observamos que as áreas de infiltração foram maiores no grupo PI 1250 em RE 2500 (**Figura 41 D**). Em todos os grupos observamos infiltrados inflamatórios com predomínio de polimorfonucleares e a presença de células mononucleares ao redor da vasculatura, brônquios, bronquíolos e redução do espessamento dos septos alveolares. Os macrófagos foram encontrados em maior intensidade nos grupos 1250 e 2500, e a intensidade foi elevada de acordo com a quantidade de exposição. Embora não tenhamos observado aumento gradativo entre PI e RE nas doses de 1250 e 2500 na avaliação do escore histopatológico, notamos que na análise morfométrica, os dados corroboraram com os resultados de NAG e EPO, principalmente devido à presença de macrófagos com grânulos

de hemossiderina no tecido (**Figura 41 B e C**), corroborando os achados observados no BAL (**Figura 39**). Nossos resultados sugerem que independente da dose, a infecção por *A. suum* leva a lesões crônicas presentes aos 35 dpi, mas com intensidade variável dependendo da dose e da frequência de exposições.

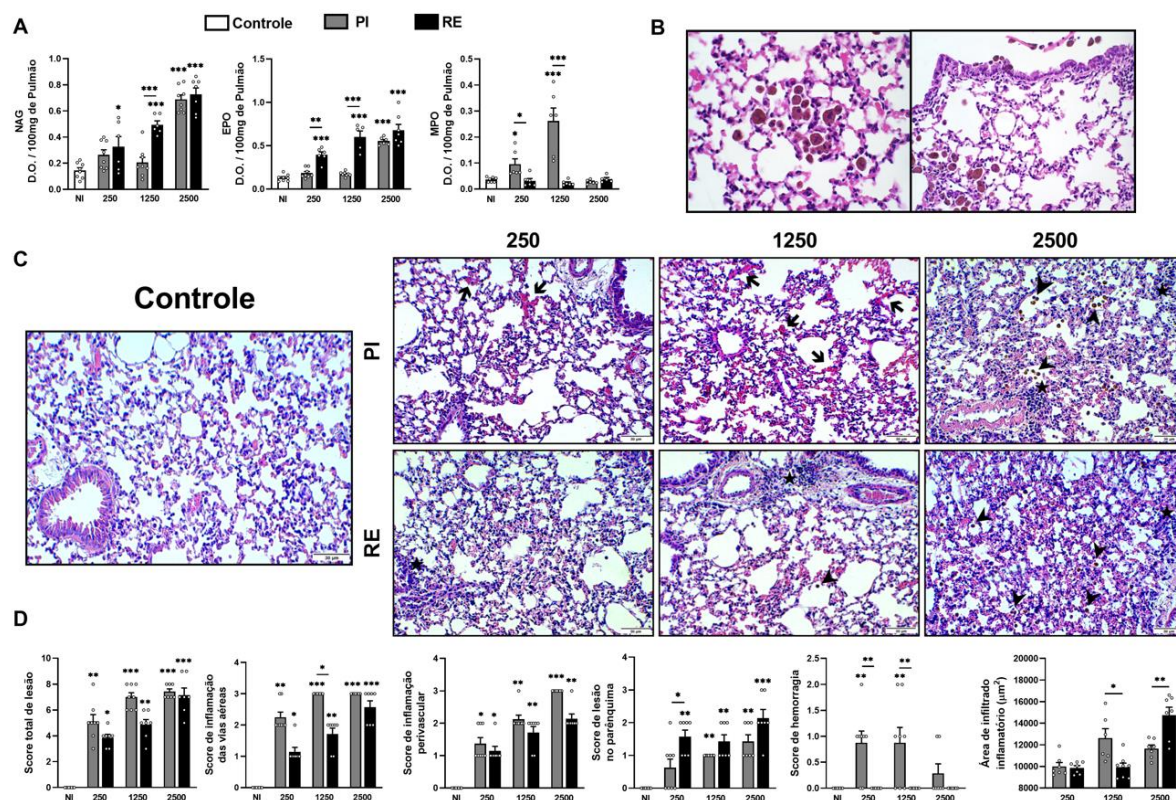


Figura 41: Aspectos da inflamação no pulmão aos 35 dpi de camundongos BALB/c infectados por *A. suum* em diferentes doses de ovos e quantidade de exposições. (A) Atividade indireta de macrófagos (NAG), eosinófilos (EPO) e neutrófilos (MPO) (B) Macrófagos com grânulos de hemossiderina encontrados no pulmão corados por H&E (C) Imagens representativas da histologia do pulmão corada por H&E, áreas de hemorragia (Setas), macrófagos com grânulos de hemossiderina (cabeça das setas), infiltrado inflamatório (★), Barra= 30µm (D) Score histopatológico e quantificação das áreas de infiltrado inflamatório. Dados apresentados em média ± SEM. Para as análises estatísticas, o teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, foram usados para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35 em (A) e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi usado em (D). Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Além da persistência de células no tecido aos 35 dpi, destacamos que foi observado a presença de áreas de inflamação no pulmão aos 100 dpi com menor intensidade quando comparado aos 35 dpi (**Figura 42**). Nos grupos PI observamos que independente da dose, houve redução significativa da intensidade da lesão aos 100 dpi, porém nas maiores doses (1250 e

2500) ainda houve diferença em relação ao grupo NI. Contudo, nos grupos RE, apenas os animais infectados com a dose de 2500 ovos reduziram significativamente a intensidade das lesões no pulmão, dessa forma, igualando aos grupos que receberam 250 e 1250 ovos, os quais não houve diferença do padrão observado aos 35 dpi. Vale salientar que aos 100 dpi, todos esses grupos apresentaram aumento na intensidade das lesões em comparação ao grupo NI (**Figura 42**).

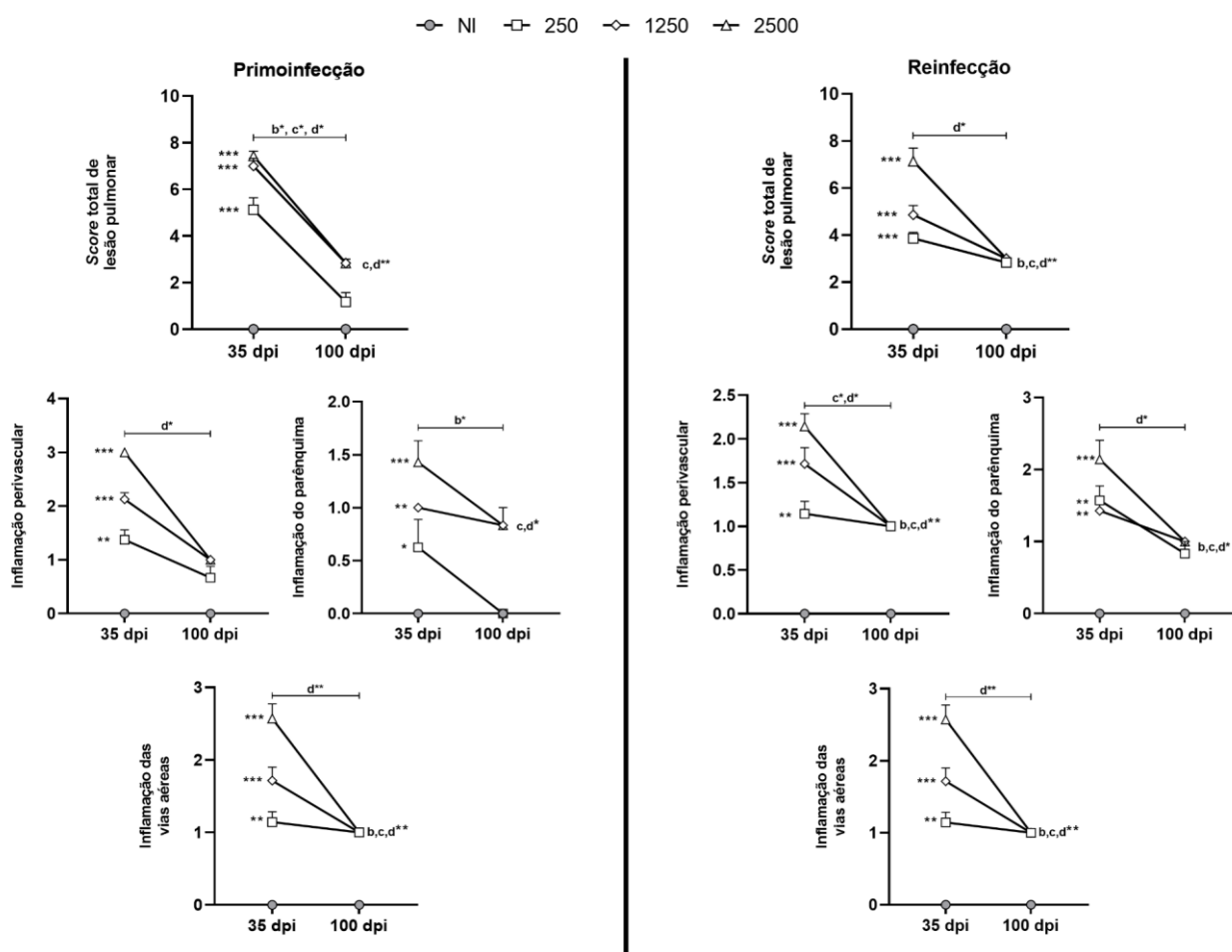


Figura 42: Evolução até aos 100 dpi da inflamação no pulmão dos camundongos BALB/c infectados por *A. suum* em diferentes doses de ovos e quantidade de exposições. Dados apresentados em média ± Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35 e 100 dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos em tempos diferentes com asterisco e barra. (a) representa o grupo NI, (b) grupo 250, (c) grupo 1250 e (d) grupo 2500. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Além das análises de infiltrado inflamatório no tecido, analisamos a formação de fibrose no pulmão dos animais, a fim de compreender melhor a dinâmica de reparo aos 35 dpi. Nas

análises qualitativas foi observado que na primo-infecção ocorre aumento das áreas de fibrose conforme o aumento da dose infecciosa administrada (**Figura 43 A-D**), enquanto na reinfecção, observamos o contrário, pois as menores doses possuíam áreas de fibrose mais evidentes em comparação aos grupos que receberam doses mais altas (1250 e 2500 ovos) (**Figura 43 A-G**). Esses resultados foram confirmados na análise morfométrica, que possibilitou observar que os animais RE 250 possuem maior área de fibrose no pulmão quando comparado ao grupo PI 250, enquanto os animais que receberam 1250 ovos não há diferença na quantidade de exposições e os animais com a maior dose (2500) apresentam intensidade maior na primo-infecção em relação a reinfecção (**Figura 43 H**). Juntos, esses resultados demonstram que as menores doses promovem recrutamento menos intenso de células, o que retarda o processo de resolução dos danos, enquanto as maiores doses promovem maior recrutamento celular e maior resolução dos danos.

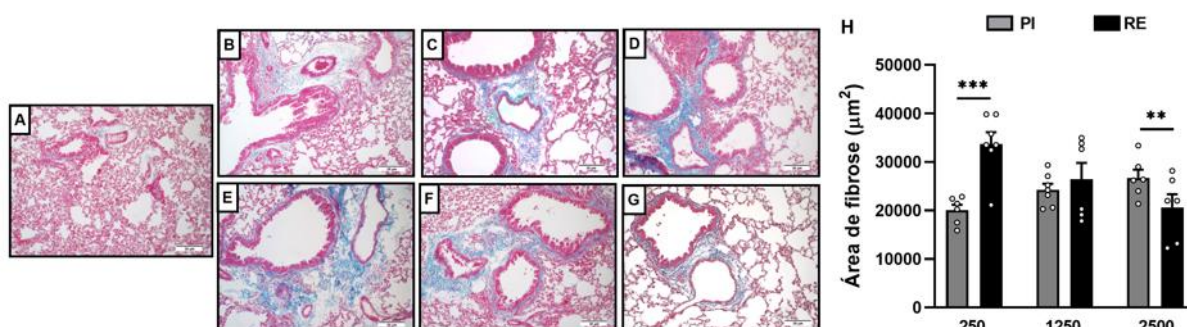


Figura 43: Imagens representativas de pulmão de camundongos BALB/c aos 35 dpi primoinfectados e reinfetados por *A. suum*, corados com Tricrômico de Masson e morfometria de áreas de fibrose aos 35 dpi. (A) Imagem representativa do grupo controle; (B) Imagem representativa do grupo PI 250; (C) Imagem representativa do grupo PI 1250; (D) Imagem representativa do grupo PI 2500; (E) Imagem representativa do grupo RE 250; (F) Imagem representativa do grupo RE 1250; (G) Imagem representativa do grupo RE 2500; (H) Área total de fibrose aos 35dpi nos diferentes grupos infectados por *A. suum*. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste-t foi empregado para calcular diferenças entre os grupos infectados com a respectiva dose (H). Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo são representadas por asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.4.6 Menores doses de infecção promovem aumento expressivo de citocinas regulatórias no pulmão e influenciam a produção de citocinas mistas Th1/Th2/Th17

Diante dos resultados apresentados, observamos que a dose de infecção e frequência de exposições influenciam na dinâmica da infecção. Nesse sentido, direcionamos o olhar para as

alterações no perfil de citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A e TGF- β) no pulmão aos 35dpi. Nossos resultados revelaram cenários intrigantes nos diferentes grupos experimentais. Observamos aumento significativo na produção de TNF, IL-5 e IL-10 apenas nos grupos PI 250 e 1250, sendo o TNF α e IL-10 mais expressivos no grupo PI 250 e IL-5 no PI 1250 (**Figura 44 B, D e H**). Além disso, verificamos aumento de IL-13 exclusivo no grupo PI 250 e, ao compararmos os grupos PI 2500 e RE 2500, embora tenham apresentado diferenças, ambas as concentrações foram equivalentes ao controle (**Figura 44 F**). Observamos aumento nos níveis da IL-17 nos grupos RE 250 e PI 1250, enquanto os demais mantiveram níveis normais (**Figura 44 C**). Observamos também aumento de TGF- β nos grupos que receberam 250 ovos, independentemente da quantidade de exposições e nos grupos PI 1250 e RE 2500 (**Figura 44 G**). Por outro lado, a IL-6 destacou-se pela sua alta produção em todos os grupos, indicando uma resposta generalizada (**Figura 44 E**). Destacamos ainda que houve diminuição nos níveis de IL-2 no grupo PI 2500 e, de forma ainda mais acentuada, no grupo RE 2500 (**Figura 44 A**). É digno de nota que os níveis de IFN- γ e IL-4 em todos os grupos estavam abaixo dos limites de detecção (dados não mostrados).

Aos 100dpi, observamos padrões distintos de citocinas entre os grupos experimentais. IL-2 e IL-17A estavam elevados nos grupos RE 250/2500 (**Figura 44 I e O**), indicando ativação imune sustentada. TNF- α mostrou um aumento dependente da dose nos grupos PI 1.250/2.500 (**Figura 44 J**), sugerindo uma resposta pró-inflamatória contínua. IFN- γ foi significativamente maior no grupo PI 250 e em ambos os grupos PI/RE que receberam 1.250 ou 2.500 ovos (**Figura 44 K**). Uma resposta persistente do tipo 2 foi marcada por IL-5 elevada nos grupos PI/RE 250, bem como nos grupos RE 1.250, PI/RE 2.500 (**Figura 44 L**), com IL-13 sendo mais elevada em PI 2.500, porém alta em todos os grupos (**Figura 44 N**). IL-4 permaneceu indetectável em todos os grupos (dados não mostrados). A IL-6 foi elevada em todos os grupos, com os níveis mais altos no RE 2.500 (**Figura 44 M**). Citocinas regulatórias como a IL-10 foram notavelmente aumentadas nos grupos PI/RE 250, e nos grupos PI 1.250/2.500 e RE 2.500 (**Figura 44 P**), destacando uma resposta imune regulatória em andamento. O TGF- β foi elevado em todos os grupos, com os níveis mais altos nos grupos PI, mostrando uma diminuição dose-dependente de 250 para 2.500 ovos (**Figura 44 Q**), onde o grupo PI 250 exibiu os níveis mais elevados.

Em conjunto, estes resultados reforçam a natureza mista da resposta imune contra a infecção por *A. suum* e que este perfil está relacionado à dose de infecção e da frequência de exposições. Esses resultados demonstram que as menores doses de infecção são capazes de manter altos níveis de citocinas do tipo 1 e tipo 2 aos 35 dpi, dinâmica não observada nos grupos infectados com a dose de 2500 ovos, devido à rápida resposta promovida pela alta quantidade de antígenos de *A. suum*.

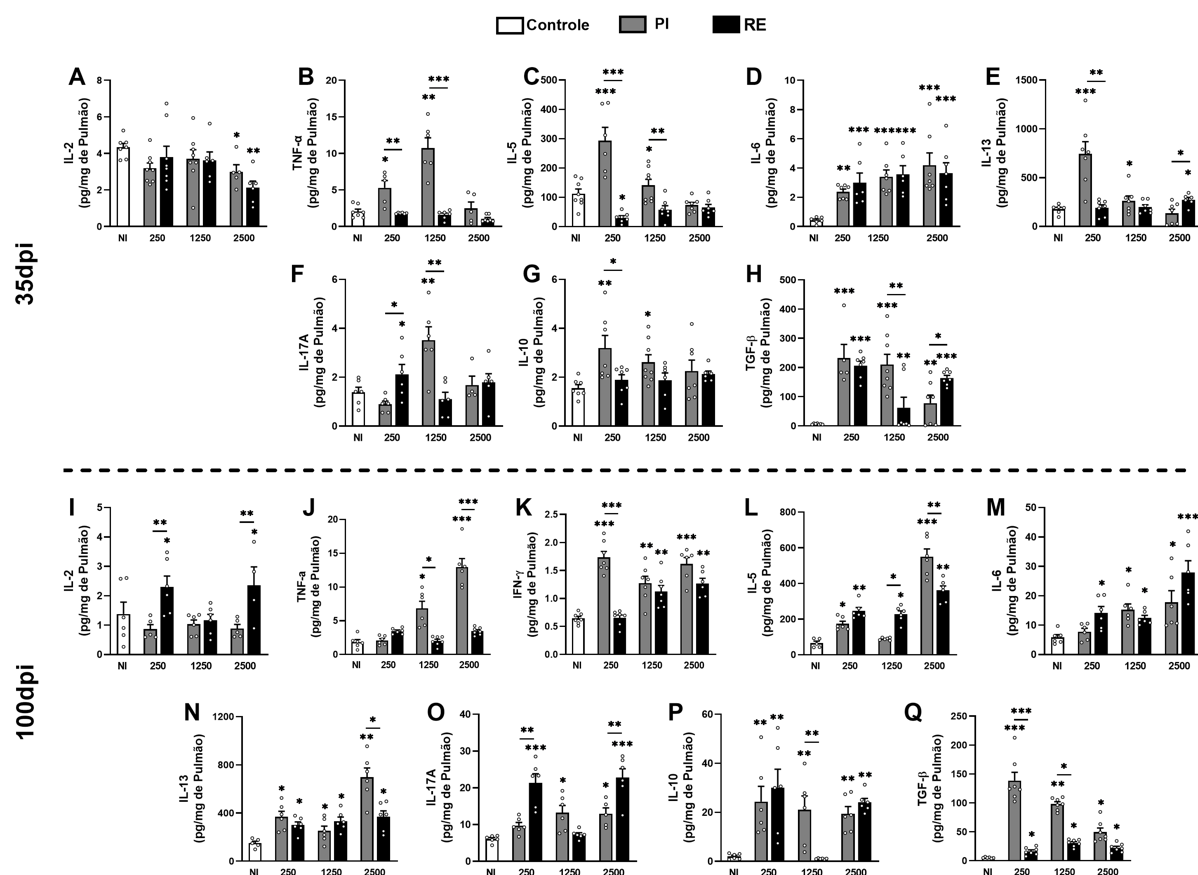


Figura 44: Perfil da produção de citocinas no pulmão aos 35 dpi de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfected com diferentes doses e quantidades de exposições por *A. suum*. (A) IL-2; (B) TNF; (C) IL-17^a; (D) IL-5; (E) IL-6; (F) IL-13; (G) TGF; (H) IL-10. Dados apresentados em média ± Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.4.7 A inflamação persistente desencadeada pela infecção por *A. suum* prejudica a função pulmonar e resulta em doença restritiva crônica

Assim como observado anteriormente, a inflamação crônica causada pela infecção por *A. suum* causou aumento de danos no pulmão e aumento de áreas de fibrose (**Figuras 41 a 43**). Dessa forma, levantamos a hipótese de que este cenário pode levar ao desenvolvimento de doença pulmonar crônica conforme observado por Wu et al. (2021). Assim, inicialmente avaliamos a função pulmonar por espirometria aos 35 dpi e observamos que a infecção, independente da dose de ovos e frequência de exposições, afeta os parâmetros respiratórios, mas em diferentes intensidades (**Figura 45**). Nossos resultados mostraram diminuição na resistência pulmonar (RI) em todos os grupos, exceto o PI 1250 (**Figura 45 A**). Também destacamos o aumento do volume corrente, capacidade inspiratória e as complacências estática e dinâmica em todos os grupos (**Figura 45 B, C, E e F**). Entretanto, ao avaliar o índice de Tiffeneau (FEV50/FVC) destacamos que houve aumento dos valores em todos os grupos, o que sugere um padrão de doença obstrutiva (**Figura 45 D**).

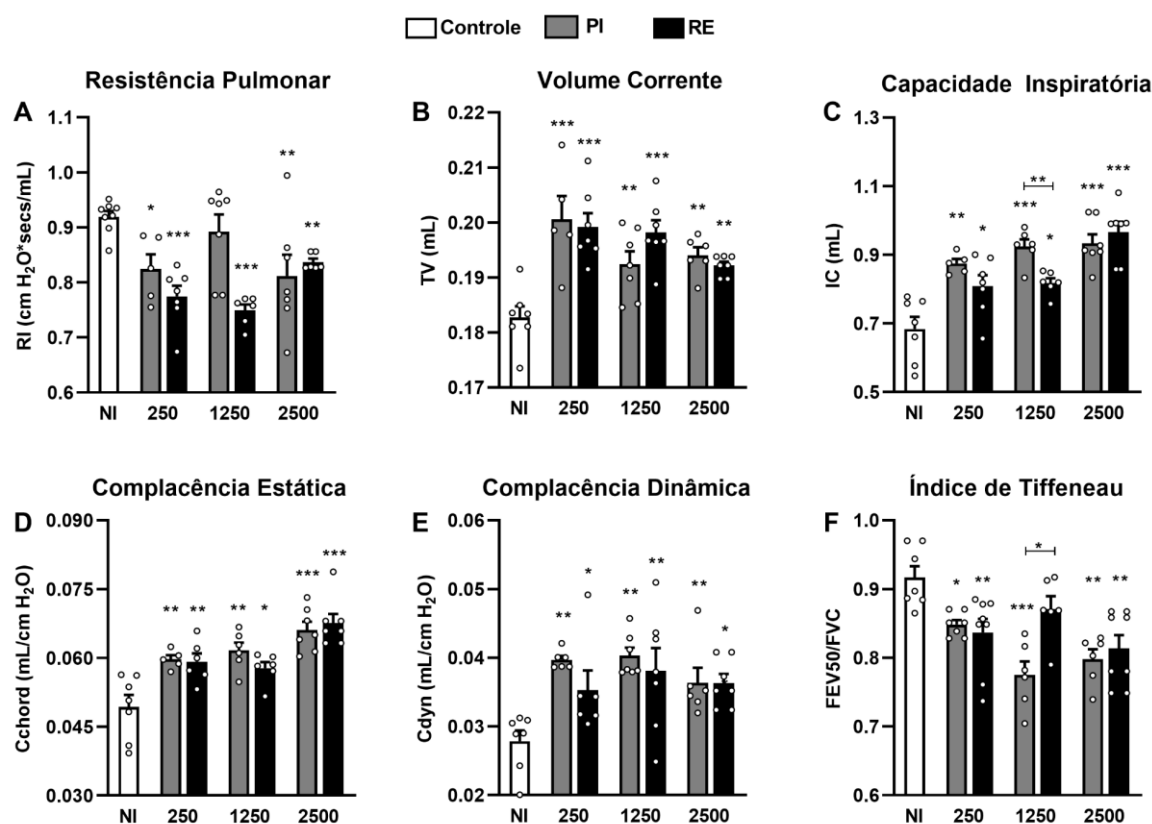


Figura 45: Avaliação da mecânica pulmonar aos 35 dpi de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectados com diferentes doses e frequência de exposições por *A. suum*. (A) Resistência Pulmonar; (B) Volume Corrente; (C) Capacidade Inspiratória; (D) Complacência Estática; (E) Complacência Dinâmica; (F)

Razão entre os valores FEV50/FVC que representa o índice de Tiffeneau. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Por observar a existência de doença pulmonar crônica nos animais aos 35 dpi, realizamos a espirometria nos animais aos 100 dpi. Os resultados revelaram aspectos intrigantes relacionados aos parâmetros pulmonares. Essas observações fornecem *insights* valiosos sobre a dinâmica das respostas pulmonares ao longo de 100dpi nos diferentes grupos experimentais. Em relação à resistência pulmonar, observou-se um aumento significativo aos 100 dpi nos grupos RE 250 e 1250, enquanto nenhum padrão emergiu no grupo RE 2500 ao longo desse período. Contrariamente, no grupo PI 2500, houve um aumento, sugerindo uma possível recuperação diferencial neste grupo para esse parâmetro (**Figura 46 A**). Contudo, nos grupos que receberam 2500 ovos, independentemente da dose administrada, o volume corrente apresentou redução expressiva aos 100 dpi, assim como os grupos PI 250 e RE 1250 (**Figura 46 B**). A capacidade inspiratória, por sua vez, demonstrou um aumento uniforme aos 100 dpi em todos os grupos RE, independentemente da dose administrada (**Figura 46 C**).

Ao analisar o índice de Tiffeneau, evidenciamos um padrão consistente de doença restritiva em todos os grupos RE, reforçando a presença de alterações na função pulmonar associadas à infecção, independente da dose, persistindo ainda por 100 dpi (**Figura 46 D**). A complacência estática revelou uma melhora aos 100 dpi nos grupos que receberam 250 e 1250 ovos. No entanto, o grupo RE 2500 manteve uma complacência estática elevada, sugerindo uma resposta menos favorável nesse aspecto (**Figura 46 E**). Quanto à complacência dinâmica, observamos diminuição generalizada em todos os grupos aos 100 dpi, sem sinais de melhora em comparação aos 35 dpi (**Figura 46 F**). Essa redução na complacência dinâmica indica um comprometimento persistente na capacidade do sistema respiratório de se adaptar a variações no volume pulmonar durante o ciclo respiratório.

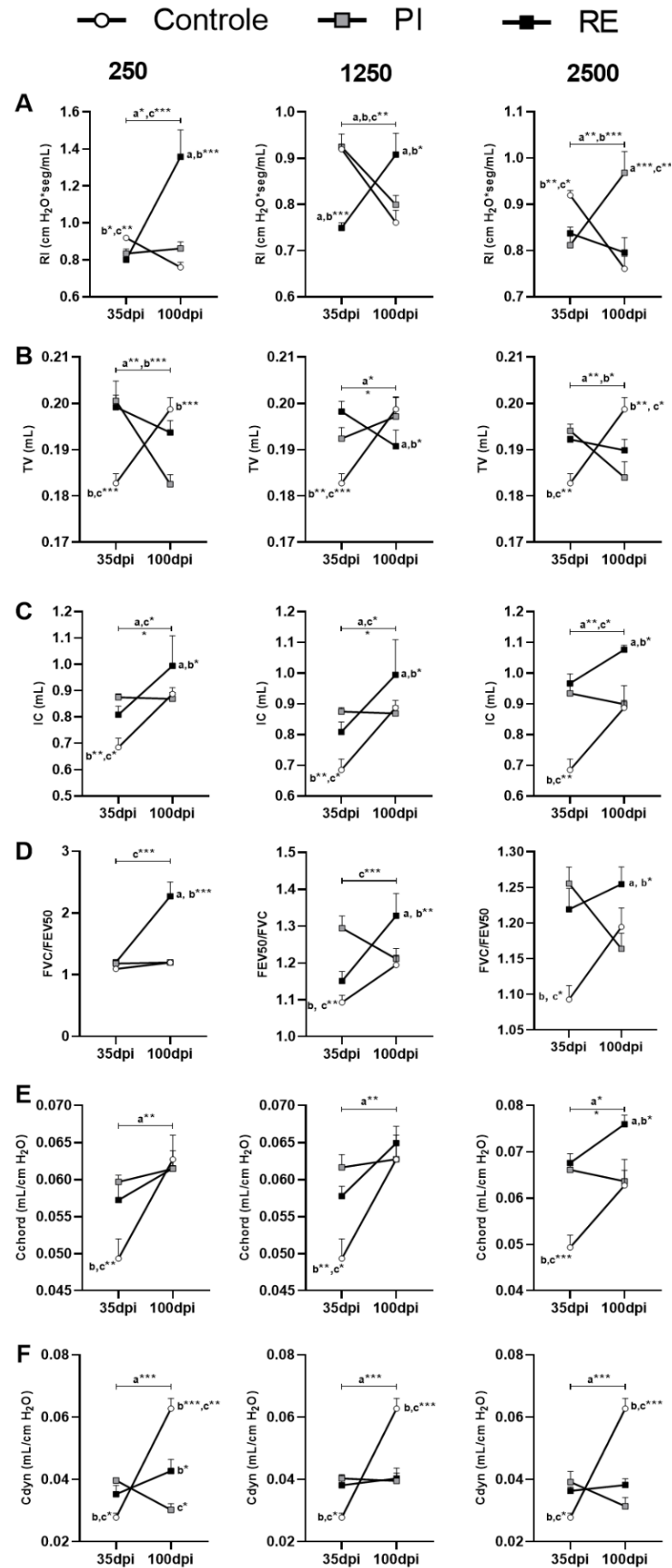


Figura 46: Evolução dos parâmetros respiratórios dos 35 dpi aos 100 dpi de camundongos BALB/c infectados por *A. suum* em diferentes doses de ovos e quantidade de exposições. (A) Resistência Pulmonar de acordo com a dose administrada; (B) Volume Corrente de acordo com a dose administrada; (C) Capacidade Inspiratória de acordo com a dose administrada; (D) Razão entre os valores FEV50/FVC que representa o índice de Tiffeneau de acordo com a dose administrada; (E) Complacência Estática de acordo com a dose administrada; (F) Complacência Dinâmica de acordo com a dose administrada. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35 e 100dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos em tempos diferentes com asterisco e barra. (a) representa o grupo NI, (b) grupo 250, (c) grupo 1250 e (d) grupo 2500. Dados não significativos não foram mostrados. **Fonte:** Autoria própria.

8.4.8 Doses mais baixas de ovos promovem aumento nos níveis de anticorpos na reinfeção persistindo por 100 dpi semelhante às doses mais altas

O conhecimento sobre os níveis de anticorpos produzidos durante a infecção experimental por *A. suum* já foi avaliado anteriormente por Nogueira et al. (2016). Todavia, não há relatos na literatura avaliando esse perfil após o pico da infecção em diferentes doses de infecção, frequência de exposições e a longo prazo. Assim, avaliamos a resposta humoral aos 35 dpi e a longo prazo (100 dpi). Ao analisar os níveis de anticorpos, observamos que nos grupos infectados com 1250 e 2500 ovos, independentemente do número de exposições, foram capazes de induzir a produção de níveis elevados de IgG total (**Figura 47 A**), enquanto a dose de 250 ovos apenas induziu aumento de anticorpos níveis após a segunda exposição à infecção (**Figura 47 A**). Em relação aos níveis de IgA no BAL, observamos que a primo-infecção, independente da dose, foi capaz de produzir níveis semelhantes de IgA (**Figura 47 A**). Curiosamente, nos animais reinfectados com 250 e 1250 ovos, os níveis de IgA diminuíram em relação à primo-infecção, mas nos animais do grupo RE 2500 os níveis de produção foram maiores em relação ao grupo PI 2500 (**Figura 47 A**).

Além disso, também avaliamos os níveis de anticorpos aos 100 dpi e nossos resultados revelaram dados interessantes sobre o papel dos anticorpos após a migração de larvas de *A. suum*. Nos animais primoinfectados com 1250 e 2500 ovos, houve aumento nos níveis de anticorpos em relação aos grupos infectados com 250 ovos aos 35dpi (**Figura 47 B**). Além disso, nossos resultados sugerem que apenas uma única infecção, não sustenta os níveis de IgG a longo prazo devido à tendência decrescente observada aos 100 dpi, exceto nos grupos infectados com a menor dose (250) (**Figura 47 B**). Apenas nos animais do grupo PI 2500 ovos, foram observadas diferenças em relação ao grupo controle (**Figura 47 C**). Em relação aos níveis de IgA aos 100 dpi, observamos que na primo-infecção não houve diferenças entre as doses

administradas, pois aos 100 dpi permaneceram com os níveis semelhantes ao observado aos 35 dpi (**Figura 47 B**). Curiosamente, nos grupos reinfectados, independente da dose, os níveis de IgG foram semelhantes aos 35 dpi, mas aos 100 dpi, apenas nos grupos RE 1250 observamos aumento nos níveis de IgG em relação aos 35 dpi enquanto as outras doses permaneceram nos mesmos níveis em relação aos 35 dpi (**Figura 47 C**). Por outro lado, na reinfecção, observamos que a dose de 1250 e 2500 ovos induz maior produção de IgA e aos 100 dpi os níveis aumentam em relação aos 35 dpi. Além disso, a diferença dos níveis de IgA aos 100 dpi é maior no grupo 2500 em relação ao controle e em relação às doses 250 e 1250 (**Figura 47 C**).

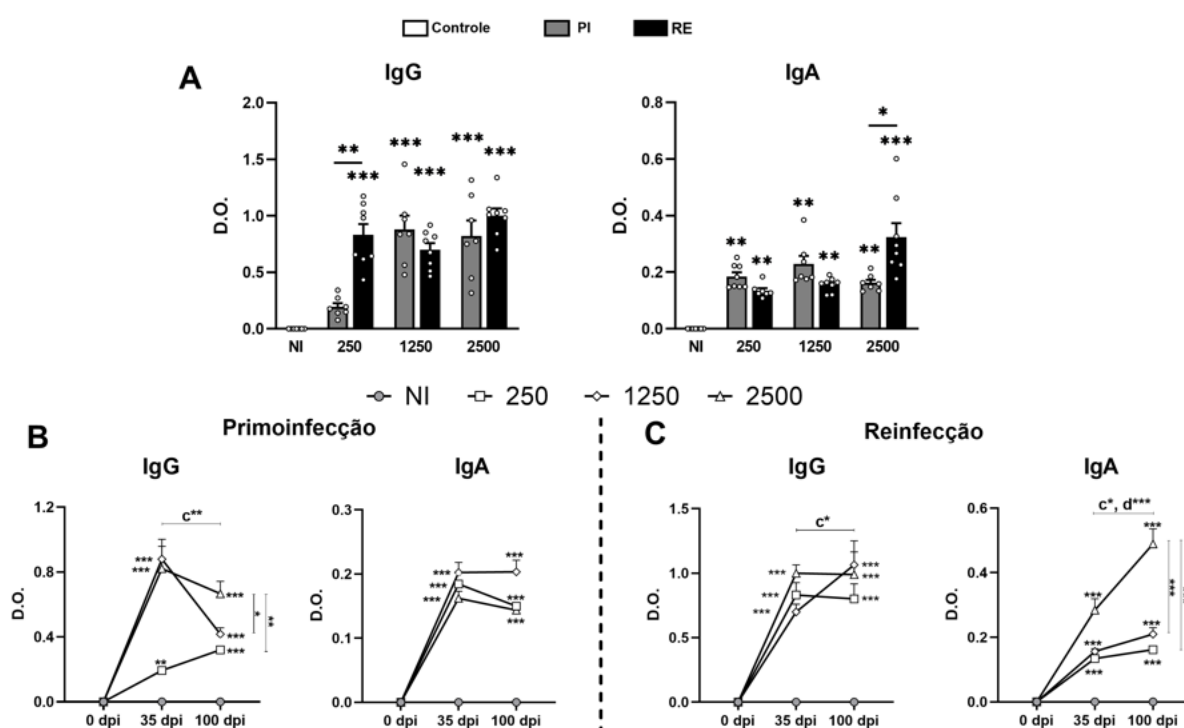


Figura 47: Dosagem de IgG e IgA em camundongos BALB/c infectados com *A. suum* com diferentes doses de ovos, de acordo com a frequência de exposições. (A) Determinação da presença de IgG no soro e IgA no BAL de animais de acordo com diferentes doses nos grupos PI e RE. (B) Determinação da presença de IgG e IgA durante a primo-infecção, aos 0, 35 e 100 dpi. (C) Determinação da presença de IgG e IgA aos 0, 35 e 100 dpi durante a reinfecção. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35 e 100dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos em tempos diferentes com asterisco e barra. (c) representa o grupo 1250 e (d) o grupo 2500. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.4.9 A análise de componentes principais (PCA) apoia a discussão de que as menores doses após exposição única não intensificam resposta imune de imediato e resultam em reparo mais lento e danos persistentes

Para avaliar as diferenças entre os grupos, foi realizada uma técnica de redução dimensional através da Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando variáveis relacionadas à celularidade observada nos grupos (leucograma, leucócitos no BAL, NAG, EPO, MPO, áreas de infiltrado inflamatório no pulmão), intensidade dos danos no hospedeiro (hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, hemoglobina e proteínas totais no BAL) e aos mecanismos de reparo (plaquetas, áreas de fibrose, níveis de TGF β e IL-10) (**Figura 48**). Ao analisar a segregação no PCA para o componente principal 1 (PC1) vs. Componente principal 2 (PC2), notamos uma clara e bem definida distinção entre os grupos, enquanto alguns permanecem próximos. Nossa análise revelou uma mudança sistemática nos clusters com base na dose infecciosa e frequência de exposições.

Destacamos inicialmente a nítida separação entre as amostras do grupo controle (NI) dos demais grupos que foram infectados, indicando uma resposta única e distinta da induzida pela infecção. Em segundo, os dados confirmaram a proximidade entre as amostras dos grupos PI 250 e 1250, sugerindo similaridade nos mecanismos de reparo e na intensidade da resposta às menores doses de infecção após uma única exposição. Há também uma semelhança observada entre os outros grupos, indicando respostas comparáveis em cenários de reinfecção ou exposição única com doses mais elevadas de 2500 ovos (**Figura 48**). Essa análise não apenas destaca a variabilidade entre os grupos, mas também oferece informações valiosas sobre os padrões de resposta imunológica e reparo frente às diferentes condições de infecção.

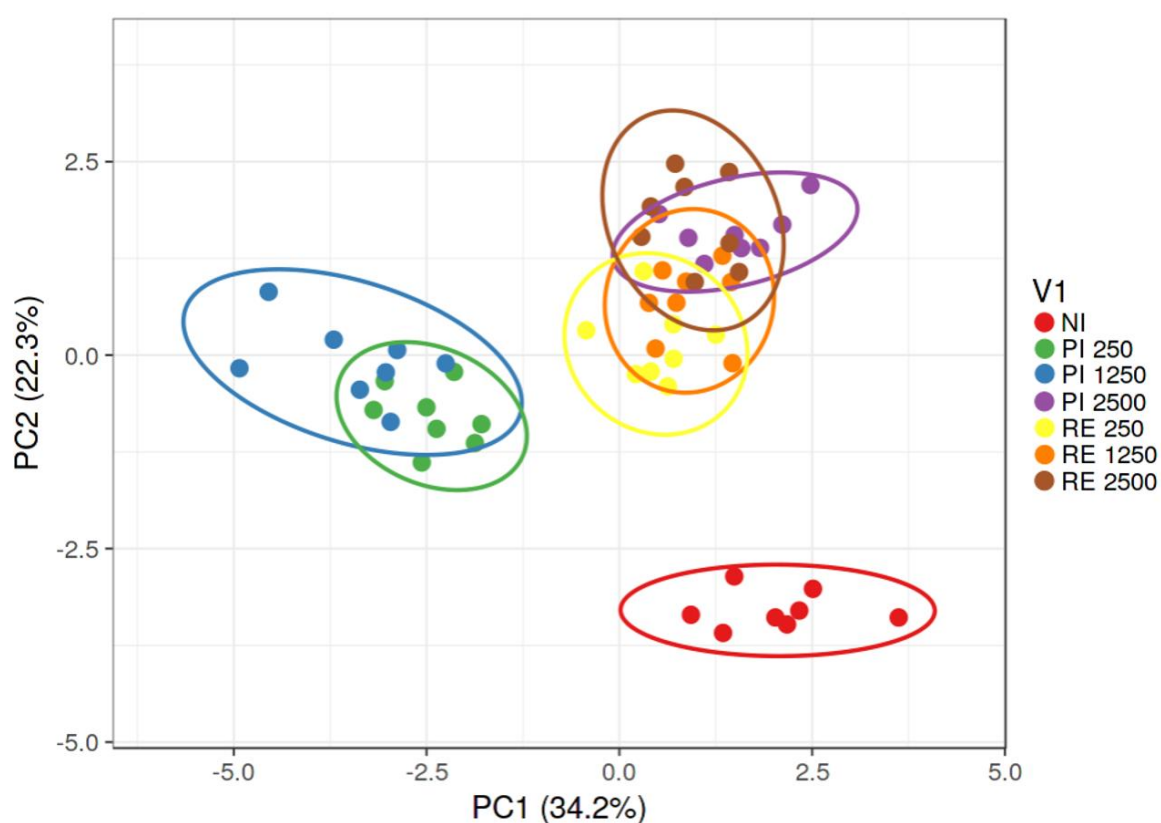


Figura 48: Análise de Componentes Principais (PCA) de danos e mecanismos de reparo em camundongos BALB/c infectados por *A. suum*. Análise das observações de celularidade, intensidade dos danos no hospedeiro e mecanismos de reparo em diferentes grupos de exposição à infecção. A segregação entre os grupos indica distintas respostas imunes e padrões de reparo.

Fonte: Autoria própria.

8.5 A infecção larval por *A. suum* desencadeia inflamação hepática crônica, doença colestática, fibrose e inflamação sistêmica persistente

Visto que a dinâmica de infecção por *A. suum* tempos após a infecção varia de acordo com a dose infecciosa e frequência de exposições resulta em danos persistentes no pulmão, e que a maioria dos estudos são concentrados neste órgão, as informações relacionadas ao fígado ainda são limitadas, destacando a necessidade de pesquisas mais abrangentes.

Portanto, nesta parte do capítulo focamos nos aspectos relacionados aos danos da inflamação crônica no fígado e os impactos na fisiopatologia do hospedeiro. Os resultados apresentados nesta parte do capítulo focaram nos achados relacionados ao fígado e resultaram em um trabalho que foi submetido na revista **ACS Infectious Diseases** sob o título: **Larval**

infection by A. suum triggers chronic liver inflammation, cholestatic disease, fibrosis and persistent systemic inflammation (Apendice).

8.5.1 A dose de infecção e frequência de exposições estão relacionadas com a intensidade da inflamação do fígado aos 35dpi e persistente aos 100dpi

Inicialmente, assim como fizemos no pulmão, investigamos a quantidade de larvas que chegam no fígado. Embora estudos anteriores tenham investigado o papel de infecções múltiplas na carga de larvas no fígado e pulmões (Nogueira et al., 2016), aqui realizamos essa etapa devido a exploração do estudo da reinfecção da dose de 250 ovos. Dessa forma, ao infectar os animais com 250 ovos, aos 4dpi, uma média de 50 larvas foram recuperadas do fígado, enquanto os animais infectados com 2500 ovos cerca de 180 larvas foram recuperadas (**Figura 49 A**). Além disso, não houve diferença no número de larvas recuperadas entre os animais reinfetados (**Figura 49 A**). Posteriormente, investigamos os danos causados pela migração dessas larvas. Para isso, a atividade indireta de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos no fígado dos animais aos 35 dpi foi analisada. Os resultados demonstraram aumento significativo na atividade dessas células aos 35 dpi nos animais que receberam alta dose de infecção (2500 ovos), independente da frequência de exposições (**Figura 49 B**). Contrariamente, observamos que duas doses menores de ovos (250) resultaram no aumento significativo de eosinófilos e neutrófilos nos animais do grupo RE 250 semelhante aos animais que receberam uma única dose alta de 2500 ovos (**Figura 49 C e D**). Além disso, a atividade de neutrófilos aumentou nos animais do grupo RE 2500 em comparação a todos os grupos, também sendo observada nos animais do grupo RE 250, equivalente aos do grupo PI 2500, ambos maiores em comparação ao grupo controle (**Figura 49 D**). As análises morfométricas demonstraram aumento nas áreas de infiltrado inflamatório, especialmente no grupo PI 2500 (**Figura 49 E**). Os infiltrados observados eram principalmente próximo aos vasos e compostos de células mononucleares e alguns polimorfonucleares. As imagens representativas podem ser visualizadas na **figura 49 F**.

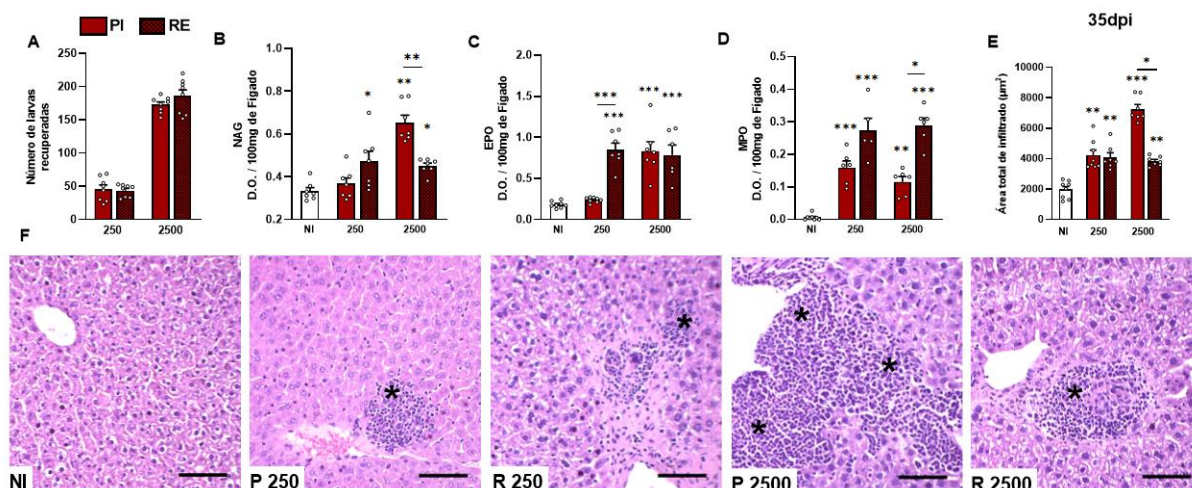


Figura 49: Inflamação resultante da intensidade da migração de larvas de *A. suum* aos 35dpi no parênquima hepático de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfected por diferentes doses. (A) Número de larvas recuperadas no fígado de animais aos 4dpi; (B) Atividade indireta de macrófagos (NAG); (C) eosinófilos (EPO); (D) neutrófilos (MPO) foi avaliada em diferentes doses infectantes e frequência de exposições; (E) Área de infiltrado inflamatório no parênquima hepático; neutrófilos (MPO) foi avaliada em diferentes doses infectantes e frequência de exposições; (F) Imagens representativas da histologia do fígado corada por H&E, *, representam áreas de infiltrado inflamatório. Dados apresentados em média ± Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste T foi usado para avaliar diferenças entre os grupos PI e RE em cada dose em A. O teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados. Barra = 200 µm.

Fonte: Autoria própria.

Uma vez observado que a infecção por *A. suum* aos 35dpi promove aumento da atividade de leucócitos no tecido, procedeu-se com a avaliação aos 100 dpi. Nossos resultados revelam que após um longo período de tempo as áreas de infiltrado inflamatório ainda estavam presentes (**Figura 50 A**). Observamos não houve diferença nas áreas de infiltrado inflamatório, independente da dose e quantidade de exposições, aos 100dpi (**Figura 50 A**). O infiltrado inflamatório predominante nesse tempo foi caracterizado por células mononucleares. Além disso, a atividade celular indicou aumento de NAG nos grupos RE 250 e 2500 (**Figura 50 B**), EPO em PI 250 e 2500, RE 2500 na mesma proporção (**Figura 50 C**) e de MPO em todos os grupos, porém de forma mais exacerbada nos grupos RE 250 e 2500 (**Figura 50 D**). As imagens representativas dos cortes histopatológicos podem ser observadas na **figura 50 E**.

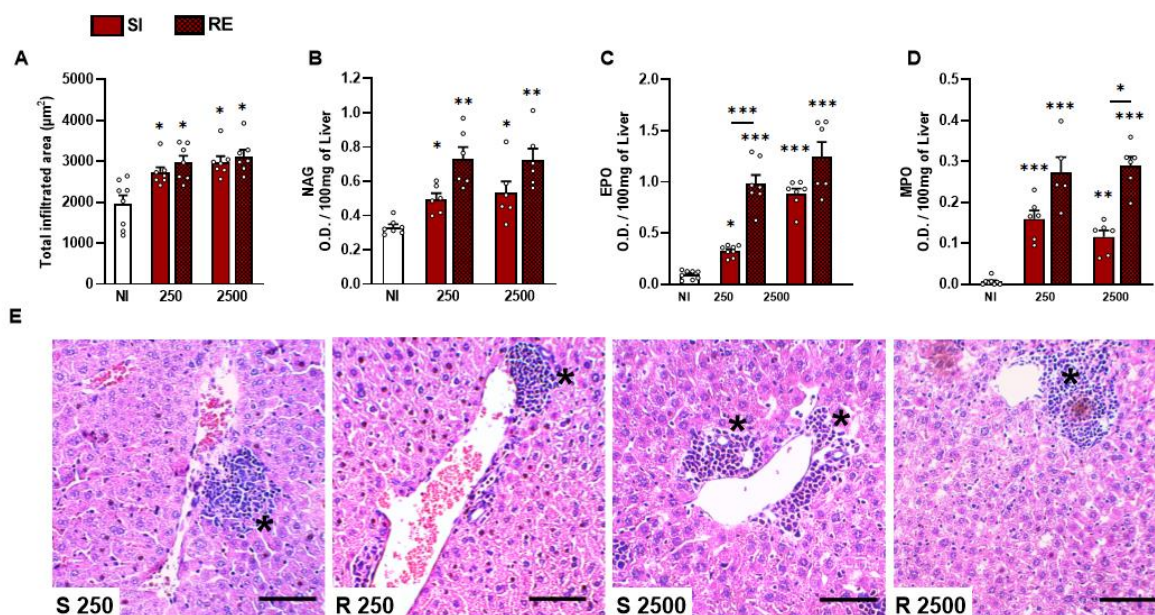


Figura 50: Inflamação resultante da migração de larvas de *A. suum* no parênquima hepático após 100dpi de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectedados por diferentes doses. (A) Área de infiltrado inflamatório no parênquima hepático; (B) Atividade indireta de macrófagos (NAG); (C) eosinófilos (EPO); (D) neutrófilos (MPO) foi avaliada em diferentes doses infectantes e frequência de exposições; (E) Imagens representativas da histologia do fígado corada por H&E, *, representam áreas de infiltrado inflamatório. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados. Barra = 200 µm.

Fonte: Autoria própria.

8.5.2 A infecção por *A. suum* induz lesões no fígado que persistem até 100 dpi e sugere a presença de doença colestatíca

Ao analisar as alterações no fígado decorrentes da inflamação promovida por *A. suum*, observamos a existência de outras alterações no parênquima hepático. A análise semiquantitativa do fígado evidenciou que os hepatócitos mantiveram aspecto morfológico consistente com a normalidade nos animais NI e nos animais infectados houve aumento de áreas lesionadas. Não houve diferença entre os grupos primoinfectados e os reinfectedados, mas percebemos uma diminuição no *score* de lesão aos 100dpi quando comparado aos 35dpi (**Figura 51 A**). Nossos achados das áreas de infiltrado inflamatório, somados as análises de *score* de lesão hepática, nos levou realizar dosagens séricas de marcadores bioquímicos indicativos de lesão nos hepatócitos. Para tal, foram dosadas enzimas ALT e AST (**Figura 51 B**). Os resultados evidenciaram aumento das enzimas ALT e AST em todos os grupos aos

35dpi, porém, de forma mais intensa nos animais que receberam a dose de 2500 ovos (**Figura 51 D**). Por outro lado, destacamos que aos 100 dpi os níveis de ALT e AST normalizaram (dados não mostrados). Das alterações observadas no *score* de lesão, aos 35 dpi foi possível observar áreas de necrose no parênquima. Esses achados foram mais acentuados nos grupos que receberam a maior dose (**Figura 51 C**). Outra alteração evidente no parênquima hepático foi a presença de proliferação de ductos, menos evidentes nos grupos PI 250, e mais evidentes no grupos RE 250, e mais extensas nos grupos PI e RE 2500 (**Figura 51 D**). Curiosamente a presença dessas alterações na mesma intensidade persistiram e ainda estavam presentes aos 100dpi (dados não mostrados). Essas alterações nos levaram a realizar dosagens séricas de marcadores bioquímicos indicativos de função hepática como GGT, Bilirrubina total e frações (direta e indireta), albumina e fosfatase alcalina (**Figura 51 E**). Em relação ao GGT, aos 35 dpi, observamos aumento nos grupos PI independente da dose administrada, e aos 100dpi observamos aumento em todos os grupos (**Figura 51 E**). Observamos que aos 35 dpi houve aumento nas concentrações de bilirrubina total em todos os grupos, sendo a bilirrubina direta aumentada e a indireta aumentada somente no grupo PI 250 (**Figura 51 E**). Aos 100 dpi, houve aumento nos níveis de bilirrubina total em todos os grupos semelhante aos 35dpi, sendo a direta elevada nos grupos RE 250, PI e RE 2500 e a indireta aumentada nos grupos que receberam a dose de 250 (**Figura 51 E**). As análises da dosagem de albumina não mostraram alterações nos grupos aos 35 dpi e 100dpi (dados não mostrados). Observamos aumento nos níveis de fosfatase alcalina apenas aos 100dpi nos grupos RE 250, PI e RE 2500 (**Figura 51 E**).

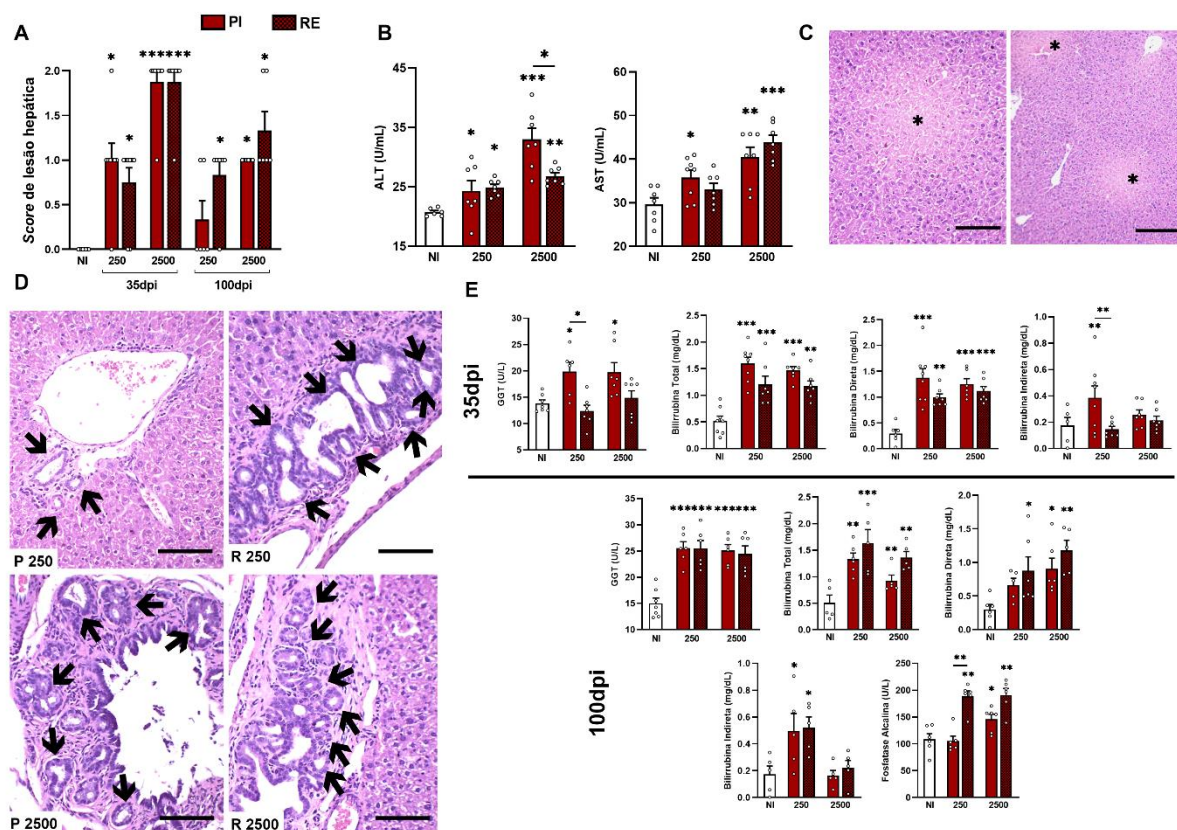


Figura 51: Danos hepáticos aos 35 e 100 dpi de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfectados por diferentes doses de *A. suum* e quantidade de infecções. (A) Score histopatológico de lesão hepática (B) Determinação da concentração sérica de Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST). (C) Imagens representativas da histopatologia do fígado corada por H&E representando áreas de necrose, *, representam áreas de necrose; (D) Imagens representativas da histopatologia do fígado corada por H&E, setas, apontam para áreas de proliferação de ducto; (E) Determinação da concentração séricas de Gama-Glutamil transpeptidase (GGT), Bilirrubina total (BT) e frações direta (BD) e indireta (BI) e fosfatase alcalina (FAL) em plasma aos 35 e 100dpi. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre os demais grupos com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Análises de correlação foram realizadas para melhor entendimento da influência das alterações nos níveis séricos dessas enzimas frente à dose de infecção e frequência de exposições. Os resultados revelaram padrões distintos. Enquanto o aumento de ALT e AST apresentaram correlação positiva com a dose de infecção, independente da frequência de exposições, a GGT não demonstrou correlação com a dose de infecção ou quantidade de exposições (**Tabela 15**). Esses resultados ressaltam a complexidade da infecção por *A. suum* e os respectivos danos hepáticos, destacando a importância de investigações adicionais para elucidar os mecanismos subjacentes a essas variações.

Tabela 15: Correlação dos níveis séricos de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e Gama-Glutamil Transpeptidase (GGT) de acordo com a dose de infecção nas diferentes frequências de exposição por *A. suum*. Para as análises estatísticas, o teste de correlação de Pearson foi usado para avaliar correlações.

	ALT		AST		GGT	
	r	p	r	p	r	p
PI	0,8363	<0,001	0,6470	<0,01	0,3621	0,1167
RE	0,8538	<0,001	0,8087	<0,001	-0,0963	0,6779

Fonte: Autoria própria.

8.5.3 A inflamação causada por *A. suum* levam ao surgimento de fibrose que persiste no tecido

Nas análises histopatológicas foram observadas extensas áreas de fibrose tanto aos 35dpi quanto aos 100dpi. Portanto, para melhor avaliação, as lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson para análises morfométricas. Os resultados revelaram que, aos 35 dpi, animais reinfectados apresentaram uma tendência a apresentar áreas menores de fibrose em comparação aos grupos primoinfectados (**Figura 52 A**). Além disso, observou-se que as áreas de fibrose foram maiores nos grupos PI 250 (**Figura 52 A**). Para acompanhar a progressão das áreas fibrosadas, também foram realizadas análises morfométricas aos 100 dpi. Notamos a persistência dessas áreas ainda aos 100 dpi, entretanto, com intensidades variáveis (**Figura 52 A**). As imagens representativas são ilustradas na **figura 52 B**.

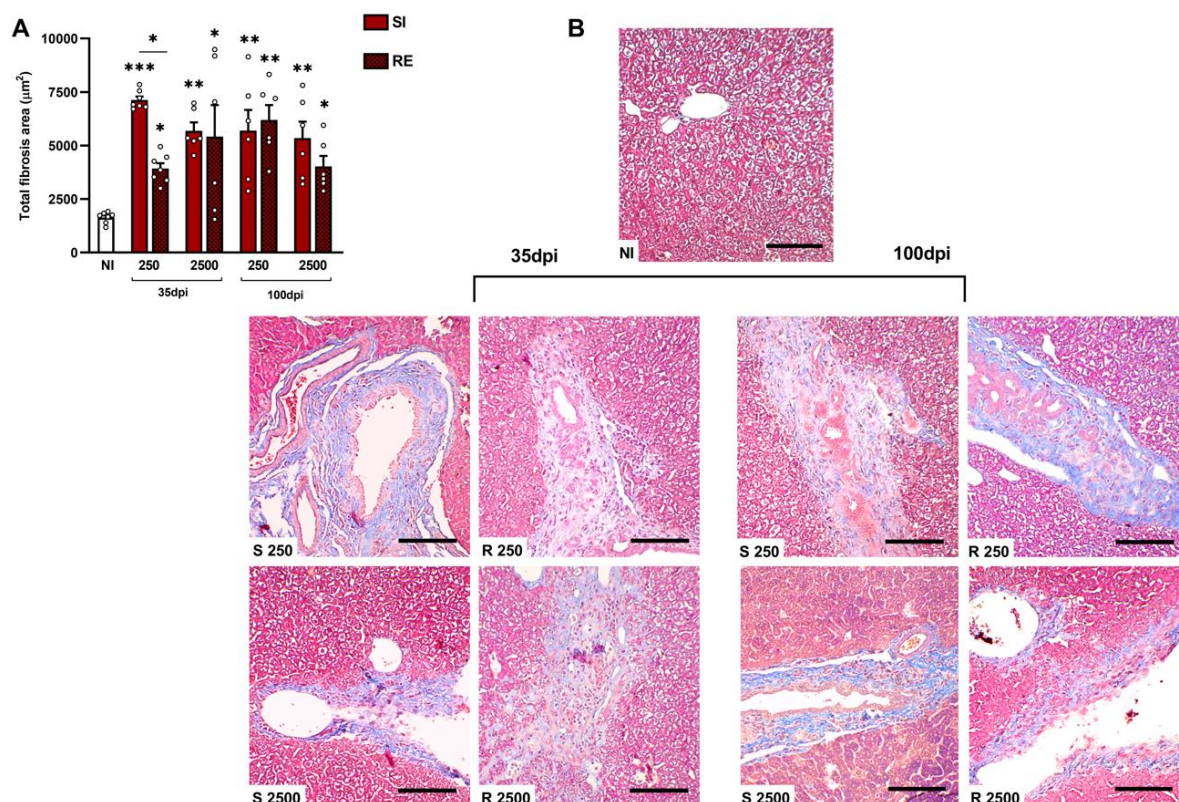


Figura 52: Áreas de fibrose no fígado aos 35 e 100dpi de camundongos primoinfectados e reinfectados por diferentes doses de *A. suum* e frequência de exposições. A) Áreas de fibrose no fígado aos 35 e 100dpi; B) Áreas representativas de fibrose no fígado aos 35 dpi e 100 dpi de acordo com a quantidade de exposições coradas com Tricrômico de Masson. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 100 dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre os demais grupos com asterisco e barra. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos em tempos diferentes com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.5.4 A infecção por *A. suum* induz a expressão de genes associados às respostas Th1/Th2/Th17 que varia de acordo com a dose de infecção, frequência de exposições e com o tempo analisado.

Com base na padronização realizada no **Capítulo I** deste trabalho, utilizamos a técnica de PCR em tempo real para avaliar a expressão de genes que codificam a produção de citocinas no fígado (IL-12/40, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10 e TGF- β) aos 35 dpi e 100 dpi (**Figura 53 A**). Inicialmente investigamos se os achados em camundongos C57BL/6 utilizados na padronização inicial deste trabalho eram reprodutíveis nos camundongos BALB/c da mesma forma que foi feita no capítulo I, só que aqui utilizamos apenas o fígado dos animais. E costatamos que o B2M era o melhor gene de fato para normalização dos dados (**Figura 53 B**)

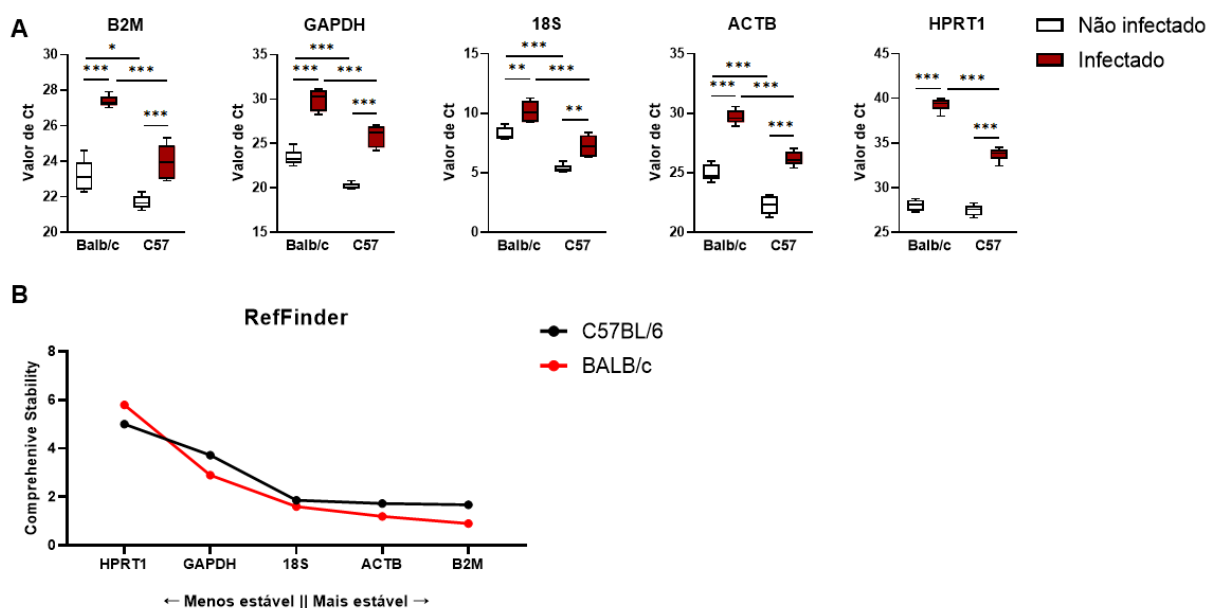


Figura 53: Análises de biologia molecular em camundongos BALB/c conforme padronização do capítulo I. A: Distribuição dos valores Ct para cada um dos mesmos 5 genes referência candidatos testados no capítulo I; B: Testes de estabilidade no RefFinder para avaliação do melhor gene referência. Dados representados em média $\pm$ S.E.M. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Após isso, conduzimos com as análises validamos os primers desenhados para esta parte do trabalho. Todos os iniciadores delineados obtiveram boa eficiência, com valores de E% variando entre 91,29% (IL-17) a 107,23% (IL-5). Além disso, o valor de R^2 variou de 0,988 (IL-10) a 1,000 (IL-4 e TGF- β) (**Tabela 16**). As curvas de dissociação foram reproduzidas para confirmar a especificidade dos ensaios de PCR em tempo real pela observação de um único pico. Não foram observadas a formação de produtos inespecíficos nas curvas e nos respectivos brancos para cada gene (**Figura 54**).

Tabela 16: Informações a respeito eficiência dos iniciadores utilizados no capítulo II. Slope; E: Eficiência de amplificação em %; R²: eficiência de correlação e temperatura de Melting de cada gene utilizado para os genes utilizados para as análises no fígado.

GENE	SLOPE	E (%)	R ²	MELTING TEMPERATURE (TM)
IFN-γ	-3,49	93,43	0,993	72,32
IL-12/40	-3,42	96,06	0,998	75,28
IL-1β	-3,45	94,92	0,998	83,11
IL-6	-3,45	94,92	0,994	79,89
IL-4	-3,52	92,35	1,000	77,47
IL-5	-3,16	107,23	0,989	74,56
IL-17	-3,55	91,29	0,999	87,21
IL-10	-3,43	95,68	0,988	82,22
TGF-β	-3,22	104,44	1,000	84,23

Fonte: Autoria própria.

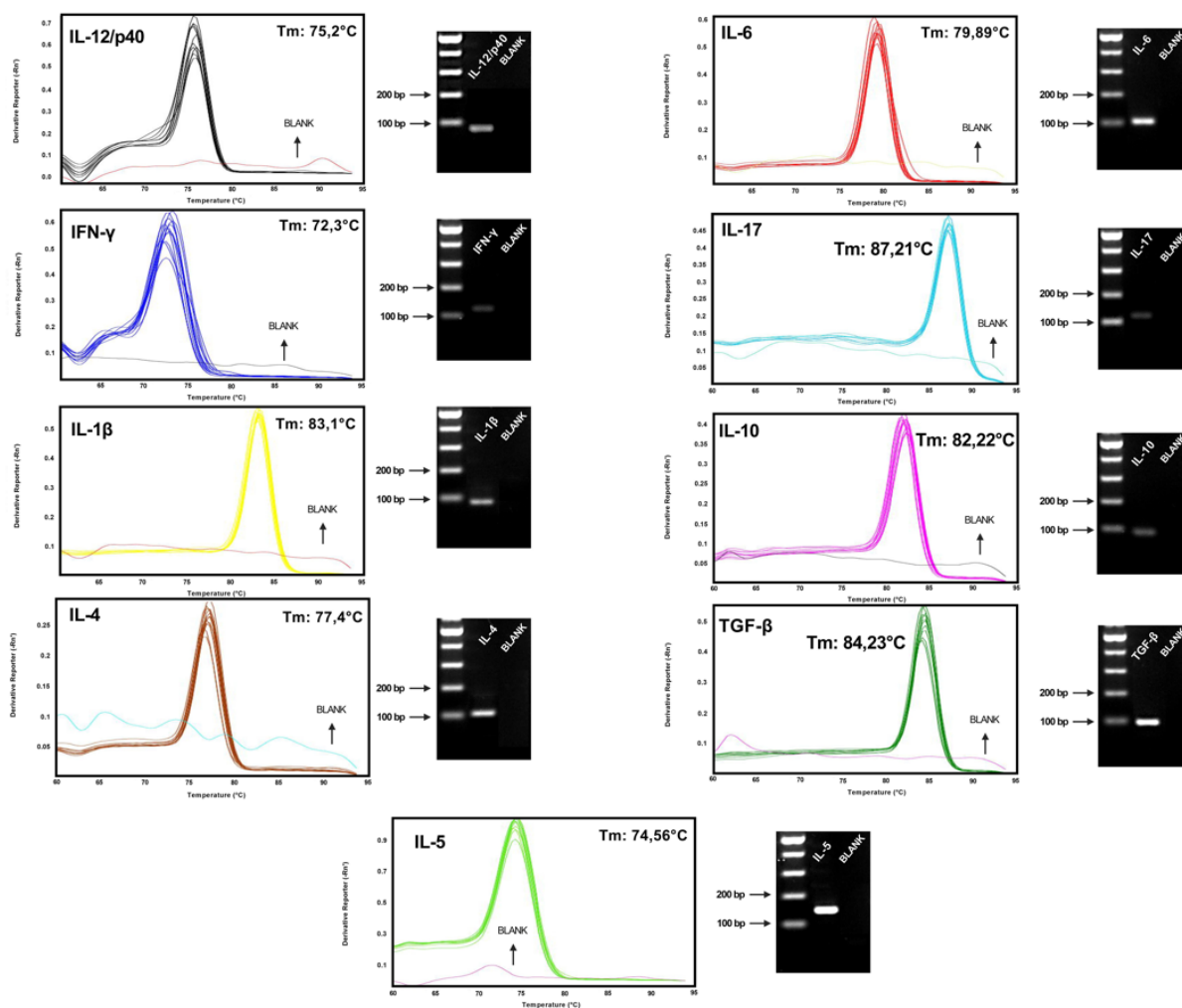


Figura 54: Curvas de dissociação (incluindo temperaturas de fusão) e eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação dos genes avaliados nesta parte do trabalho (IL-12/40, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-17, IL-10 e TGF- β). Foi utilizado peso de DNA de 100 pb; em branco representamos controle negativo de reação.

Fonte: Autoria própria.

Conduzimos então com as análises de expressão gênica e observamos que, aos 35dpi, houve aumento na expressão de IL-12/p40, IFN- γ e TNF- α nos grupos infectados com as maiores doses. Por outro lado, no grupo RE 250, houve aumento da expressão de IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10 e TGF- β semelhante aos grupos PI 2500 ou RE 2500 (**Figura 55 A**). Aos 100 dpi, a expressão entre RE 250 e PI e RE 2500 foi semelhante nas citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-17, IL-10 e TGF- β , enquanto o grupo PI 250 obteve aumento de IL-12/40, TNF- α maior em relação ao restante dos grupos (**Figura 55 B**). Em conjunto, estes resultados reforçam a natureza mista da resposta imune contra a infecção por *A. suum*, principalmente aos 100 dpi alterando o ambiente do tecido hepático.

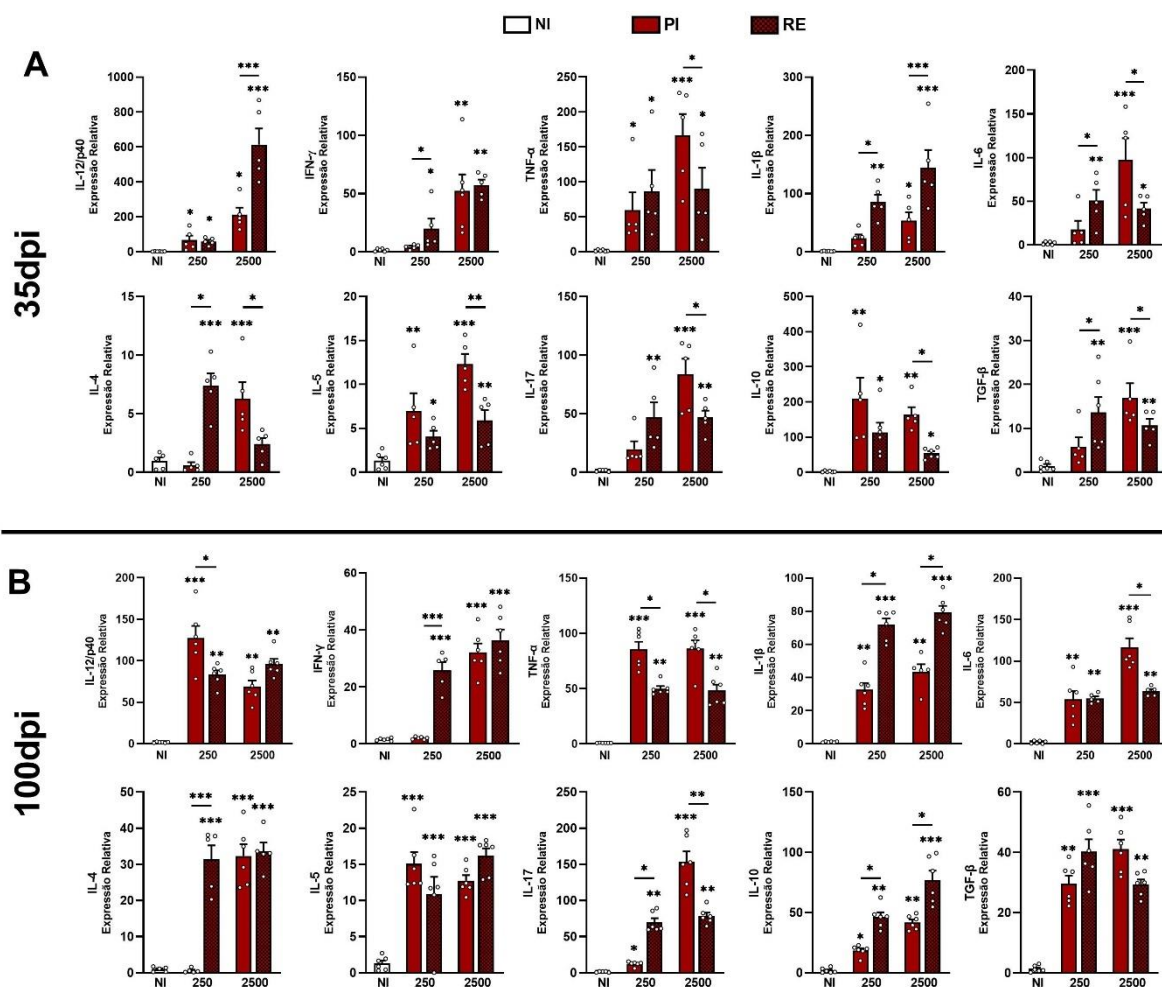


Figura 55: Níveis de expressão relativa de citocinas no fígado de camundongos primoinfectados e reinfectados com diferentes doses de ovos de *A. suum* aos 35dpi e 100dpi. (A) Expressão de citocinas aos 35 dpi; (B) Expressão de citocinas aos 100dpi. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (S.E.M). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA com pós Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 100 dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre os demais grupos com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.5.5 Após 35dpi os danos causados pela infecção do *A. suum* promovem um mix de resposta Th1/Th2 sistêmica associado a dose infecciosa e frequência de exposições

Diante dos resultados apresentados, direcionamos o olhar para as alterações no perfil de citocinas sistêmicas (IL-2, IFN, TNF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A e TGF- β) aos 35 dpi. Nossos resultados revelaram cenários intrigantes nos diferentes grupos experimentais. Observamos que a maior dose de ovos (2500) promove aumento de citocinas sistêmicas, especialmente na reinfecção. Aos 35 dpi observamos aumento de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10

exacerbado no grupo RE 2500, enquanto IL-2, IL-6 e IL-17 exacerbaram no grupo PI 250 (Figura 56). Apesar dos níveis não elevarem igual aos grupos infectados com doses elevadas, houve alteração nos níveis de IL-2, IL-6 e IL-10 em comparação ao grupo NI enquanto IL-4 e IL-17 aumentaram após a reinfecção com 250 ovos (Figura 56A). Esses dados demonstram que apesar das menores doses não induzirem uma resposta inflamatória intensa, há alteração nos níveis de citocinas que persistem aos 35 dpi (Figura 56 A). Além disso, destacamos que aos 100dpi, sistemicamente houve aumento de IL-2, TNF, IL-4, IL-17 e IL-6 em todos os grupos independente da dose e quantidade de exposições (Figura 56 B). Citocinas como TGF- β , apesar de alta em todos os grupos, exacerbaram mais os níveis nos grupos PI/RE 250 e PI 2500, e IL-13 elevou apenas nos grupos RE 250 e PI 2500, enquanto IL-10 e IFN- γ elevaram apenas no grupo RE 2500 (Figura 56 B).

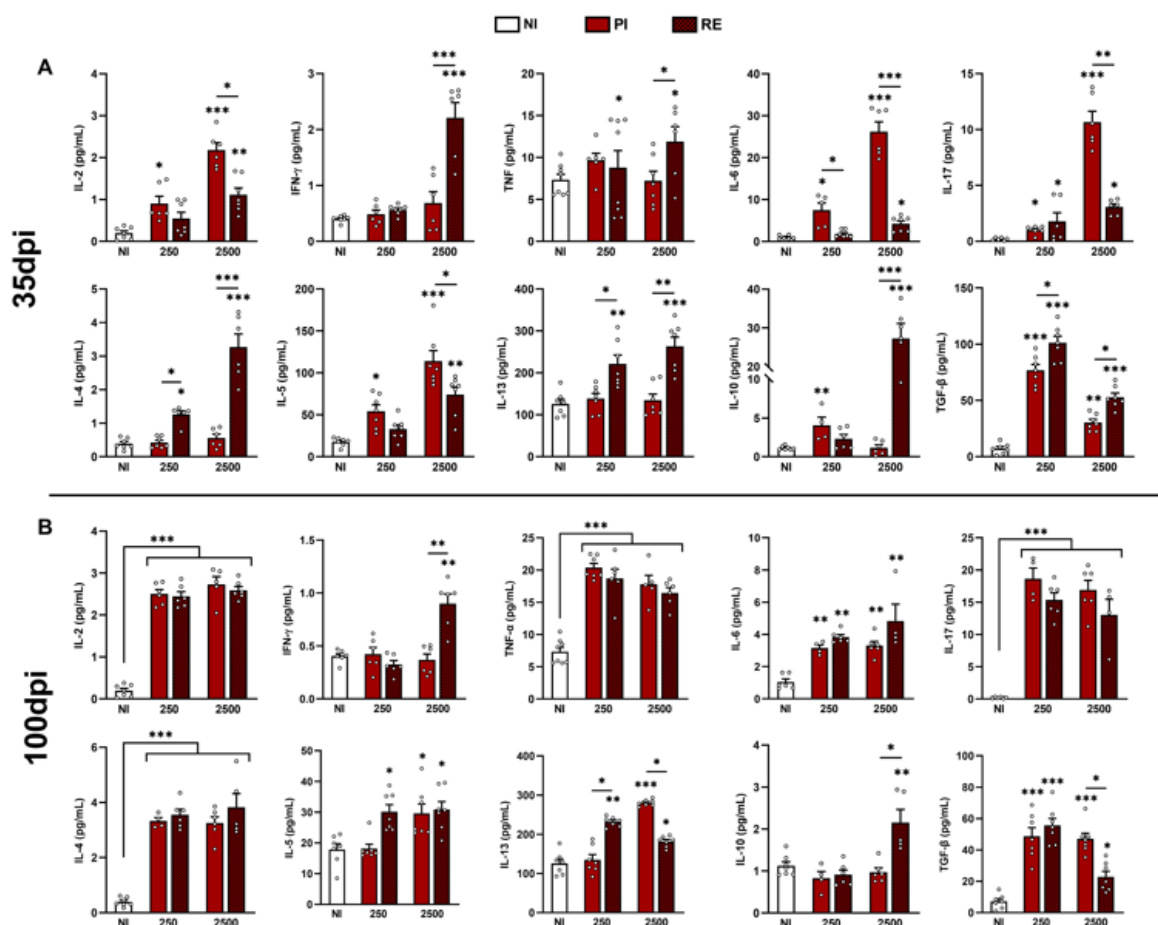


Figura 56: Perfil de produção de citocinas sistêmicas de camundongos BALB/c primoinfectados e reinfetados por *A. suum* com diferentes doses após 35 dpi e 100dpi. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média SEM. Para as análises estatísticas, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos NI e as respectivas doses aos 35 dpi. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo NI é representado por asterisco sem barra, e entre grupos com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

8.6 Discussão

Os impactos da ascaridose podem estar subestimados e numerosos fatores relacionados à resposta imune podem resultar em diferentes condições clínicas (Magalhães et al., 2021). Apesar disso, destacamos que estudos relacionados à essa doença, em comparação com outras DTNs, são escassos, especialmente no que diz respeito às consequências da resposta inflamatória crônica que recentemente em modelo murino tem demonstrado importância no surgimento de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNTs) (Wu et al., 2021; Oliveira et al., 2024).

Neste capítulo, visando elucidar o papel de diferentes doses e quantidade de exposições na inflamação crônica promovida por *A. suum* na progressão do câncer de mama triplo-negativo, a realização desta etapa foi crucial para caracterizar os aspectos envolvidos nesse processo e preencher algumas lacunas presentes na literatura. Aspectos fisiopatológicos e imunológicos da inflamação por *A. suum* têm sido explorados em diferentes estudos, porém apenas no pico da migração larval nos tecidos (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Nogueira et al., 2016; Gazzinelli-Guimarães et al., 2018; Oliveira et al., 2019; Castro et al., 2023) enquanto poucos exploraram tempos após a migração larval (Wu et al., 2021; Oliveira et al., 2024). Além disso, muitos estudos avaliam o papel da infecção utilizando uma alta carga de 2500 ovos, e poucos estudos avaliam a infecção com doses mais baixas, o que reflete melhor o cenário de infecção natural em humanos (Lewis et al., 2009; Amorim, 2021).

Dessa forma, demonstramos que a ascaridose a longo prazo afeta o hospedeiro de diferentes maneiras e o prognóstico está associado à dose infecciosa e ao número de exposições ao parasito, assim como demonstrado por Amorim (2021) no pico da migração larval. Ao monitorarmos a variação de peso e os sinais clínicos dos animais, observamos que a dose mais alta, independentemente do número de exposições, resultou em perda de peso ao longo dos dias da migração larval seguidos de sinais clínicos mais pronunciados e recuperação mais rápida. Este achado é consistente com os resultados descritos por Vieira-Santos et al. (2021) em animais primoinfectados com a mesma dose. Por outro lado, apenas um estudo conduzido por Lewis et al. (2009) demonstra o impacto de doses menores na variação de peso dos animais até o 8º dpi. Em nosso trabalho, os animais infectados com 250 e 1250 ovos não apresentaram perda de peso nesse período, conforme evidenciado por esses autores, porém, ao longo dos 80 dias de avaliação, observamos atraso no ganho de peso dos animais desses grupos.

Adicionalmente, aos 35 dpi nos grupos primoinfectados com as menores doses, também observamos a presença de anemia associada a hemorragia nos pulmões. Achados semelhantes

foram descritos por Nogueira et al. (2016) em animais infectados com altas doses aos 8 dpi e, na reinfecção, observaram ausência dessa condição devido a diferentes mecanismos de reparo. Nossos dados após esse período sugerem recuperação aos 35 dpi dos animais primoinfectados com alta dose, mas com quadro persistente nos animais infectados com menores doses, o que relacionamos com atraso na recuperação do ganho de peso. Digno de nota, a anemia é altamente prevalente em crianças infectadas por geohelmintos (Sousa-Figueiredo et al., 2012; Loukas et al., 2016; Degarege et al., 2022), incluindo em infecções por *Ascaris* spp. (Djuardi et al., 2021). Esta condição pode levar ao cansaço, fraqueza, tontura e falta de ar, assim como já observado em crianças com ascaridose (Marques et al., 2020; Degarege et al., 2022).

Resultados descritos por Amorim (2021) sugerem que o uso de doses mais baixas, como a de 250 ovos, em modelo murino mimetiza o cenário real de infecção quando comparado a dose de 2.500 ovos. Com base nos nossos dados pós-pico da migração de larvas, levantamos preocupações sobre o impacto da ascaridose aguda em crianças em fase de crescimento, uma vez que a doença é mais prevalente nessa faixa etária (Rajagopal et al., 2014). Além disso, muitas dessas crianças vivem em áreas com outras doenças parasitárias, como a malária, que também contribuem com o surgimento de anemia, podendo agravar o prognóstico. Isso foi observado em estudo experimental realizado por Vieira-Santos et al. (2021), onde a infecção concomitante por *A. suum* e *Plasmodium berghei* NK65 resultou em agravo do quadro.

Embora não tenhamos observado anemia em animais infectados com 2.500 ovos, encontramos um aumento no número de macrófagos com hemossiderina em comparação com os outros grupos, tanto na histopatologia do pulmão quanto no BAL. Este aumento também foi relatado por Wu et al. (2021) em grupos infectados com 2.500 ovos aos 100dpi após uma única exposição. A presença de anemia e macrófagos com hemossiderina meses após a infecção foi atribuída ao aumento da permeabilidade vascular causada por *A. suum*. Contudo, a anemia não foi observada em nosso modelo utilizando 2.500 ovos aos 35 dpi ou 100dpi.

Esses dados sugerem que uma maior carga parasitária e um maior número de exposições são capazes de desencadear uma resposta imune intensa, levando a mecanismos de reparo mais rápidos, conforme indicado pelas curvas de variação de peso, resultados de celularidade no BAL e áreas de infiltrado inflamatório e de fibrose nos pulmões e no fígado. Para as doses de 250 e 1250 ovos, nossos dados sugerem que a baixa exposição aos parasitos não resulta em danos intensos ao hospedeiro, mas demonstram persistência de danos por mais tempo.

Além desses resultados, observamos que a infecção por *A. suum*, independente da dose de infecção e quantidade de exposições, resulta em infiltração de leucócitos no tecido presente

aos 100 dpi tanto no pulmão quanto no fígado, mas em menor intensidade quando comparado aos 35 dpi. Com isso, observamos diferenças na dinâmica de citocinas nos tecidos de acordo com a dose de infecção e quantidade de exposições. Citocinas do tipo 2 como IL-5 e IL-13 e, regulatórias, como IL-10, são cruciais para controlar infecções helmínticas (Yasuda et al., 2012; Johnston e Bryce, 2017). Isso já foi observado em estudos com *Toxocara canis* (Ruiz-Manzano et al., 2019; Leal-Silva et al., 2021; Leal-Silva et al., 2022), *Necator americanus* (Geiger et al., 2007; Geiger et al., 2011), *A. lumbricoides* (Cooper et al., 2000) e *A. suum* (Gazzinelli-Guimaraes et al., 2013; Nogueira et al., 2016). A IL-10, além de seu papel na resposta ao *A. suum*, também é importante nas infecções por *Trichuris muris* e *Schistosoma mansoni*, envolvendo a imunomodulação das respostas Th1 e Th17 (Bradley et al., 2005; Wilson et al., 2011). Estudos anteriores também demonstraram a importância da IL-17 no controle das respostas helmínticas, como *S. japonicum* (Chen et al., 2013), *T. canis* (Resende et al., 2015; Leal-Silva et al., 2022) e *A. suum* (Nogueira et al., 2016). No entanto, a persistência de IL-17 no pulmão no grupo reinfestado com a menor dose pode estar associada ao aumento da fibrose, como evidenciado anteriormente (Wilson et al., 2010; Murdock et al., 2011; Zhang et al., 2015; Nogueira et al., 2016). IL-17 também promove aumento de neutrófilos nos tecidos (Cosmi et al., 2016; Borish, 2016), o que relacionamos com o aumento de MPO no pulmão no grupo PI 1250.

De acordo com os nossos achados, os níveis de IL-5, IL-13 e IL-10 diminuem aos 35 dpi de acordo com a administração de doses mais altas ou com o aumento na quantidade de exposições. Isso não significa que doses altas não promovam o aumento dessas citocinas, até porque no pico da infecção já foi relatado aumento dessas citocinas (Nogueira et al., 2016). Devido a esses achados, acreditamos fortemente que as doses mais baixas não resultam em danos mais intensos nos tecidos, mas induzem uma resposta mais lenta em comparação aos grupos que receberam doses mais altas ou que foram expostos mais de uma vez ao parasito. Como consequência, altas doses de ovos induzem uma resposta mais rápida em comparação com as doses mais baixas, mas isso leva à persistência de células remanescentes no tecido.

Também destacamos que esse padrão de citocinas observadas aos 35 dpi indica uma patologia inflamatória pulmonar crônica tipo 2, semelhante a doenças alérgicas das vias aéreas, consistente com achados anteriores relatados por Zhu (2015). Embora se saiba que nessa fase da doença as larvas de *Ascaris* spp. não estão mais presentes no pulmão (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013; Wu et al., 2021) a resposta imune observada neste ponto é ativada graças aos antígenos do parasito retidos no tecido (Oliveira et al., 2024), desencadeando resposta crônica.

A capacidade da ascaridose em induzir uma resposta polarizada tipo 2 e causar doenças pulmonares alérgicas já está estabelecida na literatura (Nogueira et al., 2016; Weatherhead et al., 2018; Gazzinelli-Guimaraes et al., 2019; Gazzinelli-Guimaraes et al., 2021).

Em nosso trabalho também observamos danos fisiológicos nos animais. Aos 100 dias foi possível observar problemas associados à fisiologia hepática devido ao aumento de bilirrubina direta e fosfatase alcalina. De fato, descrições associadas a obstrução e estenose do ducto biliar já foram associadas a ascaridose (Leung; Chung, 1988; Das, 2014), mas na presença do verme adulto. Aqui, reportamos que apenas as consequências da fase larval levaram a patologia hepática persistente com alteração de marcadores bioquímicos, proliferação de ductos biliares e expressão de genes que codificam proteínas da resposta inflamatória, juntamente com infiltrado inflamatório. Juntos, esses resultados sugerem a formação de doença colestática. Além disso, destacamos que a maioria dos trabalhos são focados no pulmão e estudos relacionados ao fígado ainda são limitados.

Na espirometria, observamos um padrão semelhante aos parâmetros patológicos encontrados no enfisema, conforme demonstrado por Wu et al. 2021, caracterizado por aumento da elasticidade pulmonar indicado por redução da resistência pulmonar (RI) e aumento da complacência (Cchord e Cdyn) (Papandrinopoulou et al., 2012). Em nossos resultados, parâmetros como índice de Tiffeneau (FEV50/FVC), Cdyn, Cchord e RI apresentaram um padrão semelhante à Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Shan et al., 2014; Yuan et al., 2015). Essa associação entre infecções helmínticas e doenças pulmonares crônicas como o enfisema foi descrita por Marsland et al. (2008) que demonstraram uma ligação entre a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* e o desenvolvimento de enfisema.

Em nosso estudo avaliamos diferentes doses (250, 1250 e 2500) na primoinfecção e reinfecção por até 100 dpi. Um achado importante foi a presença de dano pulmonar persistente a 100 dpi, independentemente da dose. Nossos resultados indicam que cargas variadas de ovos de *A. suum* podem induzir uma patologia inflamatória tipo 2, formação de fibrose persistente e, consequentemente, levar a doença pulmonar crônica semelhante à descrita por outros autores (Marsland et al., 2008; Wu et al., 2021). Por outro lado, além de RI, Cdyn e Cchord, nossas observações nos exames histopatológicos não indicaram a presença de corpos enfisematosos e devido ao padrão da inflamação causada por *A. suum*, consideramos que na mecânica respiratória há o surgimento de alterações compatíveis com DPOC, mas com padrão misto que foi confirmado aos 100 dpi, principalmente nas doses mais baixas devido ao aumento das áreas de fibrose.

A fibrose leva ao aumento da expressão de colágeno no tecido (Jessen et al., 2021). Devido a isso, acreditamos que esse fenômeno observado nos animais está diretamente associado ao aumento da complacência pulmonar, principalmente nos grupos RE 250. O atraso nos mecanismos de reparo em doses mais baixas pode ter contribuído para o acúmulo de mais danos, acabando por exacerbar a doença aos 100 dpi.

Considerando nossos achados e os observados por Wu et al. (2021), é concebível que, além do tabagismo, em regiões endêmicas onde ocorrem reinfecções, a ascaridose possa ser considerada um fator de risco para o surgimento de doença pulmonar crônica com parâmetros semelhantes ao DPOC. No entanto, mais estudos, incluindo aqueles envolvendo seres humanos, são necessários para melhor compreender este fenótipo. Outro achado importante em nosso trabalho foram os níveis semelhantes de IgG em doses mais baixas, mas na reinfecção. Mostramos que os níveis são mantidos até 100 dpi. Além de serem favoráveis ao cenário real, esses dados podem favorecer estudos com vacinas em baixas doses sem causar tantos danos ao hospedeiro.

8.7 Conclusão

Aqui demonstramos que a infecção por *A. suum* na ausência de larvas, mesmo tempos após a infecção promove inflamação crônica e resulta em danos sistêmicos e teciduais que resulta em doenças crônicas, como doenças pulmonares semelhantes ao DPOC e fibrose, e no fígado os achados foram sugestivos de doença colestática e também de fibrose hepática (**Figura 57 e 58**). Revelamos que essas alterações impactaram na fisiologia desses tecidos e que ainda persistiam mesmo aos 100 dias pós infecção. Também observamos que apenas duas infecções com doses de 250 ovos conseguem desencadear um fenótipo semelhante ao observado com a dose comumente utilizada de 2500 ovos, porém com danos reduzidos ao hospedeiro, mas resultando em patologia semelhante. A utilização dessas doses menores, sugerem melhor reflexão do ambiente de infecção natural. Acreditamos que nossas descobertas neste capítulo contribuam com a compreensão das implicações a longo prazo resultantes da infecção por *A. suum* e possibilitem novas ferramentas para utilização de doses menores que mimetizem melhor o cenário de infecção natural que possam abrir caminhos para estudos de estratégias mais eficazes de controle e intervenções contra essa infecção.

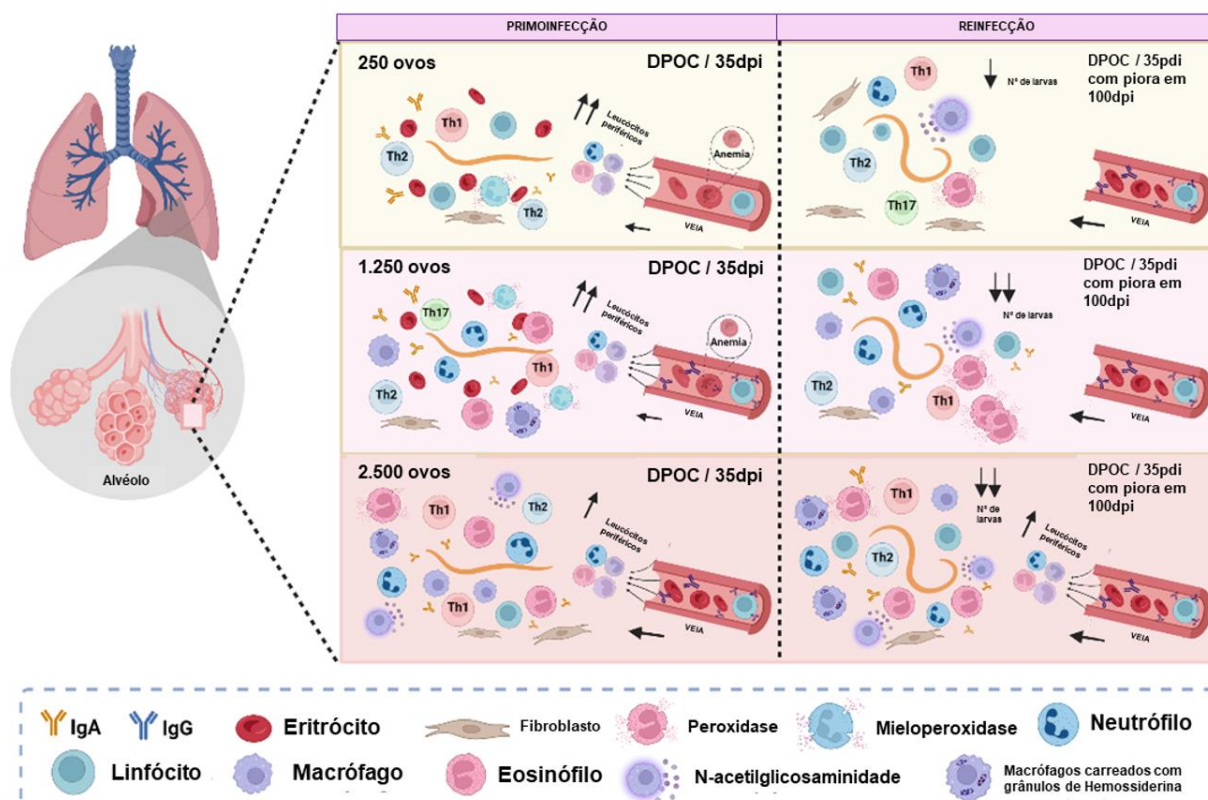


Figura 57: Visão geral das respostas inflamatórias sistêmicas e pulmonares provocadas por diferentes doses de infecção por *Ascaris suum* durante cenários de infecção (Primo e Re), em 35 dpi e 100 dpi. Após a ingestão de ovos embrionados de *A. suum*, as larvas eclodem no intestino e migram para os pulmões pela corrente sanguínea, com pico de migração larval alveolar ocorrendo após 7 dias de infecção, causando lesão pulmonar duradoura. A infecção única com 250 ovos provoca uma resposta inflamatória sistêmica, marcada pelo aumento de leucócitos circulantes e anemia. O tecido pulmonar mostra hemorragia e inflamação, devido a uma resposta mista Th1/Th2. Uma dose intermediária leva a uma resposta inflamatória mais forte, com níveis mais altos de leucócitos e anemia. O tecido pulmonar exibe dano tecidual e inflamação devido a uma resposta mista Th1/Th2/Th17 e hemorragia. Uma infecção de alta dose desencadeia uma resposta inflamatória grave, com aumento de leucócitos e ausência de anemia. O tecido pulmonar mostra inflamação e dano extensos, com uma resposta Th1/Th2 mista. Anemia e hemorragia estão ausentes, possivelmente devido à rápida remodelação do tecido e fibrose. A reinfecção com a dose mais baixa de ovos desencadeia uma resposta inflamatória mais branda do que a infecção inicial, sem anemia e hemorragia. O tecido pulmonar exibe inflamação moderada, migração larval reduzida, uma resposta Th1/Th2/Th17 mista e fibrose significativa. A doença pulmonar obstrutiva se desenvolve persistindo até 100 dpi. A reinfecção com uma dose intermediária resulta em uma resposta inflamatória grave, com uma redução significativa no número de larvas e uma resposta Th1/Th2 mista. A doença pulmonar obstrutiva está presente em 35 dpi e persiste até 100 dpi. A reinfecção com uma infecção de alta dose leva a uma resposta inflamatória exacerbada, aumento adicional de leucócitos teciduais e uma resposta Th1/Th2 mista. O tecido pulmonar apresenta inflamação grave, redução acentuada na migração larval e resposta mista Th1/Th2, com doença pulmonar obstrutiva persistindo por 100 dpi.

Fonte: Autoria própria.

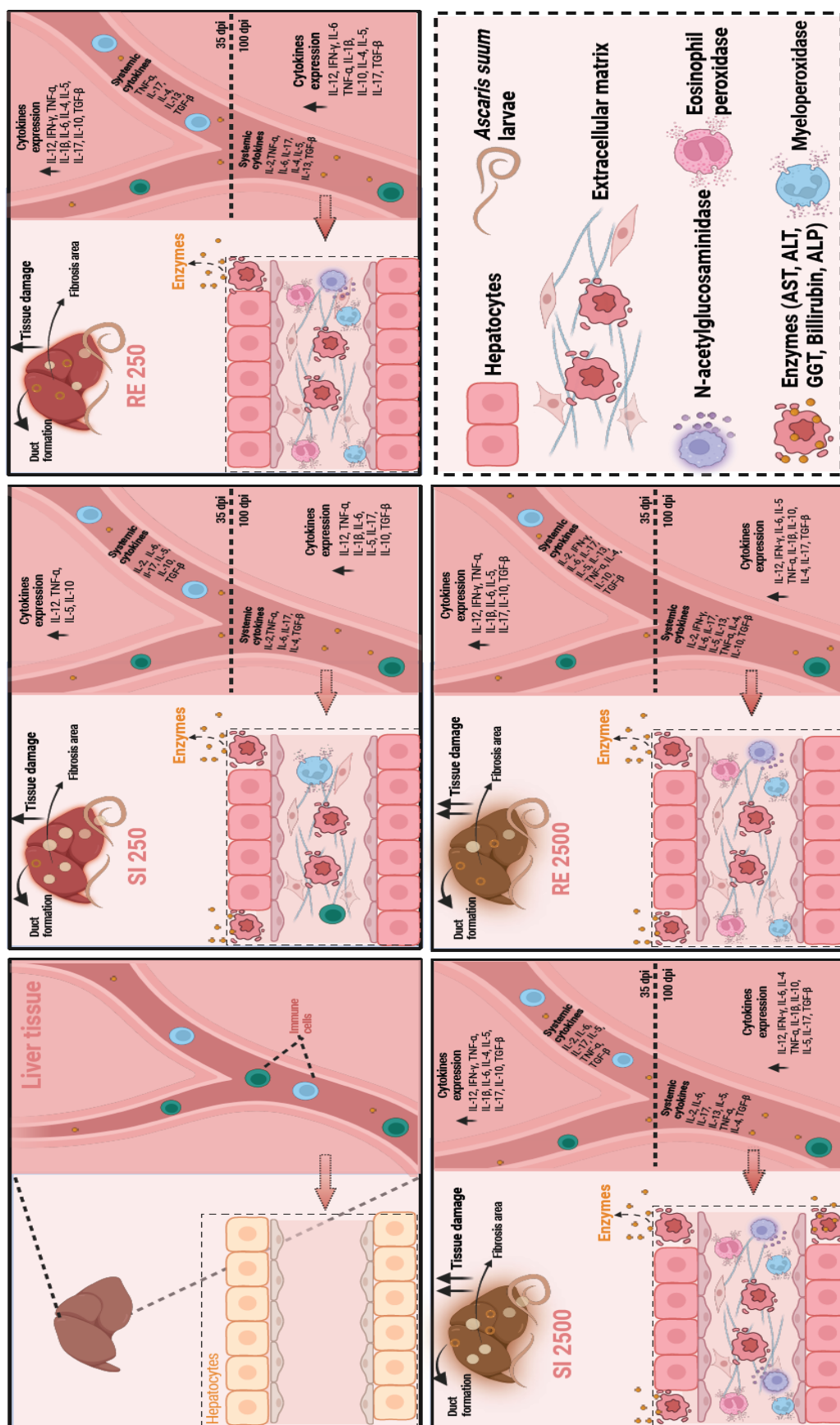


Figura 58: Visão geral das respostas inflamatórias sistêmicas e hepáticas provocadas por diferentes doses de infecção por *Ascaris suum* durante cenários de infecção (Primo e Re), em 35 dpi e 100 dpi.
Fonte: Autoria própria.

CAPÍTULO III

**Papel da inflamação crônica causada por alta dose de infecção por *Ascaris suum* na
progressão do câncer de mama**

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Delineamento experimental

O terceiro capítulo deste trabalho, visou elucidar os aspectos imunobiológicos e fisiopatológicos da inflamação crônica após única exposição à alta dose de ovos (2.500) de *A. suum* no câncer de mama, conforme caracterizado no capítulo II. Para isso foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com oito semanas de idade. Os protocolos de uma única infecção seguiram a mesma padronização feita no item 4.7.2, acrescidos da indução do câncer após 14 dias da infecção (**Figura 59**). Para isso, 56 camundongos BALB/c fêmeas com oito semanas de idade foram divididos entre os grupos: **Controle (Ctl)**, composto por animais que receberam água filtrada no momento da infecção e que receberam injeção de RPMI estéril; **(4T1)**, grupo composto de animais que receberam água filtrada e receberam $1,0 \times 10^6$ células 4T1 no flanco esquerdo; **As**, grupo composto de animais infectados com 2500 ovos totalmente larvados de *A. suum* e sem indução de câncer; **As + 4T1**, composto de animais infectados previamente com 2500 ovos totalmente larvados de *A. suum* e que receberam injeção de $1,0 \times 10^6$ células 4T1 no flanco esquerdo (**Figura 59**). Aos 35 dias após a indução do câncer os animais foram eutanasiados para as respectivas análises divididos em grupos para coleta de órgãos, BAL, hematologia, e mecânica pulmonar (n=32, n=8 por grupo), e para os experimentos com radioisótopos (n=24, n=8 por grupo).

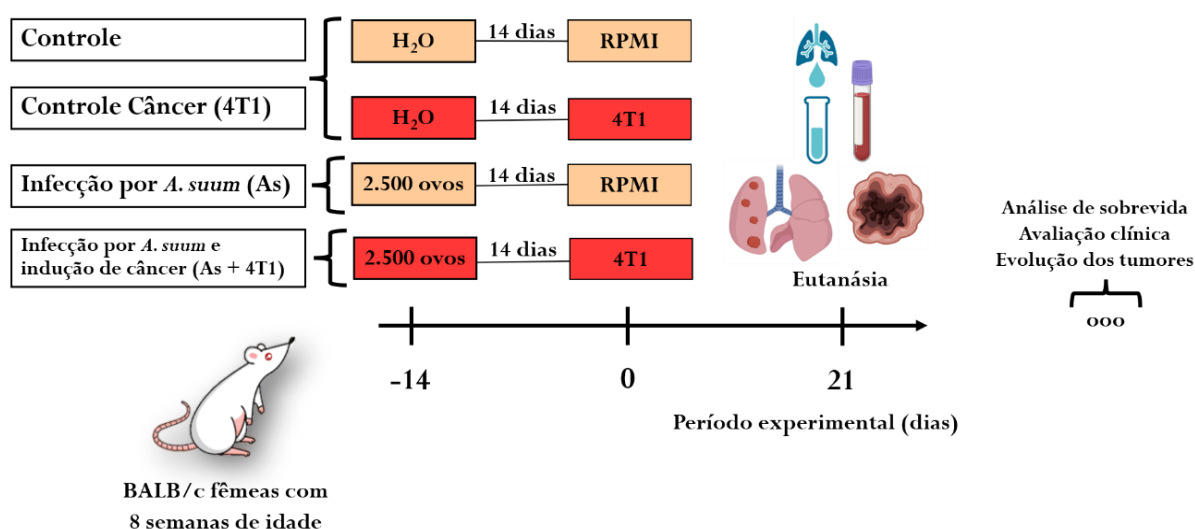


Figura 59: Delineamento experimental do capítulo III.

Fonte: Autoria própria.

9.2 A inflamação crônica impulsionada por altas doses de ovos de *A. suum* inibem o crescimento do câncer de mama e metástases em modelo experimental

Após a análise da dinâmica de infecção por *A. suum* em períodos pós-infecção, observamos que as doses mais elevadas impulsionam um aumento significativo da intensidade da inflamação sistêmica e local. Dessa forma, o terceiro capítulo deste trabalho teve como objetivo aprofundar a compreensão dos aspectos relacionados à inflamação causada pela exposição única em doses altas de ovos de *A. suum* e o impacto associado ao câncer de mama. Os resultados apresentados neste capítulo estão sendo preparados para submissão na revista **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** sob título: ***Impact of eosinophilia caused by high parasite burden of A. suum on progression of 4T1 murine breast carcinoma and metastases in lung*** (Apêndice).

9.2.1 Infecção prévia por alta dose de ovos de *A. suum* não influencia a sobrevivência de camundongos com carcinoma de mama, mas retarda o crescimento do tumor primário

Inicialmente, após infectar os animais e induzir o câncer, procedemos com a avaliação da sobrevivência entre os grupos. Os resultados indicam que a infecção prévia por *A. suum* não impacta na sobrevivência em comparação com o grupo 4T1, conforme evidenciado pela Hazard Ratio (HR) do grupo As + 4T1 em relação ao grupo 4T1 foi de 1,447 (**Figura 60 A**). Além disso, na avaliação de sinais clínicos ao longo da evolução dos tumores, também não observamos diferenças na evolução entre os grupos ao longo dos dias (**Figura 60 B**). No grupo 4T1, observou-se o surgimento de sinais aos 12 dias após a indução do câncer, enquanto no grupo As + 4T1, isso ocorreu aos 16 dias, ambos manifestando apenas piloereção. Ao longo do tempo, notamos o desenvolvimento de respiração anormal e tremores. Alguns animais, além dos sinais mencionados, também exibiram curvatura do tronco, principalmente próximo à data da morte (dados não mostrados).

Além do retardo no crescimento do tumor, observamos que os animais previamente infectados com *A. suum* apresentaram áreas ulceradas com evolução mais lenta comparado com o grupo 4T1 (**Figura 60 C e D**). Notamos o aparecimento de áreas ulceradas a partir do 10º dia pós indução em ambos os grupos, porém o grupo 4T1 a partir do 12º dia agravou em relação ao As + 4T1, e igualaram a formação da úlcera aos 24º dia (**Figura 60 C e D**).

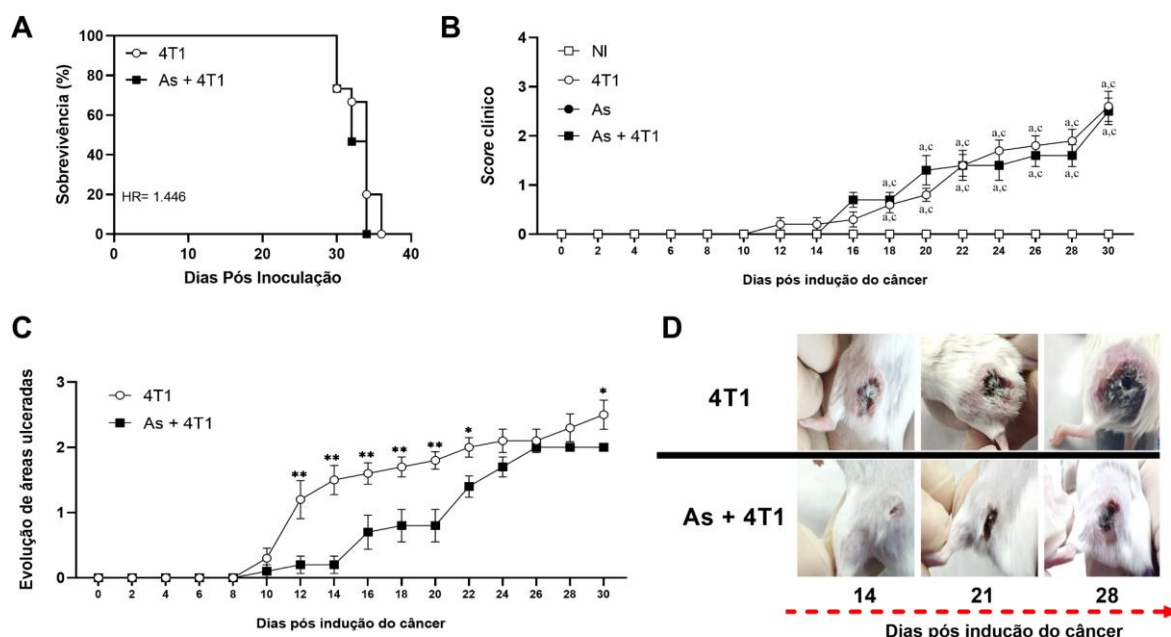


Figura 60: Aspectos clínicos da evolução do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c com ou sem exposição prévia à alta dose de ovos de *A. suum*. A: Curva de sobrevivência dos animais com câncer de mama expostos ao *A. suum* e sem infecção prévia; B: Evolução do Score clínico avaliado ao longo de 30 dias; C: Acompanhamento da evolução das áreas ulceradas no tumor primário ao longo de 30 dias; D: Representação das áreas ulceradas nos animais dos diferentes grupos aos 14, 21 e 28 dias após a indução do câncer. Para avaliação da sobrevida dos diferentes grupos, foi usado o teste de Log-rank (Mantel-Cox). Para avaliação da evolução do score clínico (B) foi feito o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Para avaliação das áreas ulceradas (C) foi usado o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo são representadas por asterisco e letra, sendo a) representa diferença com o grupo Ctl; b) representa diferença com o grupo 4T1; c) representa diferença com o grupo As; d) representa diferença com o grupo As + 4T1 ou diferenças entre o grupo 4T1 e As + 4T1 o asterisco indica diferença com o grupo 4T1. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Também identificamos variações na dinâmica de crescimento dos tumores entre os grupos, especialmente após o 14º dia após a inoculação, quando disparidades no tamanho dos tumores tornaram-se evidentes, sendo o grupo As + 4T1 com crescimento retardado em comparação ao grupo 4T1 (**Figura 61 A**). Utilizamos então o peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ radiomarcado com tecnécio aos 21 dias após a indução do câncer para observação de imagens cintilográficas, para medir a radiação no tumor e para complementar os resultados observados. As imagens cintilográficas evidenciaram a redução do tumor primário, corroborando com as análises *ex vivo*, as quais demonstram a captação da radiação aumentada no grupo 4T1 em relação ao grupo com infecção prévia por altas doses de ovos de *A. suum* (**Figura 61 B e C**).

Além disso, avaliamos a atividade de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos no tumor. Os resultados demonstram que o grupo As + 4T1 induz uma resposta mais associada a macrófagos e eosinófilos, os quais podem estar relacionados ao controle da taxa de crescimento tumoral, enquanto não observamos diferenças na atividade de neutrófilos entre os grupos (Figura 61 D).

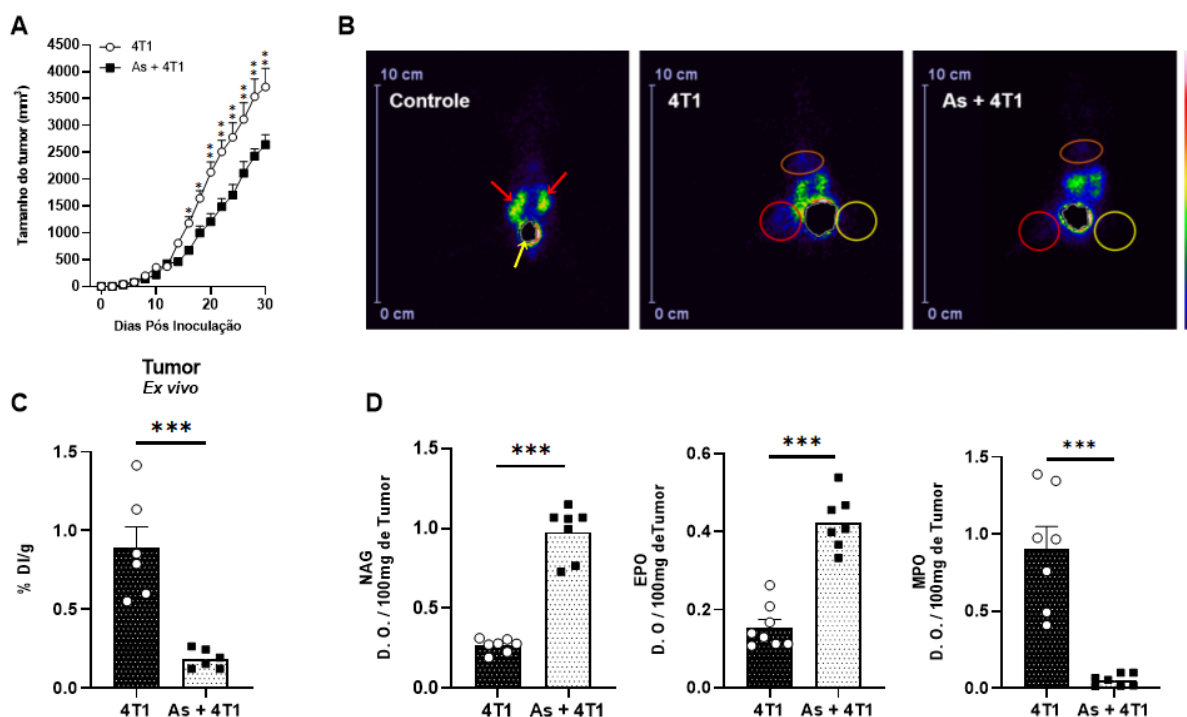


Figura 61: Dinâmica de desenvolvimento dos tumores em camundongos BALB/c com carcinoma de mama 4T1 expostos ou não previamente a infecção por *A. suum*. (A) Acompanhamento do crescimento do tumor em mm³ ao longo de 30 dias; B: Imagens cintilográficas representativas; C: Avaliação *ex vivo* do tumor primário; D: Atividade indireta de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos no tumor. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para avaliação das diferenças entre os grupos 4T1 e As+4T1 foi usado test-t. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre grupos são representadas por asterisco e barra ou só asterisco para indicar diferença com o respectivo grupo (A). Dados não significativos não foram mostrados. Setas vermelhas: depuração da HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ radiomarcada nos rins; Seta amarela: ROI da bexiga para melhor distribuição da captação de radiação; Círculo vermelho: indica a presença do tumor devido a captação de radiação; Círculo amarelo: representa o não alvo, local contrário a indução do tumor para evidenciar a diferença.

Fonte: Autoria própria.

9.2.2 Altas doses de ovos de *A. suum* resultam em intensa leucocitose com predomínio de eosinófilos e neutrófilos

Com base nos resultados anteriores que sustentam o aumento da atividade celular de macrófagos e eosinófilos no tumor primário, procedemos com a avaliação do perfil sistêmico

de leucócitos frente a infecção no modelo com carcinoma de mama. Notamos que apenas a indução do câncer é capaz de gerar um aumento significativo no número total de leucócitos, e a coexistência de infecção junto ao câncer também resulta em uma elevação um pouco mais pronunciada em comparação com o grupo 4T1 (**Figura 62 A**). Além disso, dosamos LDH no soro dos animais, pois esse marcador é potencialmente indicativo de aumento da atividade celular e destruição de células, o que corroborou com nossas observações, pois a dosagem de LDH se mostrou alta no grupo As + 4T1 (**Figura 62 B**). Ao realizar a contagem diferencial de células, notamos que tanto os grupos 4T1 quanto As + 4T1 aumentam o número de linfócitos de maneira semelhante (**Figura 62 C**). No entanto, o grupo As + 4T1 demonstra um aumento significativo no número de neutrófilos e eosinófilos em relação ao grupo 4T1, enquanto o grupo 4T1 eleva o número de monócitos em relação ao grupo As + 4T1, mas de forma menos acentuada (**Figura 62 D-F**). Esses padrões sugerem associações que podem estar relacionadas ao retardo no desenvolvimento do tumor.

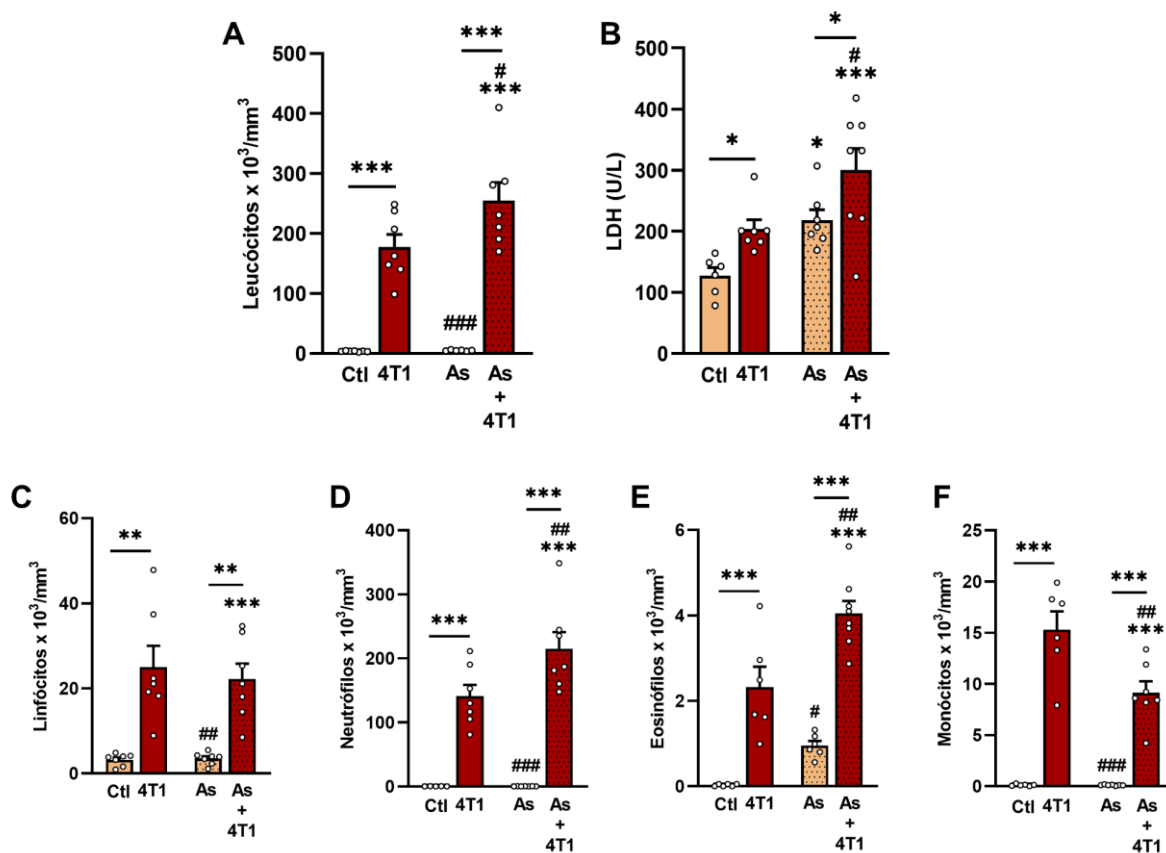


Figura 62: Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c com carcinoma de mama murino 4T1 e infectados com *A. suum* ou não, e seu impacto nos níveis séricos de LDH. (A) Número total de leucócitos; (B) Níveis séricos de LDH; (C) Contagem de linfócitos; (D) Contagem de neutrófilos; (E) Contagem de eosinófilos; (F) Contagem de monócitos. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para

avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

9.2.3 O carcinoma de mama murino resulta em hemorragia alveolar e anemia as quais são atenuados pela infecção prévia por altas doses de ovos de *A. summ*

Uma vez observada a dinâmica de crescimento do tumor entre os grupos e a influência no número de leucócitos sistêmicos, avaliamos possíveis alterações hematológicas nos animais. Um dos parâmetros avaliados foi o quantitativo de hemácias, onde observamos que no grupo 4T1 há diminuição em relação a todos os outros grupos, enquanto o grupo As + 4T1 foi maior em relação ao grupo Ctl e 4T1 (**Figura 63**). A dosagem de hemoglobina e hematócrito dos animais, especialmente no grupo 4T1 também foi menor em relação a todos os outros grupos, demonstrando a presença de anemia nos animais (**Figura 63**).

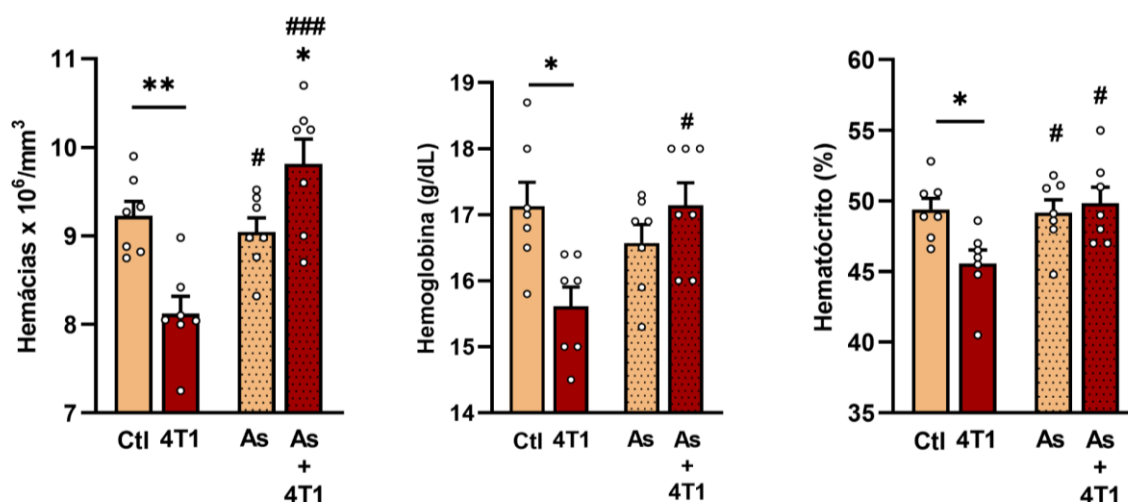


Figura 63: Análise hematológica de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4T1 e infectados com *A. suum* ou não. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos em cada dose. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Assim como observado no capítulo anterior, a anemia existente nos animais foi justificada pela presença de hemorragia alveolar e por isso avaliamos o Lavado Broncoalveolar (BAL). Os resultados evidenciaram a presença de hemorragia das vias aéreas nos animais 4T1

em comparação aos outros grupos por meio da dosagem de hemoglobina e proteínas totais. A presença de sangramento foi maior nos animais deste grupo quando comparado ao grupo controle e aos animais dos grupos As e As + 4T1, os quais exibiram níveis próximos do grupo controle (**Figura 64**). Além disso, houve também alteração nos níveis de proteína total na mesma proporção nesses grupos (**Figura 64**) o que também corroboram com nossos dados, assim como observado no capítulo anterior.

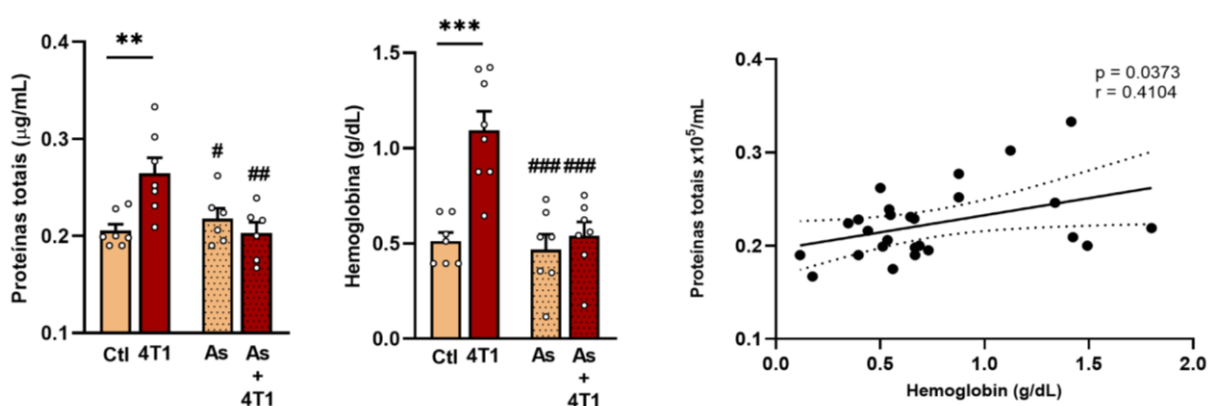


Figura 64: Avaliação da concentração de proteínas totais e hemoglobina no BAL de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4T1 e infectados com *A. suum* ou não. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/### $p < 0,01$ e ***/#### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Digno de nota, no capítulo anterior observamos que os animais com hemorragia alveolar apresentaram diminuição na celularidade do BAL enquanto os grupos com 2500 ovos não apresentavam esse quadro hemorrágico juntamente com aumento da celularidade. Devido a esse cenário, quantificamos os leucócitos totais no BAL e observamos que a infecção prévia por *A. suum* em animais com câncer, induz aumento da celularidade em relação ao grupo 4T1 assim como observado no capítulo anterior, o que foi correlacionado e corroborou com nossa hipótese (**Figura 65**).

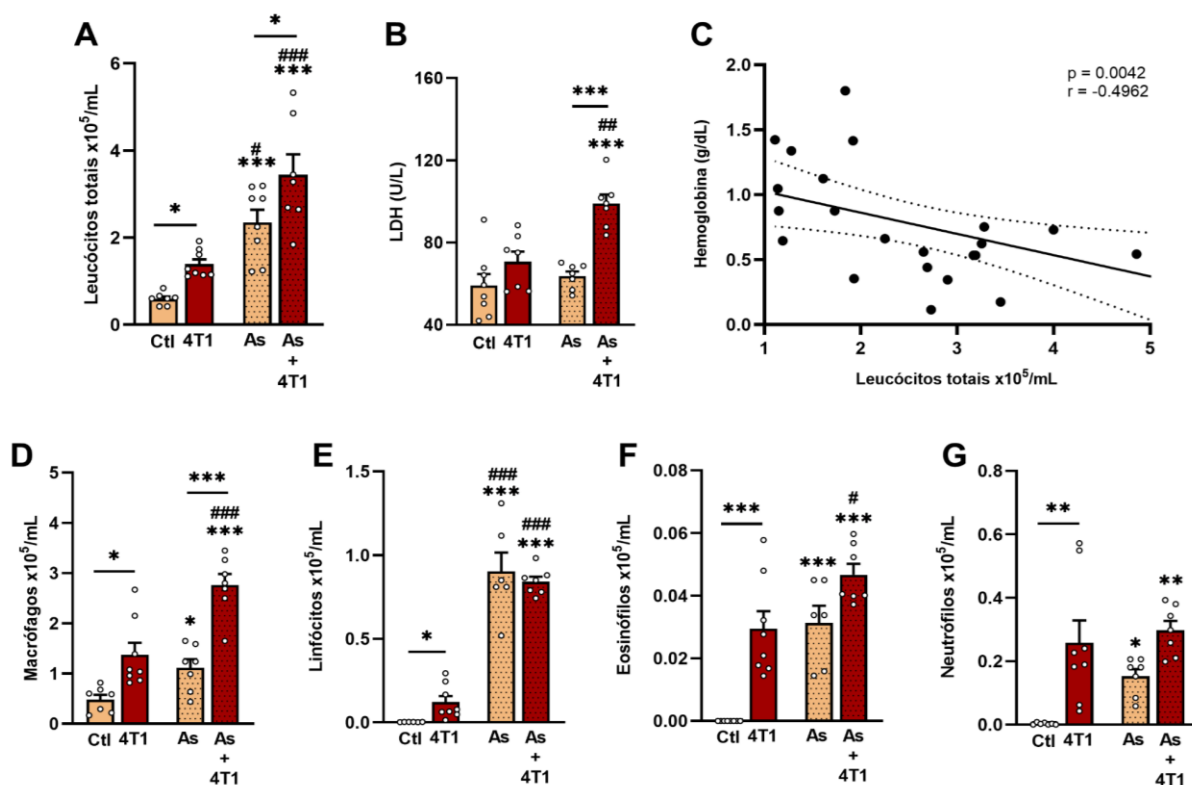


Figura 65: Contagem total e diferencial de leucócitos no BAL de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4T1 e infectados com *A. suum* ou não e seu impacto nos níveis séricos de LDH. (A) Número total de leucócitos; (B) Níveis de LDH; (C) Correlação entre níveis de hemoglobina e leucócitos totais; (D) Contagem de macrófagos; (E) Contagem de linfócitos; (F) Contagem de eosinófilos. (G) Contagem de neutrófilos. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Para correlação foi realizado o teste correlação de Pearson. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

9.2.4 Animais com carcinoma de mama 4T1 expostos previamente a infecção com altas doses de ovos de *A. suum* intensificam resposta inflamatória no fígado e inibem metástase hepática

Assim como no tumor primário, e sugestivo nas imagens cintilográficas (**Figura 61 B**) acreditamos que houve redução dos focos de metástase no fígado. Conforme discutido no capítulo I deste trabalho, a padronização da metodologia utilizando radioisótopos foi fundamental para este trabalho, especialmente para as metodologias envolvendo fígado. Nossos achados do capítulo I demonstraram que as metástases do 4T1 no fígado se exigem de forma multifocal, e até o momento não temos uma ferramenta tão bem padronizada quanto as ferramentas morfométricas padronizadas para pulmão. Assim, realizamos a contagem de

radiação diretamente no tecido dos animais (exame *ex vivo*) conforme padronizado para estabelecer redução ou não a redução do quadro de metástases no tecido. Nossas análises evidenciaram redução na contagem de radiação no tecido (**Figura 66 A**). Além disso, também realizamos as análises de atividade indireta de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, e observamos aumento significativo da resposta inflamatória no fígado, o que acreditamos ter contribuído diretamente com nosso achado de redução das metástases (**Figura 66 B**). Adicionalmente, o *Score* de lesão hepática não mostrou diferenças entre a infecção somente com *A. suum* e a exposição prévia ao *A. suum* e câncer (**Figura 66 C**).

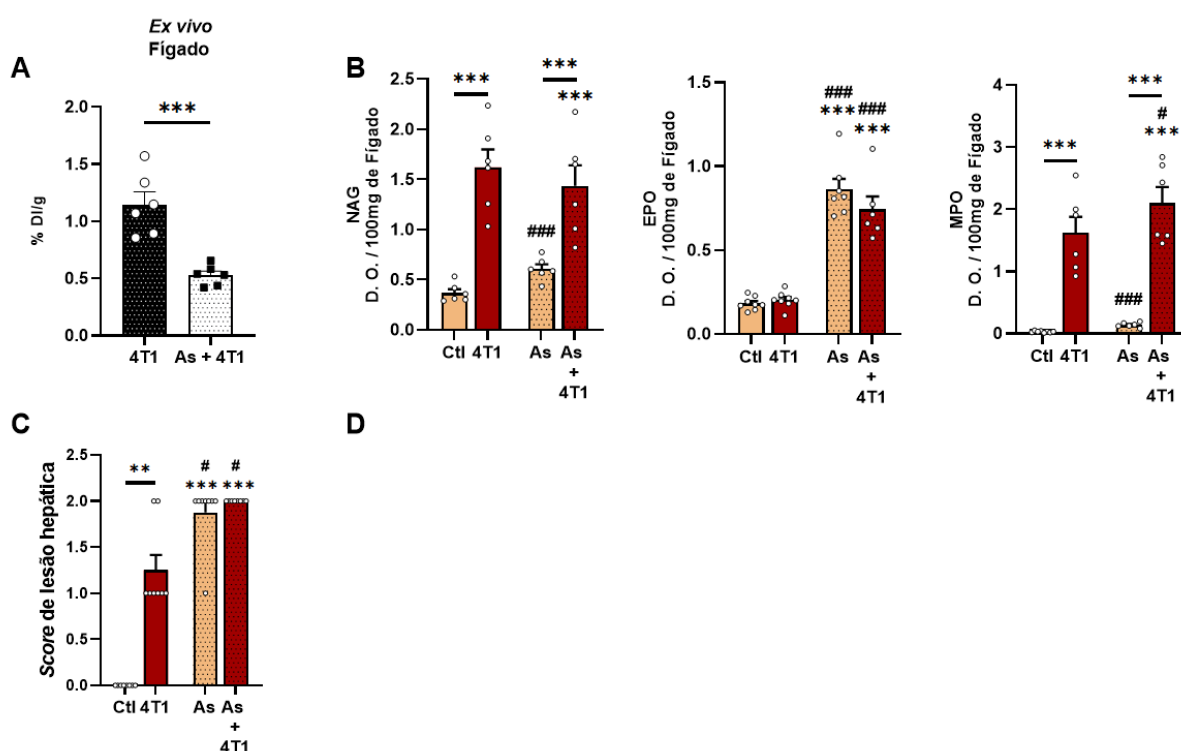


Figura 66: Avaliação da dinâmica de metástases hepáticas provenientes do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c expostos ou não a altas doses de ovos de *A. suum*. (A) Percentual de dose injetada (% DI/g) no fígado dos animais; (B) Atividade de NAG, EPO e MPO no fígado dos animais; (C) Score de lesão hepática nos animais. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas de comparação, foi utilizado o teste T em A, ou o teste o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey em B ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/# $p < 0,01$ e ***/#### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

9.2.5 Animais com carcinoma de mama 4T1 expostos previamente a infecção com alta doses de ovos de *A. suum* intensificam a resposta inflamatória no pulmão

Assim como no tumor primário, e com base nos achados na celularidade do BAL, acreditamos que houve aumento de resposta inflamatória no pulmão, o que contribuiu com nosso achado. Para isso, verificamos a atividade de NAG, EPO e MPO, onde a atividade de macrófagos foi elevada no grupo As + 4T1 em comparação aos outros grupos, o EPO não mostrou diferença entre a infecção por As e o grupo As + 4T1, porém ambos estavam mais altos em relação aos grupos controle (**Figura 67 A e B**). O MPO foi elevado nos grupos 4T1 e As + 4T1, o que nos levou a crer que o *Ascaris* não impulsiona a resposta de neutrófilos e por isso não afetou a evolução dessa resposta no grupo As + 4T1 (**Figura 67 A**).

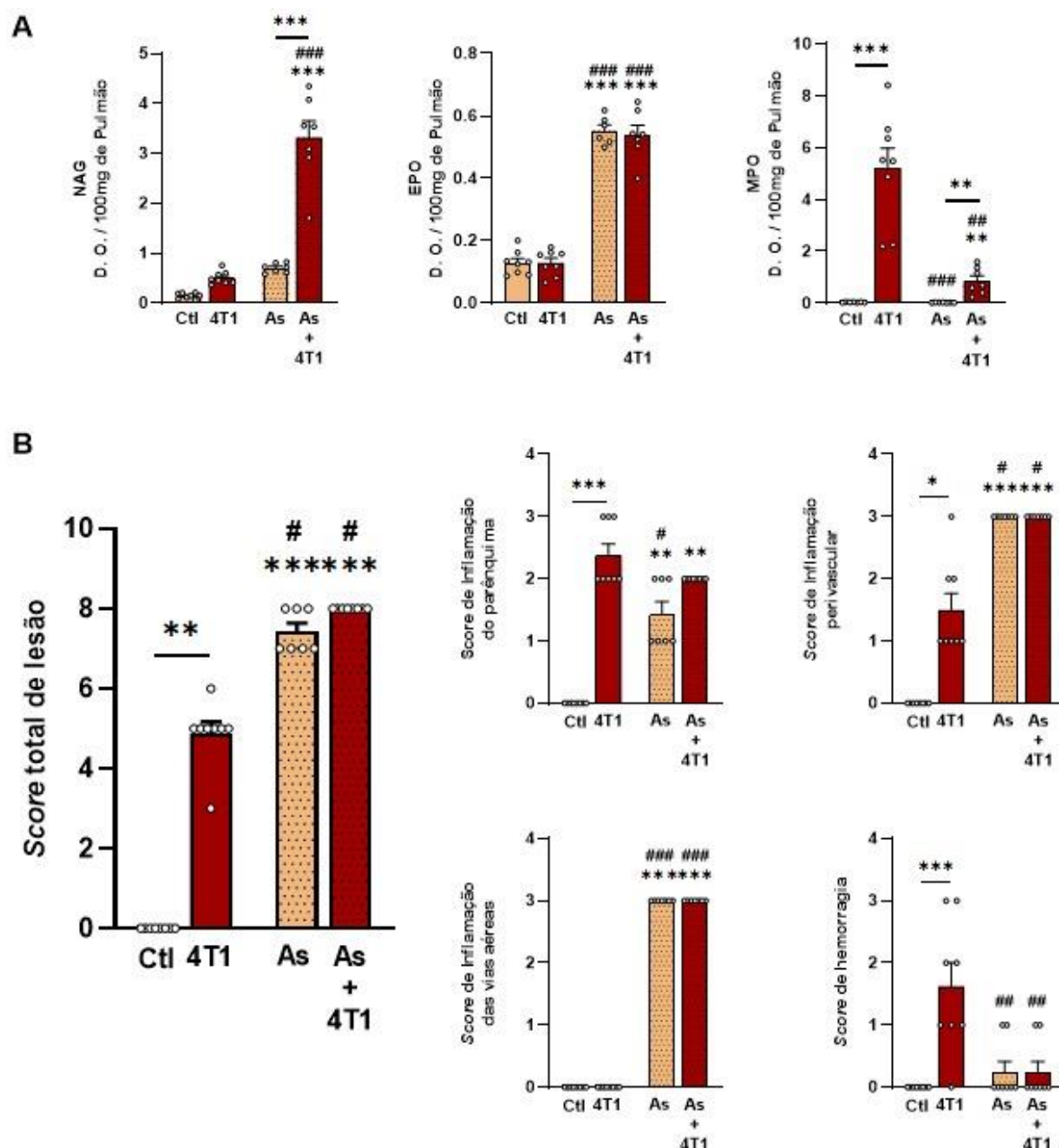


Figura 67: Avaliação da intensidade da inflamação no pulmão de camundongos BALB/c com carcinoma de mama expostos ou não a infecção prévia por altas doses de ovos de *A. suum*. (A) Determinação de NAG, EPO e MPO. (B) Score de lesão pulmonar. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/### $p < 0,01$ e ***/#### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

9.2.6 A infecção prévia por *A. suum* diminui a quantidade e a área de focos metastáticos no pulmão

Uma vez observado que aumento da celularidade induziu melhor reparo, e levando em consideração a evolução dos tumores dos animais As + 4T1, hipotetizamos que o retardo no crescimento dos tumores poderia também interferir de alguma forma na formação de metástases nos animais. Por tanto, avaliamos a dinâmica de evolução das metástases no nosso modelo. A partir das necropsias realizadas nos animais, observamos macroscopicamente a redução no número de metástases nos animais As + 4T1 (**Figura 68 A**). Para confirmarmos esse achado, avaliamos microscopicamente. Foi observado que mesmo as metástases estarem presentes, observamos que a quantidade de focos foi menor em relação ao grupo 4T1 e as mensurações resultaram em diminuição do diâmetro das áreas de metástase no grupo As + 4T1 (**Figura 68 B-E**).

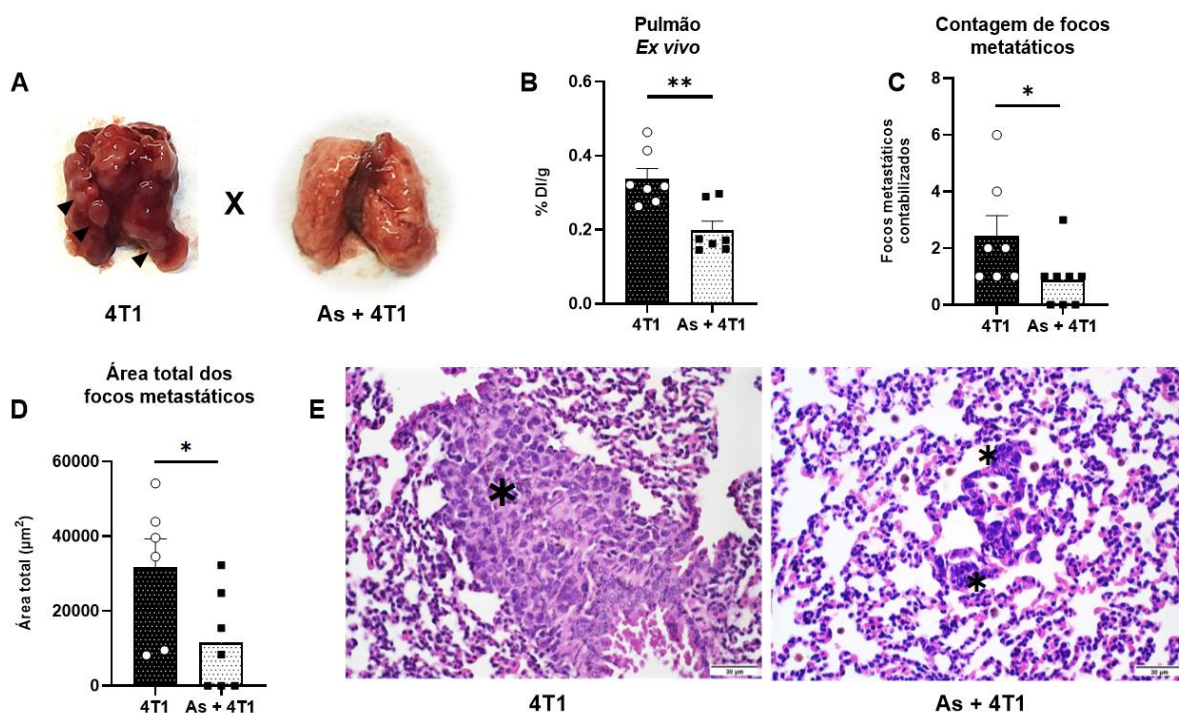


Figura 68: Avaliação da dinâmica de metástases pulmonares provenientes do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c expostos ou não a altas doses de ovos de *A. suum*. (A) Avaliação macroscópica das metástases, sendo as cabeças de setas indicando focos de macrometástases; (B) Percentual de dose injetada (% DI/g); (C) Contagem de focos metastáticos no pulmão; (D) Área total de focos metastáticos; (E) Histologia do pulmão com metástases grupo 4T1 e As+4T1, * indicam áreas de focos metastáticos no parênquima pulmonar. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas de comparação, o teste T foi utilizado. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

9.2.7 A infecção prévia por *A. suum* em modelo de carcinoma de mama murino exibem um mix de citocinas Th1/Th2/Th17 no pulmão

Para corroborar com nossos resultados, realizamos a dosagem de citocinas no sobrenadante do pulmão e observamos que a infecção prévia por *A. suum* pode influenciar a resposta imunológica, destacando uma complexidade na interação entre a infecção parasitária e a progressão do carcinoma de mama. Os animais do grupo As + 4T1 apresentaram um aumento significativo em comparação ao grupo 4T1 para as citocinas IL-2, IL-5, IL-3, TNF e IL-17. Notavelmente, os níveis de TGF- β foram elevados nos grupos 4T1, enquanto nos grupos As + 4T1 foram menores, e não houve diferença entre os grupos 4T1 e As + 4T1 nos níveis de IL-6 (Figura 69).

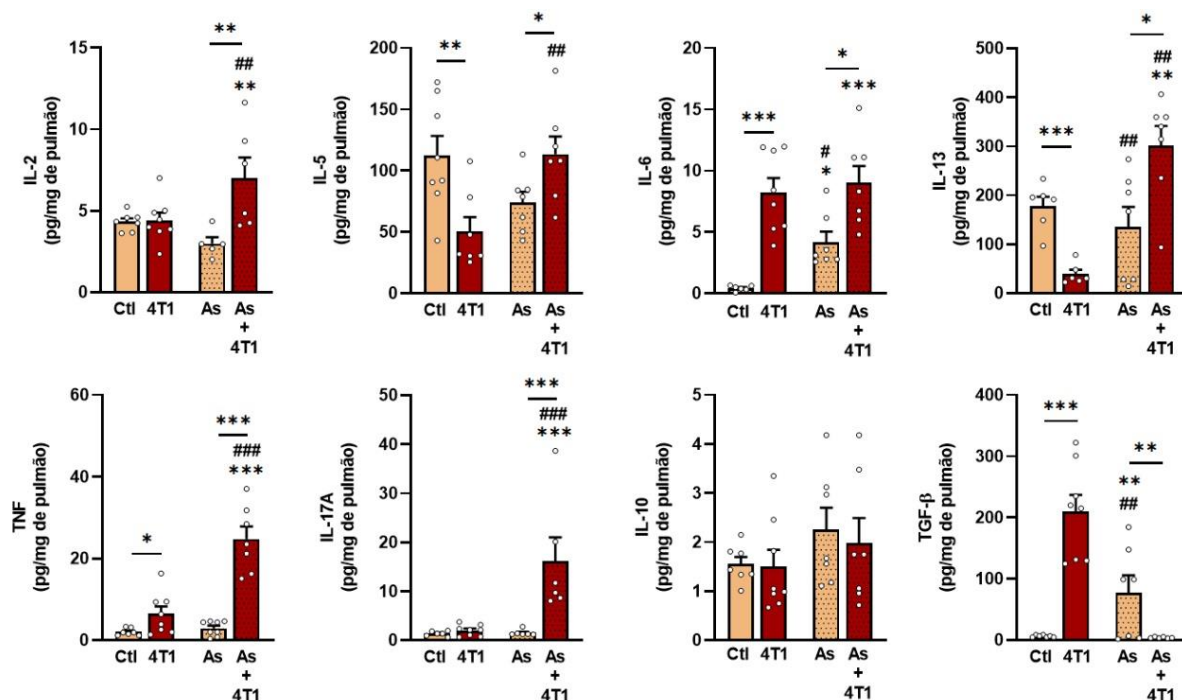


Figura 69: Perfil de produção de citocinas no pulmão de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4T1 e infectados ou não com *A. suum*. Dados apresentados em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

9.2.8 A infecção por *A. suum* impacta mais a função respiratória que as metástases decorrentes do câncer de mama

Devido ao aumento da intensidade da inflamação nos grupos expostos previamente por altas doses de *A. suum* avaliamos o impacto na função pulmonar. Surpreendentemente os resultados evidenciaram que somente a exposição impactam negativamente a função pulmonar devido a diminuição da resistência pulmonar e do índice de Tiffeneau, e aumento do volume corrente, capacidade inspiratória e complacência (Figura 70). Além da exposição prévia ao parasito, na presença do carcinoma de mama, observamos que ocorre melhora dos parâmetros pulmonares como a resistência pulmonar, volume corrente e o índice de Tiffeneau. Além disso, ao avaliar a capacidade inspiratória, complacência estática e dinâmica observamos que não há diferença entre o grupo As e As + 4T1 (Figura 70).

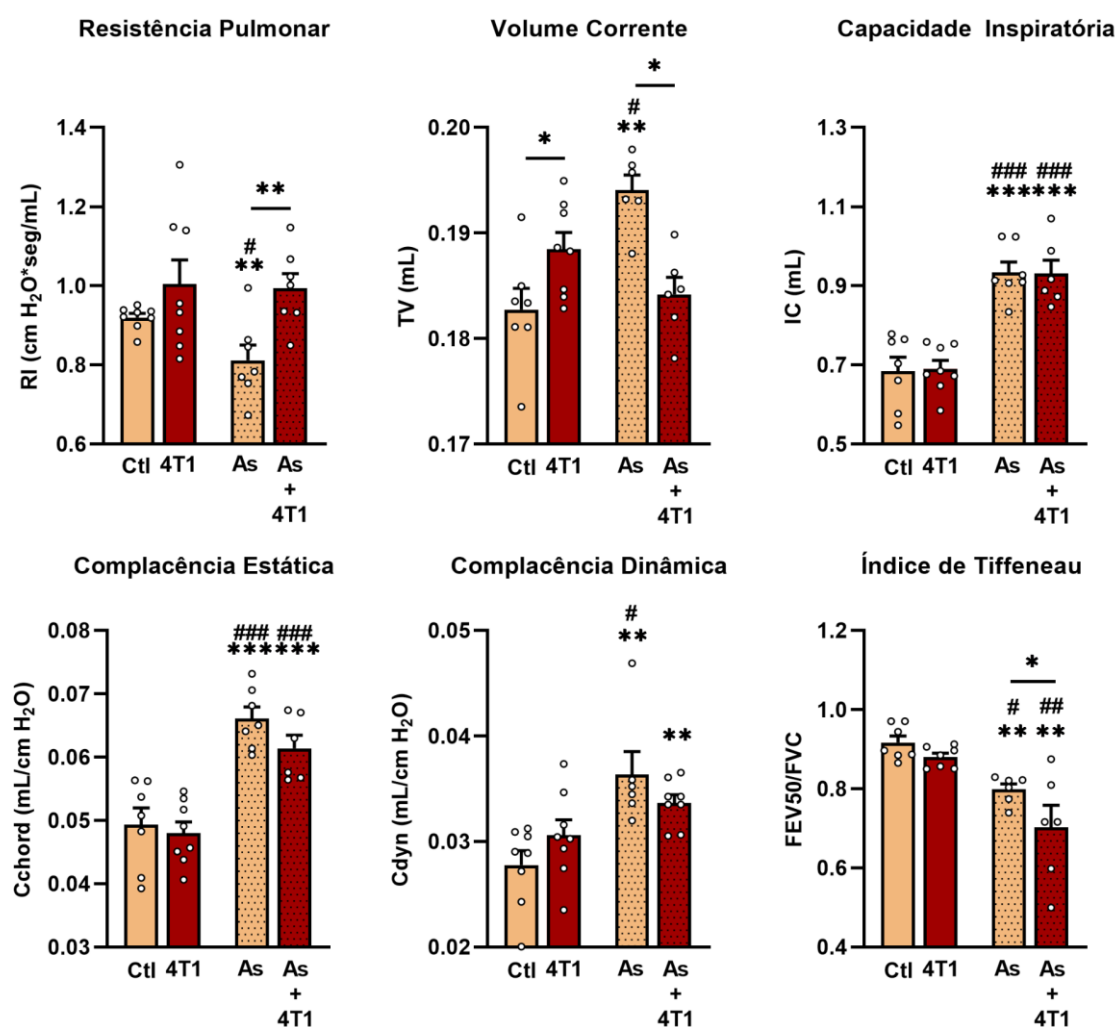


Figura 70: Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama murino 4T1 e infectados com *A. suum* ou não. Dados apresentados em média ± Erro Padrão da Média (SEM).

Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

9.2.9 O câncer de mama não interfere na imunidade humoral dos animais expostos ao parasito

Avaliamos a imunidade humoral dos animais como parte do nosso estudo, visando compreender se o carcinoma de mama interfere na produção de anticorpos contra a infecção por *A. suum*. Dessa forma, não observamos nenhuma interferência do carcinoma de mama 4T1 na manutenção dos níveis de anticorpos, tanto para IgG total no plasma quanto para SIgA no BAL (**Figura 71**). Esse resultado se faz relevante, pois sugere que, apesar da presença do câncer, a capacidade do sistema imunológico de gerar uma resposta de anticorpos adequada contra a infecção parece ser preservada.

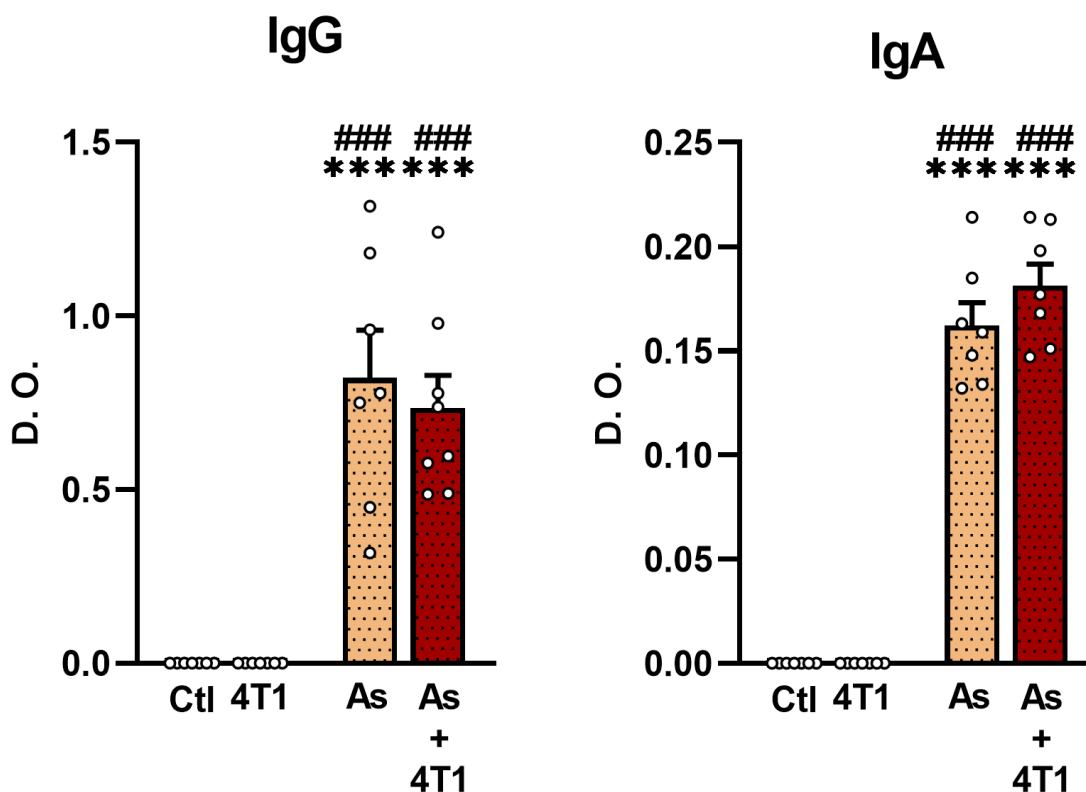


Figura 71: Determinação de IgG e IgA em camundongos BALB/c induzidos com carcinoma de mama 4T1 e infectados ou não com *A. suum*. Dados apresentados em média ± Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises

estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com 4T1 são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

9.2.10 Papel dos eosinófilos na evolução do carcinoma de mama murino 4T1, um estudo piloto

Devido aos nossos achados neste capítulo, especialmente aos achados de que a infecção prévia por altas doses de *A. suum* promoveram aumento da atividade de EPO e de citocinas como IL-5 e IL-13, hipotetizamos que o eosinófilo é uma das células importantes no controle da progressão tumoral no cenário do microambiente tumoral arquitetado pela infecção prévia por *A. suum*. Buscando entender melhor sua função, conduzimos um estudo piloto induzindo câncer em animais selvagens (WT) e em animais KO para o gene GATA-1, ou seja, são animais que não apresentam a produção de eosinófilos e assim, observamos se isso afetaria na sobrevivência dos animais. Nosso resultado preliminar evidenciou que a ausência de eosinófilos na presença do carcinoma de mama murino 4T1 resultou na diminuição da sobrevivência dos animais (HR=3,41; $p = 0,0331$) (**Figura 72**). Esse resultado abre portas para melhor exploração da eosinofilia promovida por *A. suum* e demonstra que existe uma correlação entre o parasitismo em altas doses, o papel do eosinófilo e o controle da progressão tumoral, entretanto, outros estudos precisam ser realizados para entender melhor essa associação.

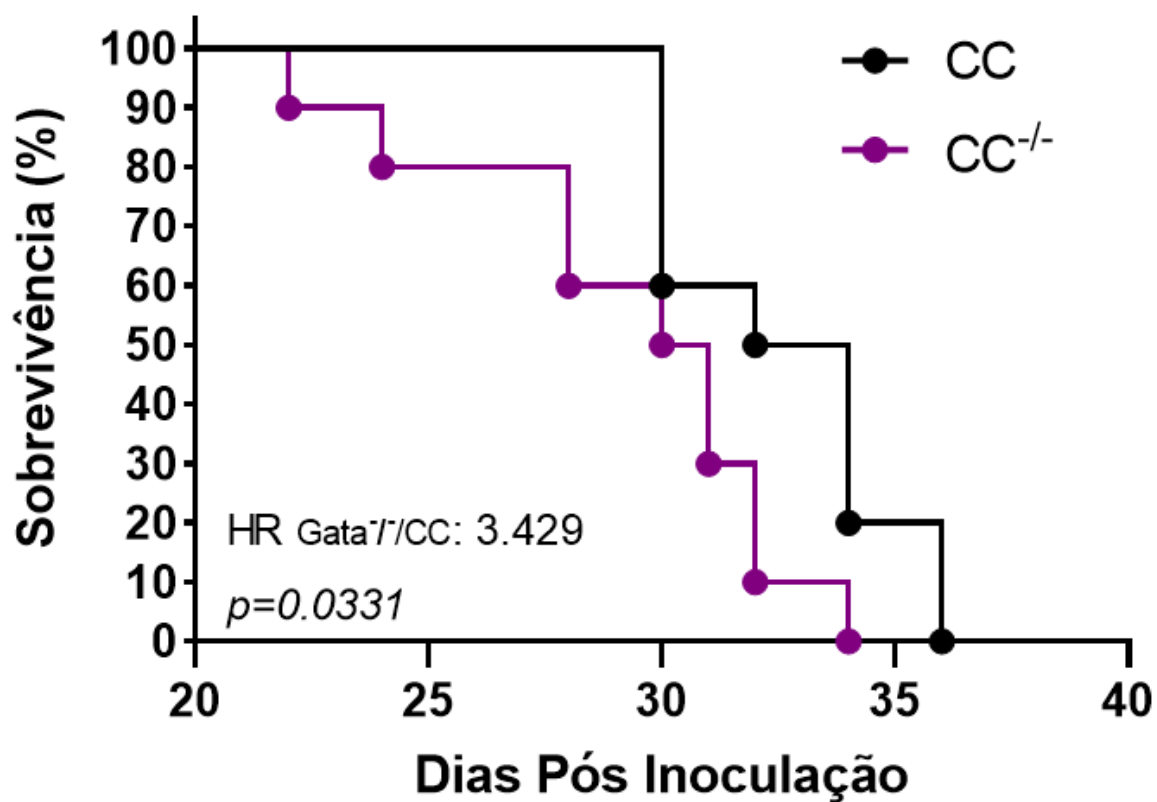


Figura 72: Curva de sobrevivência referente ao experimento piloto realizado neste trabalho com animais selvagens e knockout para o gene GATA-1 com carcinoma de mama 4T1.

Fonte: Autoria própria.

9.3 Discussão

Uma vez demonstrado que a infecção por *A. suum* resulta em inflamação que persiste por até 100 dias (Capítulo II), e após padronizar o melhor dia para as análises de metástases conforme visto no capítulo I, procedemos com o estudo dos efeitos da inflamação crônica causada pela infecção por *A. suum* na evolução do carcinoma de mama murino 4T1. A associação entre infecções helmínticas e a carcinogênese é algo amplamente abordado em literatura, entretanto, com foco em helmintos como *S. haematobium* (Ma et al., 2011; Thanan et al., 2012; Antoni et al., 2017), *O. viverrini* (Pinlaor et al., 2003; Sripa et al., 2011; Sithithaworn et al., 2012; Fedora et al., 2017) e *C. sinensis* (Rustagi; Dasanu 2012; Na et al., 2020; Kim et al., 2022). Embora a IARC não cite outros helmintos, diferentes trabalhos evidenciaram associações entre outros helmintos e câncer (Pastille et al., 2017; Corcuera et al., 2018; Yang et al., 2019; Ruiz-Manzano et al., 2020; Kazemi et al., 2024).

O câncer de mama apresenta diferentes fatores de risco, como obesidade, alimentação rica em gorduras, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo, uso de contraceptivos orais ou de terapia de reposição hormonal combinada no pós-menopausa (Geetika et al., 2017; Hulvat, 2020; INCA, 2020). Entretanto, vale destacar que algumas infecções representam importante fator de risco para surgimento ou agravamento do quadro de câncer (Knoll et al., 2018). No câncer de mama, alguns trabalhos recentemente descreveram que o *T. canis* constitui um potencial fator de risco para agravamento no quadro de câncer devido a resposta imune induzida pelo parasito (Ruiz-Manzano et al., 2021; Kazemi et al., 2024).

Neste trabalho, observamos que a resposta imune induzida por alta dose de infecção de *A. suum*, resultou no atraso do desenvolvimento do câncer de mama. Destacamos que diferentes trabalhos na literatura relataram que alguns helmintos foram responsáveis por regular negativamente a evolução dos tumores, tais como *Echinococcus granulosus* (Daneshpour et al., 2018; Mohammadi et al., 2021 Rostamirad et al., 2023), *Taenia crassiceps* (León-Cabrera et al., 2014), *Trichinella spiralis* (Kang et al., 2013; Luo et al., 2017; Eissa et al., 2019; Yue et al., 2021; Elhasaway et al., 2021; Ruenchit et al., 2022) e *Heligmosomoides polygyrus* (Donskow-Łysoniewska et al., 2020).

Nossos resultados demonstram que a infecção por *A. suum* em doses mais altas, intensificou o infiltrado de leucócitos e impulsionou uma resposta inflamatória que persistiu por até 100 dias. Trabalhos vêm demonstrando que o papel da inflamação e infiltração de leucócitos no desenvolvimento dos tumores é complexo. Enquanto a intensa resposta inflamatória retrata um pior prognóstico no câncer de pulmão (Mei et al., 2016; Zhang et al.,

2011) e câncer de mama (Ruffell et al., 2012; Zhao et al., 2018), a infiltração de leucócitos aparenta estar relacionada com melhor prognóstico no câncer colorretal (Nazemalhosseini-mojarad et al., 2018), câncer de ovário (Darb-Esfahani et al., 2018) e câncer gástrico (Lee et al., 2018).

Em nosso trabalho, observamos que a infecção prévia por *A. suum* resultou em aumento das áreas de infiltrado inflamatório em comparação ao grupo com câncer, porém com diferenças nos tipos celulares predominantes em cada grupo. Enquanto, linfócitos foram proporcionalmente maiores em relação aos neutrófilos nos grupos com infecção prévia por *A. suum*, nos grupos apenas com câncer observamos predominância de neutrófilos, tanto no tumor primário, quanto no BAL dos animais. Inclusive a análise de MPO no pulmão reforça esse resultado do BAL. Os linfócitos, especialmente T CD4+ juntamente com T CD8+, são fundamentais na imunidade antitumoral (Kushekhar et al., 2022) enquanto o acúmulo de neutrófilos podem atuar como fatores pró-tumorais e favorecer metástases por diferentes vias (Houghton et al., 2010; Di Mitri et al., 2014; Canli et al., 2017; Hedrick; Malanchi, 2021).

Além disso, também observamos níveis aumentados de TGF- β no pulmão dos animais com câncer sem exposição prévia ao *A. suum* em relação aos animais previamente infectados. O TGF- β é uma importante citocina regulatória que apresenta papel fundamental na progressão do câncer, sendo uma das estratégias de escape de muitas células tumorais do sistema imune devido a inibição de respostas Th1, importante por inibir o crescimento tumoral (Thorsson et al., 2018; Derynk et al., 2021). Trabalhos já demonstraram que o aumento do TGF- β se correlaciona com a diminuição da sobrevida e no bloqueio da interação entre PD-L1 e PD-1 em diferentes tipos de câncer (Chakravarthy et al., 2018; Tauriello et al., 2018). Nesse sentido, o TGF- β contribui com a exclusão de células T devido ao bloqueio em PD-L1 (Mariathasan et al., 2018). Proporcionalmente a quantidade de neutrófilos foi maior que linfócitos no grupo apenas com câncer no BAL, também confirmado pela análise de MPO no pulmão. Controversamente, no sangue dos animais, a proporção de neutrófilos foi maior em relação aos linfócitos no grupo com infecção prévia.

Outras citocinas como TNF- α e IFN- γ são importantes no microambiente tumoral, especialmente devido ao recrutamento de células T e NK que são capazes de erradicar o tumor (Dajotoy et al., 2004; Ghaffari; Rezaei, 2023). Essas citocinas são capazes de inibir o crescimento tumoral, metástase e angiogênese, e induzir a polarização de macrófagos M1 e senescência tumoral (Andreu-Sanz et al., 2023). As citocinas relacionadas a resposta do tipo 1, proporcionam um ciclo de resposta antitumoral (Biswas et al., 2010) e macrófagos M1

contribuem com a liberação de espécies reativas de oxigênio, o que são componentes importantes na resposta antitumoral (Varrichhi et al., 2018). Inclusive, já foi demonstrado que o óxido nítrico é uma importante molécula envolvida no controle da carga parasitária em infecção por *Ascaris* sp. e que está presente em resposta contra o helminto (Silva, 2014; Oliveira et al., 2022). Em nosso trabalho, observamos que a infecção prévia por *A. suum* resultou em aumento de citocinas Th1 como TNF- α , enquanto a liberação de IFN- γ ficou abaixo do limite de detecção no pulmão, acreditamos que isso tenha acontecido devido o auto-consumo dessas citocinas para ativação da resposta Th1. Além disso, destacamos a possibilidade de controle da progressão tumoral devido a essa modulação.

Por outro lado, em nosso modelo, não observamos apenas a participação de citocinas Th1, pois a infecção prévia por *A. suum* promoveu aumento nos níveis de citocinas Th2 como IL-5 e IL-13. De fato, citocinas Th2 também podem erradicar tumores (Liu et al., 2020). Todavia, respostas Th2 mais exacerbadas, podem contribuir com a progressão de tumores, inclusive em metástase no câncer de mama principalmente por inibir as respostas Th1 (Shani et al., 2020). Contudo, vale destacar que o equilíbrio Th1/Th2 é fundamental para o controle da progressão tumoral (Ikutani et al., 2012). Uma das principais atuações das respostas Th2 são a ativação e recrutamento de eosinófilos, sendo estas células muito importantes para o controle de metástases (Ito et al., 2017).

Nesse sentido, uma das citocinas aumentadas em nosso estudo foi a IL-5 no pulmão dos animais previamente infectados. A IL-5 é uma importante citocina necessária no processo de diferenciação, maturação, expansão e sobrevivência dos eosinófilos (Zaynagetdinov et al., 2015; Grisaru-Tal et al., 2020). Em diferentes tipos de câncer de pulmão, colorretal e melanoma, relatam que a IL-5 foi responsável pelo acúmulo de eosinófilos no tecido (Ellyard et al., 2007; Simson et al., 2007). De fato, em nosso modelo, além do aumento nos níveis de IL-5, também observamos aumento da atividade de eosinófilos tanto no tumor primário quanto no pulmão. Também destacamos que observamos aumento na quantidade de eosinófilos no BAL e no sangue dos animais expostos previamente ao parasito em comparação ao grupo só com câncer.

Diante desses achados, encontramos trabalhos demonstrando que o número de eosinófilos infiltrantes é um fator crucial para evolução dos tumores e que essas células contribuem com a vigilância tumoral (Grisaru-Tal et al., 2020; Wang et al., 2024). Uma das primeiras evidências de que eosinófilos são importantes, foi observado em pacientes tratados com IL-2 e apresentaram eosinofilia sanguínea seguido do aumento da concentração de IL-5

(West et al., 1987). Em um contexto mais atual, em pacientes que fazem uso de ipilimumab (anti-CTLA-4) demonstrou aumento precoce de eosinófilos no sangue periférico que se correlacionou com a maior sobrevida (Deylon et al., 2013; Umansky et al., 2016). Nesse sentido, um achado interessante em nossa revisão, a presença de eosinófilos circulantes foi correlacionada com o aumento da sobrevida no câncer de pele melanoma, de mama, colorretal e gástrico (Varrichhi et al., 2017). Eosinófilos apresentam prognóstico favorável nos tumores sólidos (Sakkal et al., 2016; Gatault et al., 2012). Diferentes trabalhos já demonstram o papel antitumoral e associado ao controle de metástase (Ikutani et al., 2012; Carretero et al., 2015; Lucarini et al., 2017). Inclusive, no câncer de mama, contagens baixas de eosinófilos em pacientes no pré-operatório correlacionam com o risco de reaparecimento após a cirurgia (Ownby et al., 1983; Varricchi et al., 2018), também observado em outros tipos de câncer como melanoma (Moreira et al., 2017) e colorretal (Prizment et al., 2016; Harbaum et al., 2015).

Diferentes trabalhos demonstram que os eosinófilos são capazes de controlar a progressão do câncer devido a liberação de grânulos tóxicos, que são importantes no controle da progressão tumoral (Gatault et al., 2015; Legrand et al., 2010). Também foi observado que os eosinófilos associados a tumores liberam quimiocinas como CCL5, CXCL9 e CXCL10 que promovem o recrutamento de linfócitos TCD8, além de ajudarem no equilíbrio de citocinas Th1 e Th2 (Carretero et al., 2015; Lucarini et al., 2017). Em modelo experimental, já foi observado que os eosinófilos ativados promovem a diminuição de metástases em modelo de melanoma B16 e no de câncer de mama 4T1, além de impulsionar macrófagos M1 e influenciar na diferenciação de linfócitos em TCD4 e CD8 (Jia et al., 2019). Além disso, eosinófilos também se comportam como células APC não profissionais podendo estimular respostas mediadas por linfócitos (Shi et al., 2004; Farhan et al., 2016). Também destacamos a liberação de IL-17 que a infecção por *A. suum* resultou. Trabalhos demonstram a importância da IL-17 para redução do crescimento tumoral em alguns tumores, como o de próstata (Zhang et al., 2017) e associada a terapia anti-PD1 pode levar a rejeição de tumores em camundongos (Nagaoka et al., 2020). Entretanto, no câncer de mama, incluindo 4T1, a IL-17, a depender das condições do microambiente tumoral, é um fator crucial para progressão de tumores incluindo metástases (Roy et al., 2011; Roy et al., 2014; Huang et al., 2017), mas também apresenta efeitos anti-tumorais (Ma et al., 2018). Alguns trabalhos demonstram a importância da IL-17 na redução do crescimento tumoral (Zhang et al., 2017) e associada a terapia anti-PD1 pode levar à rejeição de tumores (Nagaoka et al., 2020).

Destacamos que essa participação de citocinas além de inibirem o processo de metástase e crescimento tumoral, promoveram melhora no prognóstico dos animais, com inibição de hemorragia alveolar e do quadro de anemia. Com esses achados, somados com o aumento nos níveis de IL-5 e IL-13 no pulmão dos animais As + 4T1, decidimos compreender melhor o papel dos eosinófilos na progressão do câncer em nosso modelo. Com isso, observamos que ao induzir câncer em um animal Δ dblGATA (deficiente para a diferenciação de eosinófilos), este apresentou sobrevida reduzida em relação ao animal BALB/c selvagem. Dessa forma, acreditamos que a infecção prévia por *A. suum* em modelo murino possa facilitar a compreensão do papel dos eosinófilos na regressão do carcinoma de mama murino 4T1 e com isso, contribuir com informações associadas a imunoterapia e o papel da inflamação na progressão do câncer.

9.4 Conclusão

Dessa forma, observamos que a infecção prévia com altas doses de ovos de *A. suum* resultam em inflamação crônica e infiltrado intenso de leucócitos que podem ser benéficos para o hospedeiro por resultar em um microambiente desfavorável para evolução do câncer e de respectivas metástases. Destacamos que nossos achados possam contribuir com trabalhos que explorem o papel de infecções por helmintos e o papel antitumorigênico. Além disso, acreditamos que nossos achados contribuam com a compreensão do papel dos eosinófilos na regressão do carcinoma de mama murino 4T1 e com isso, possibilitem novos estudos relacionados a imunoterapia e prognóstico.

CAPÍTULO IV

Influência da dose de infecção de *A. suum* na progressão do câncer de mama e estudo piloto do eosinófilo na progressão

10 MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 Delineamento experimental

O quarto capítulo deste trabalho, visando em aproximar o cenário de infecção real com baixas doses, objetivou elucidar os aspectos imunobiológicos e fisiopatológicos da inflamação crônica após única exposição do *A. suum* em diferentes doses no câncer de mama utilizando o cenário imunobiológico caracterizado no primeiro capítulo com 250 e 2500 ovos. Para isso foram utilizados 80 camundongos BALB/c fêmeas com oito semanas de idade e foram divididos nos seguintes grupos: **Controle (Ctl)**, composto por animais que receberam água filtrada no momento da infecção e que receberam injeção de RPMI estéril; **grupo com câncer (CC)**, composto de animais que receberam apenas água filtrada e receberam $1,0 \times 10^6$ células 4T1 no flanco esquerdo; grupos primoinfectados (**PI**) com que receberam uma única dose de ovos, sendo **PI 250**, grupo que recebeu 250 ovos e **PI 2500** grupo que recebeu 2500 ovos; e grupos **primoinfectados e com câncer (PIC)** grupos que receberam uma única dose de ovos, sendo **PIC 250** grupo que recebeu 250 ovos e **PIC 2500** grupo que recebeu 2500 ovos e após 14 dias receberam injeção com $1,0 \times 10^6$ células 4T1 no flanco esquerdo (**Figura 73**). Aos 35 dias após a indução do câncer os animais foram eutanasiados para as respectivas análises divididos em grupos para coleta de órgãos, BAL, hematologia, e mecânica pulmonar ($n=48$, $n=8$ por grupo), e para os experimentos com radioisótopos ($n=32$, $n=8$ por grupo).

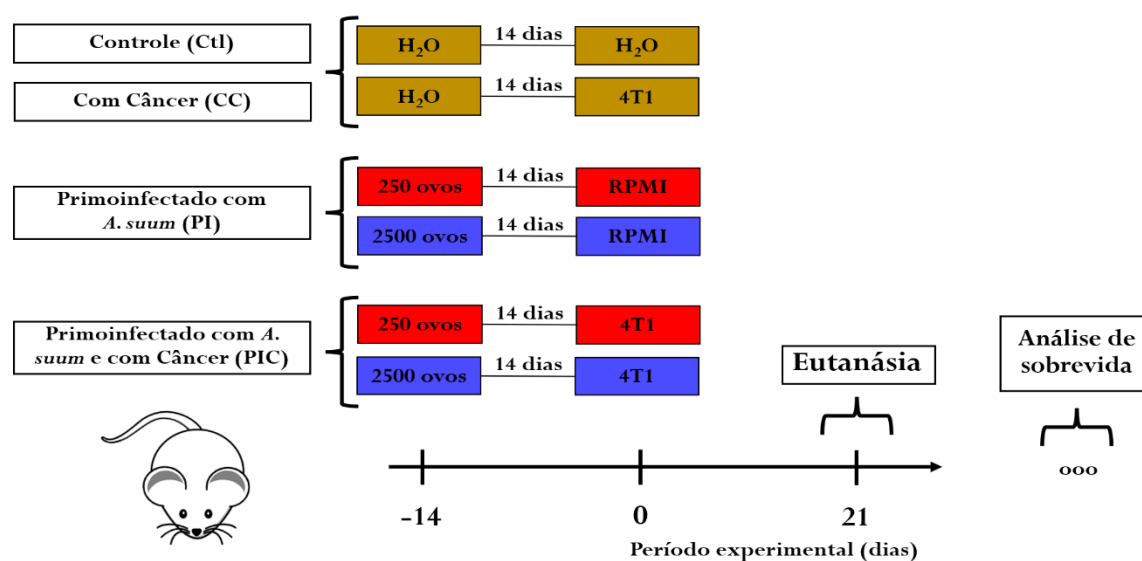


Figura 73: Delineamento experimental do capítulo IV.

Fonte: Autoria própria.

10.2 A infecção prévia em menores doses ovos de *A. suum* constitui potencial fator de risco para progressão do câncer de mama

Assim como demonstrado no capítulo II deste trabalho, a infecção por *A. suum* em diferentes doses promove diferentes impactos na ativação do sistema imunológico. Após avaliarmos a progressão do câncer frente a doses mais altas de ovos de *A. suum*, decidimos avaliar o papel da menor dose na progressão do câncer de mama. Optamos por essa abordagem porque essas doses mimetizam melhor o cenário de infecção humana. Dessa forma, o quarto capítulo deste trabalho teve como objetivo aprofundar a compreensão dos aspectos relacionados à inflamação causada pela exposição única em diferentes doses de ovos de *A. suum* e o impacto associado ao câncer de mama. Os resultados apresentados neste capítulo estão sendo finalizados para submissão na revista **Frontiers immunology** sob título: ***Previous Ascaris suum infection is a risk factor for 4T1 breast carcinoma progression and lung metastasis*** (Apêndice) e outro relacionado aos resultados de fígado na **Plos Neglected Tropical Diseases** sob título: ***Aspects related to liver metastasis of 4T1 murine breast carcinoma after exposure to low doses of A. suum infection*** (Apêndice).

10.2.1 Diferentes doses de ovos de *A. suum* retardam o crescimento do tumor primário, mas influenciam na sobrevida do animal e no desenvolvimento de áreas ulceradas

Observamos que após exposição a uma única dose de ovos de ovos de *A. suum* em diferentes quantidades implicou significativamente na sobrevida dos animais e na dinâmica de evolução dos tumores. A dose de 250 resultou em desfecho de morte precoce, com Hazard Ratio de 3,927 (**Figura 74 A**). Curiosamente, ao avaliar o impacto da dose de infecção no crescimento do tumor, observamos que ambas as doses de 250 e 2500 retardaram o crescimento do tumor primário semelhante (**Figura 74 B**). Entretanto, observamos que houve diferença na evolução clínica dos animais expostos previamente a diferentes ovos de *A. suum* (**Figura 74 C**). No grupo PIC 250, observamos precocemente o surgimento de piloereção em alguns animais aos 6 dias após a indução do câncer. Esses sinais se intensificaram rapidamente, com aumento significativo no número de animais apresentando piloereção aos 10 dias, evidenciando diferenças em comparação aos demais grupos. A partir dos 10 dias, os sinais se agravam progressivamente até o desfecho da morte. Digno de nota, a observação de curvatura de tronco

em alguns animais dos grupos CC e PIC 2500, que se manifestaram após os 30 dias, no grupo PIC 250, foram observados em mais de 50% dos animais antes de 30 dias (**Figura 74 C**).

Embora o comportamento do crescimento do tumor tenha sido idêntico no grupo PIC 250 e PIC 2500, observamos diferenças significativas na dinâmica de desenvolvimento de úlceras (**Figura 74 D**). O surgimento de áreas ulceradas foi observado aos 6 dias no grupo PIC 250, enquanto o grupo CC foi observado aos 10 dias e no PIC 2500 em alguns animais foram observados aos 12 dias (**Figura 74 E**). Esses resultados evidenciam uma dinâmica distinta, dependente da dose administrada, ressaltando a complexidade deste fenômeno.

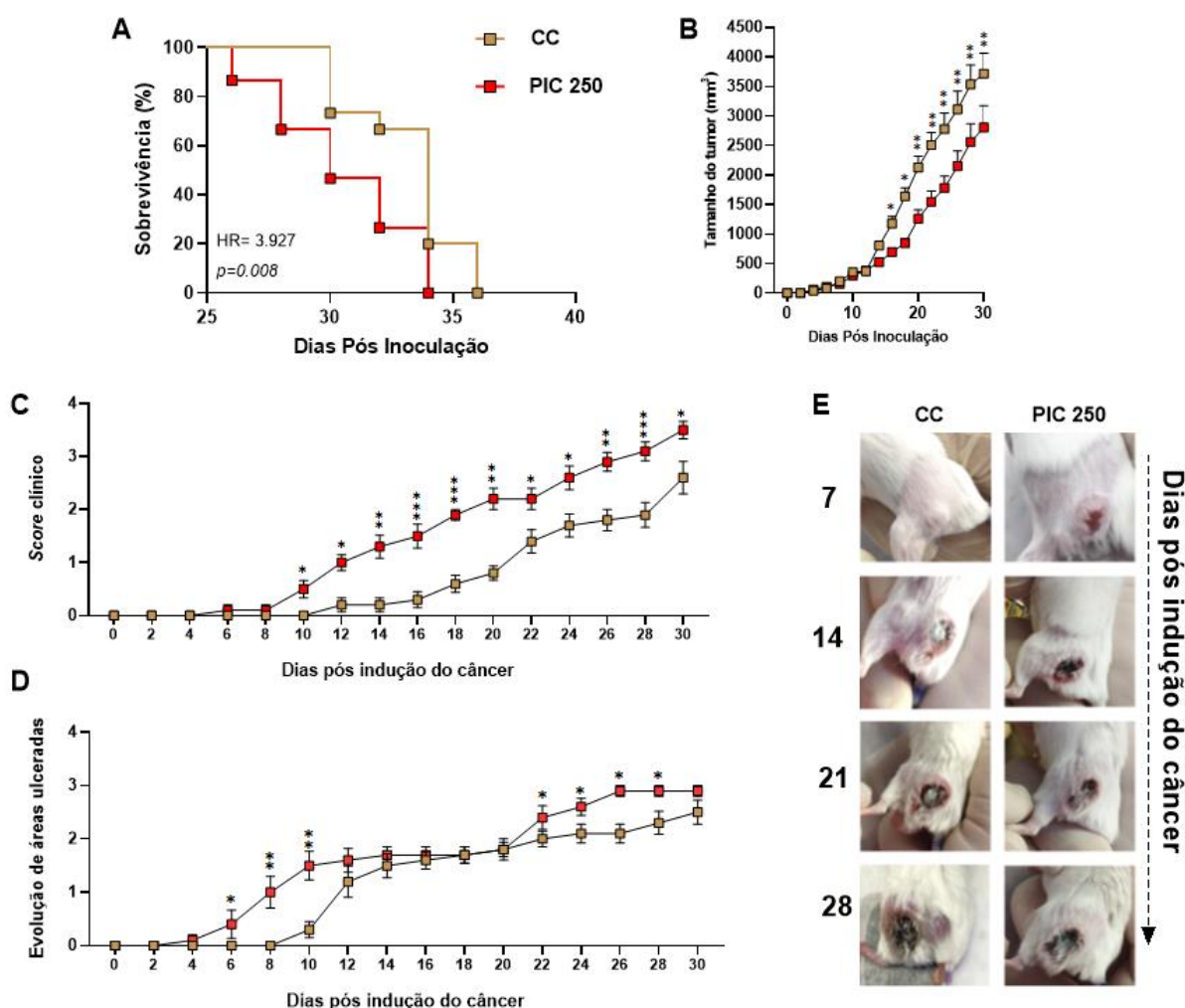


Figura 74: Aspectos clínicos da evolução do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c com ou sem exposição prévia a diferentes doses de ovos de *A. suum*. A: Curva de sobrevivência dos animais expostos a menor dose de ovos (250) e a maior dose de ovos (2500). B: Acompanhamento do crescimento do tumor em mm³ ao longo de 30 dias; C: Evolução do Score clínico avaliado ao longo de 30 dias; D: Acompanhamento da evolução das áreas ulceradas no tumor primário ao longo de 30 dias; E: Representação das áreas ulceradas nos animais dos diferentes grupos aos 7, 14, 21 e 28 dias após a indução do câncer. Dados apresentados em média $\pm$ SEM (B, C e D). Para avaliação da sobrevida dos diferentes grupos, foi usado o teste de Log-rank (Mantel-Cox). Para avaliação da curva de crescimento do tumor ao longo de 30 dias, foi usado o teste *one way* ANOVA seguido do pós-teste de Turkey. Para avaliação da evolução do score clínico e das áreas ulceradas (C e D) foi feito o teste Kruskal-Wallis

seguido pelo pós-teste de Dunn. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, conduzimos com os experimentos utilizando radioisótopos. Inicialmente foram feitas as imagens cintilográficas dos animais após 4 horas da administração da HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ radiomarcada. Qualitativamente foi observado redução dos tumores nos grupos PIC 250 e 2500 (**Figura 75 A**) assim como observados ao longo dos 30 dias. Logo após, por meio do *ex vivo* confirmamos que independente da dose administrada ocorre retardo no crescimento do tumor em comparação ao grupo CC (**Figura 75 B**).

Devido às observações no grupo PIC 250 de sinais clínicos precoces, mortalidade precoce e agravamento das áreas ulceradas em comparação aos outros grupos, conduzimos com os ensaios da atividade indireta de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos para analisar diferenças no perfil de resposta no tumor. Observamos que a maior dose de ovos impulsiona aumento da atividade de macrófagos e eosinófilos, enquanto a menor dose de ovos não (**Figura 75 A e B**). A atividade de macrófagos nesse grupo se manteve nos níveis semelhantes ao do grupo CC, enquanto a infecção em doses menores impactou na diminuição da atividade de eosinófilos no tumor em comparação ao grupo CC (**Figura 75 A e B**). Também foi observado que a infecção impacta na redução da atividade de neutrófilos no tumor, independente da dose, mas em intensidades diferentes com diminuição mais exacerbada observada no grupo PIC 2500 (**Figura 75 C**). Além disso, foram observados que os animais no grupo PIC 250 apresentam grandes áreas de necrose no tumor primário quando comparado aos outros grupos (**Figura 75 D**).

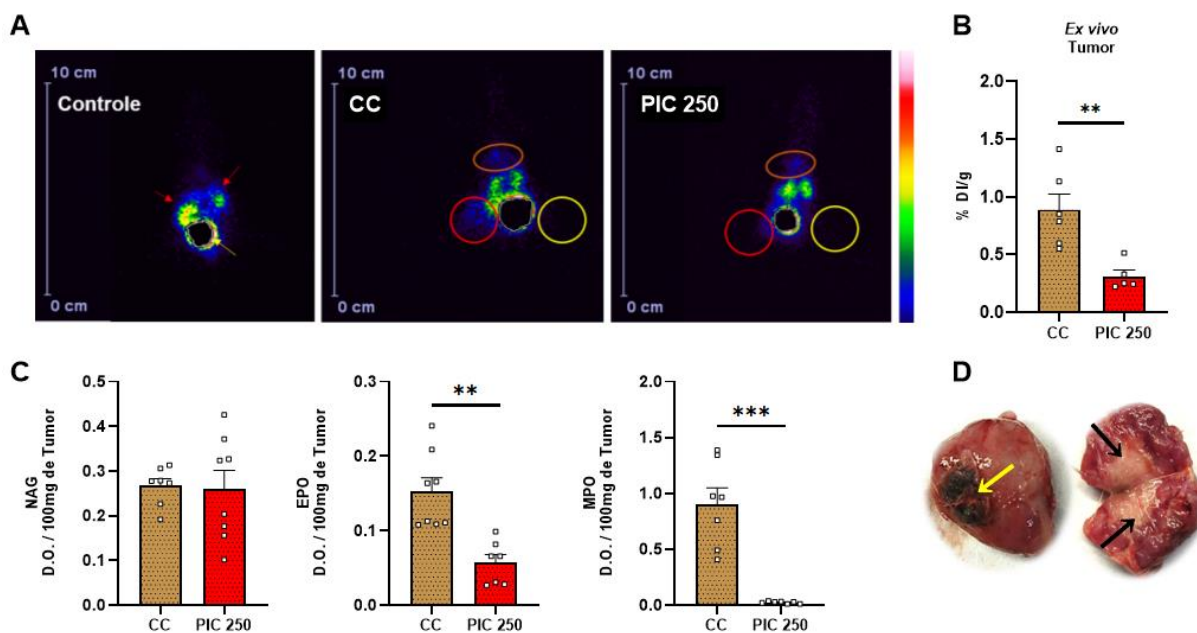


Figura 75: Dinâmica de desenvolvimento dos tumores em camundongos BALB/c com carcinoma de mama 4T1 expostos ou não previamente a infecção com 250 ou 2500 ovos de *A. suum*. A: Imagens cintilográficas representativas dos quatro grupos; B: Avaliação ex vivo do tumor primário; C: Atividade indireta de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos no tumor; D: Representação do tumor primário extraído de um animal do grupo PIC 250 com extensa área de necrose. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para avaliação das diferenças entre os grupos CC e PIC 250, foi usado o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre grupos são representadas por asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados. Setas vermelhas: depuração da HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ radiomarcada nos rins; Seta amarela: ROI da bexiga para melhor distribuição da captação de radiação; Círculo vermelho: indica a presença do tumor devido a captação de radiação; Círculo amarelo: representa o não alvo, local contrário a indução do tumor para evidenciar a diferença; Círculo laranja: presença de focos tumorais no fígado.

Fonte: Autoria própria.

10.2.2 A dose de infecção de *A. suum* está associada ao potencial fator de risco para progressão do carcinoma de mama

Após observar que a infecção por diferentes doses de ovos de *A. suum* influenciam na sobrevivência dos animais, na dinâmica de desenvolvimento do tumor e na atividade de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, foram feitas investigações no pulmão para avaliação do impacto das metástases. Inicialmente, os experimentos de biodistribuição ex vivo evidenciaram que não há diferença entre grupo CC e PIC 250, exceto no grupo PIC 2500 que ocorre diminuição da radiação (**Figura 76 A**). Entretanto, as análises histopatológicas revelaram aumento na quantidade de focos metastáticos no pulmão dos animais do grupo PIC 250 em relação aos outros grupos (**Figura 76 B**) e além do aumento da quantidade de focos, as áreas de crescimento também foram maiores em relação aos outros grupos (**Figura 76 C**). O grupo PIC 250 apresentou diversas áreas de necrose dentro das áreas de crescimento metastático o que

dificultou a penetração da bombesina. As imagens representativas da histopatologia estão dispostas na **Figura 76 D** e da macroscopia na **Figura 76 E**.

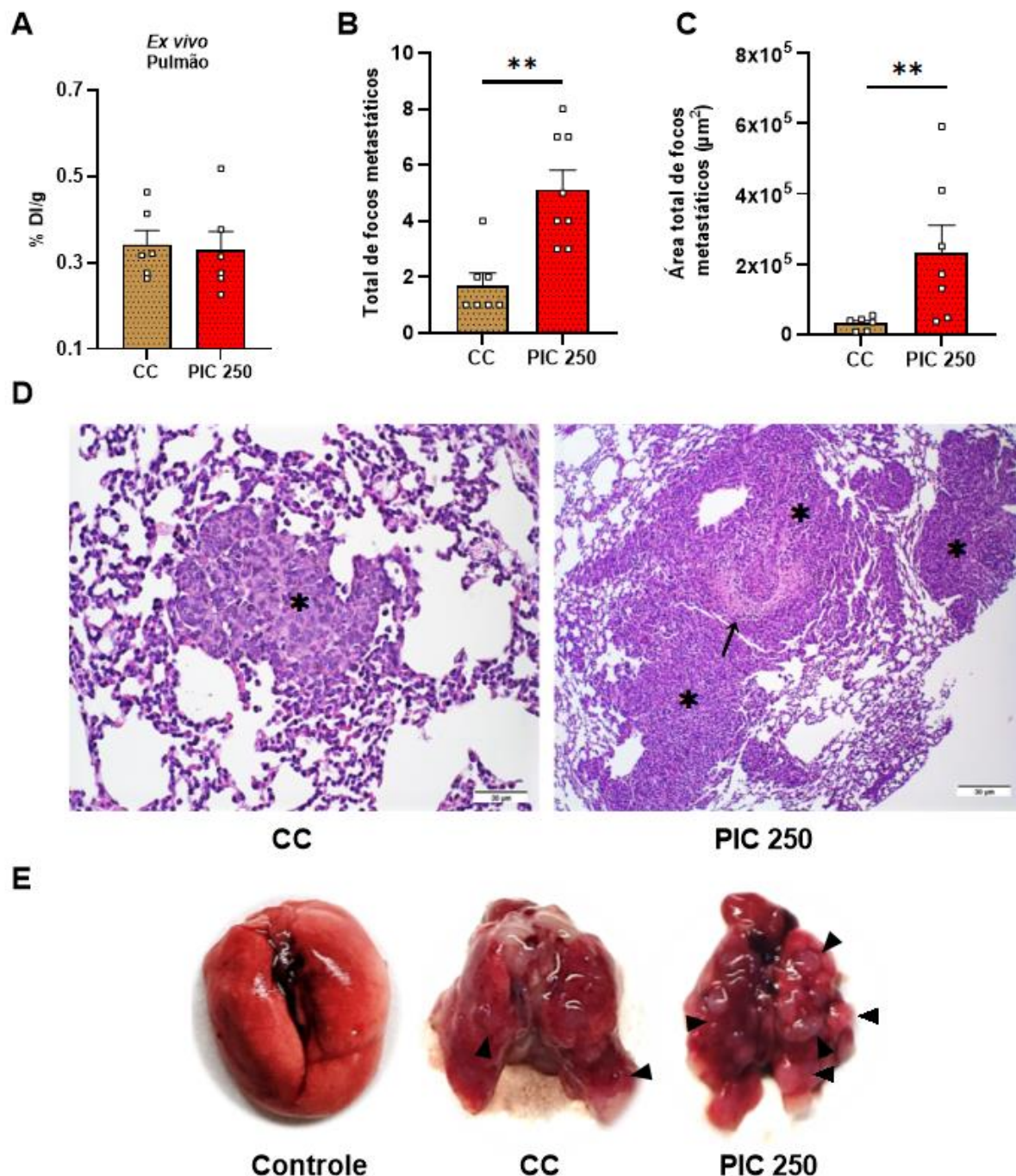


Figura 76: Avaliação da dinâmica de metástases pulmonares provenientes do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c expostos ou não a diferentes doses de ovos de *A. suum*. A: Avaliação ex vivo do pulmão; B: Contagem de focos metastáticos no pulmão; C: Morfometria das áreas de metástase pulmonar; D: Representação das áreas de metástases coradas por H&E, setas indicam áreas de necrose no tecido e * indicam áreas de metástase; E: Macroscopia dos pulmões dos animais, cabeças de setas indicam focos de macrometástases. Para avaliação das diferenças entre os grupos CC, PIC 250 e 2500, foi usado o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As diferenças entre grupos são representadas por asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados. **Fonte:** Autoria própria.

Devido a observação anterior do aumento da atividade indireta de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos no tumor, repetimos o ensaio no pulmão para avaliação (**Figura 77**). Observamos que o grupo PIC 2500 leva ao aumento da atividade de macrófagos e eosinófilos em comparação aos outros grupos, assim como observado no tumor primário (**Figura 77 A**). Enquanto isso, nos grupos CC e PIC 250, observamos aumento em relação ao respectivo controle, mas não em relação ao grupo CC. (**Figura 77 A**). Em relação à atividade de neutrófilos, observamos que apenas o câncer sem a exposição prévia à infecção, promove aumento da atividade de neutrófilos (**Figura 77 A**). Enquanto a infecção, independente da dose, a atividade de neutrófilos diminui (**Figura 77 A**). As análises semi-quantitativas do pulmão corroboraram com o observado na atividade de células. Observamos que a infecção prévia por *A. suum*, independente da dose, leva ao aumento de áreas de lesão no tecido, porém o grupo PIC 2500 promove em uma intensidade maior, especialmente nas vias aéreas e ao redor dos vasos. Enquanto a infecção por *A. suum* promove diminuição no *score* de inflamação do parênquima e de áreas hemorrágicas (**Figura 77 B**).

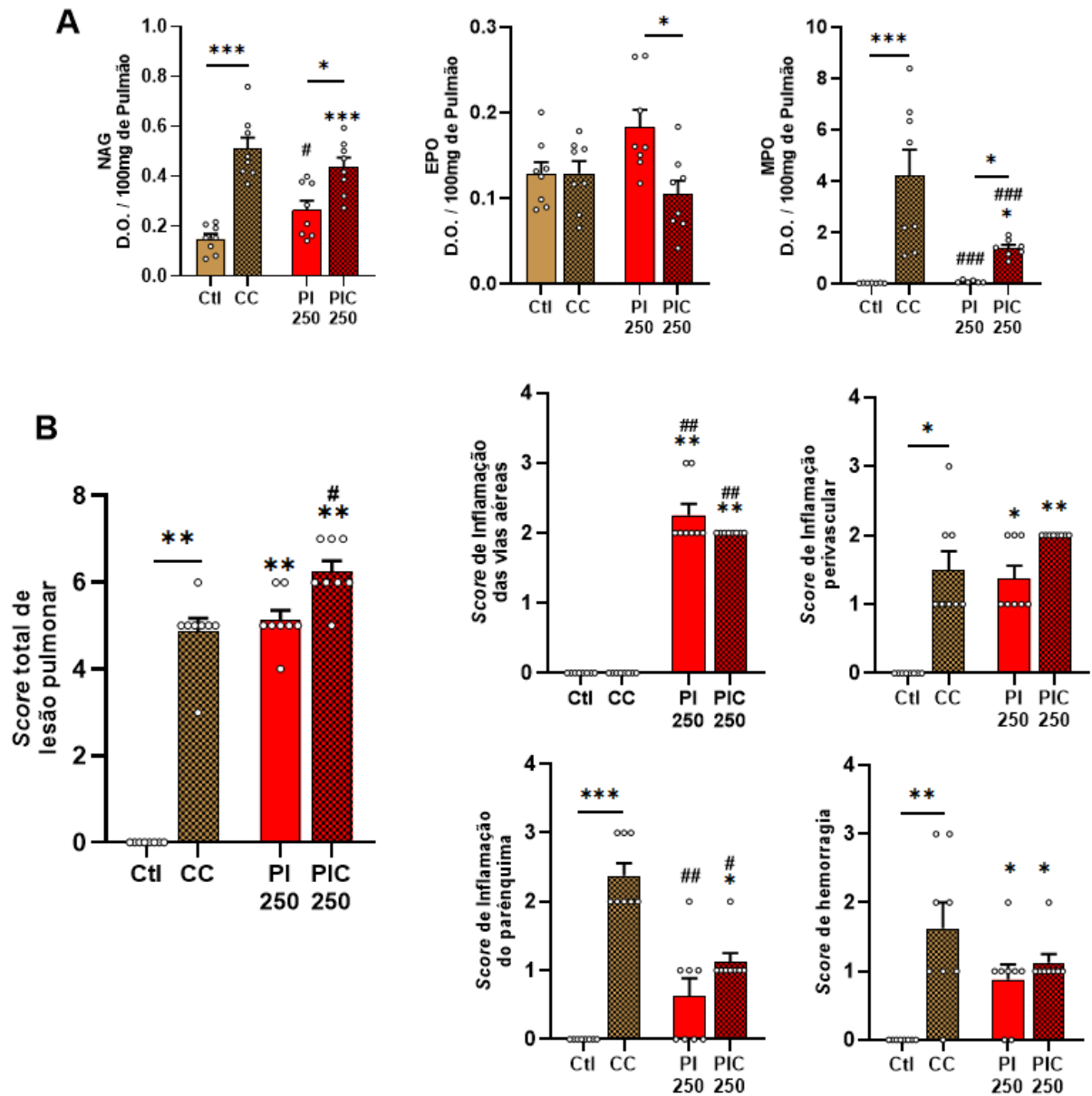


Figura 77: Intensidade do dano celular no pulmão de camundongos BALB/c com carcinoma de mama com ou sem exposição prévia a diferentes doses de *A. suum*. A: Atividade indireta de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. B: Análise semi-quantitativa de lesão no pulmão dos animais. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos em A e o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Duun foi usado para avaliar diferenças entre os grupos em B. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/# $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com CC são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

10.2.3 Doses de infecção menores promovem aumento da liberação de citocinas regulatórias enquanto as maiores doses promovem aumento de resposta inflamatória, o que pode estar associado ao controle das metástases

Uma vez observada a existência de aumento de áreas com células inflamatórias e da atividade celular, analisamos o perfil de citocinas no pulmão desses animais. Os resultados revelaram padrões distintos entre os grupos. O primeiro achado que mais chamou atenção foi o aumento exacerbado do TGF- β (**Figura 78 H**). De fato, isso pode ter resultado na diminuição da intensidade da resposta inflamatória, assim como tem sido discutido ao longo da tese (**Figura 78**).

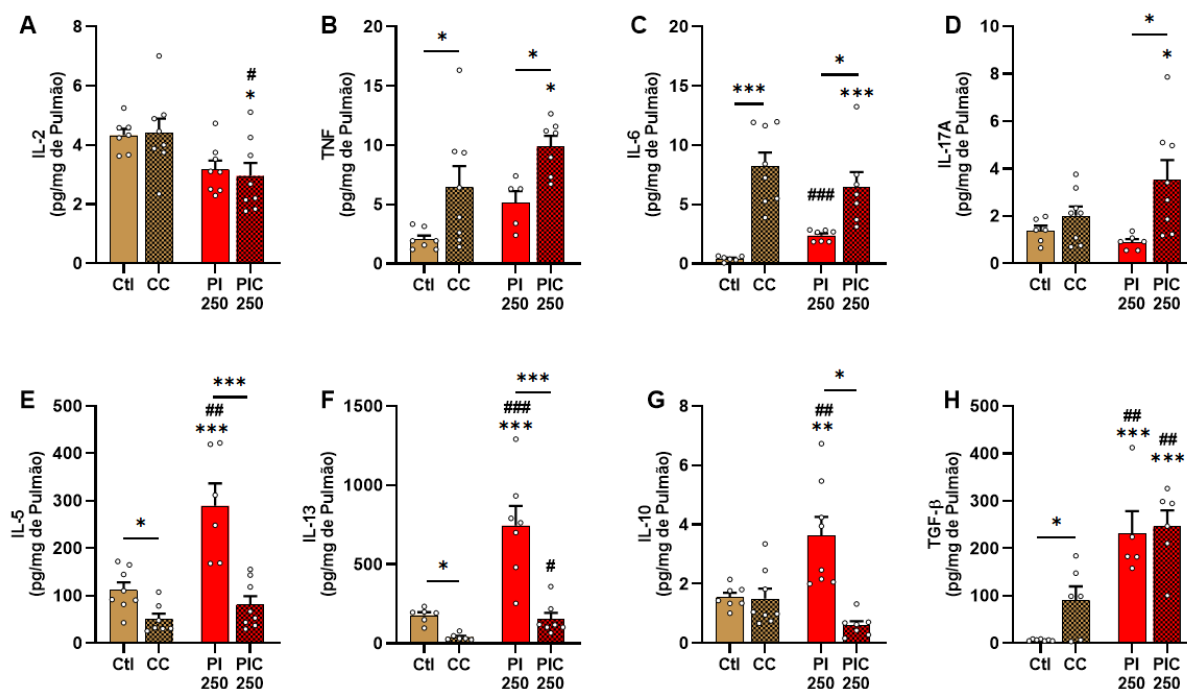


Figura 78: Perfil de produção de citocinas no pulmão de camundongos BALB/c infectados com 250 ovos de *A. suum* ou não em diferentes doses e com ou sem carcinoma de mama 4T1. A: Níveis de IL-2; B: Níveis de TNF; C: Níveis de IL-6; D: Níveis de IL-17A; E: Níveis de IL-5; F: Níveis de IL-13; G: Níveis de IL-10; H: Níveis de TGF- β . Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para as análises estatísticas, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/# $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com CC são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados. **Fonte:** Autoria própria.

Afim de trazer um comparativo entre os achados deste capítulo com o anterior, colocamos os resultados das citocinas das doses de 250 (PIC 250) com as doses de 2500 (PIC

2500) para melhor visualização do comportamento dos padrões distintos. No grupo PIC 2500, observamos um aumento significativo nos níveis de IL-2 em comparação com o grupo CC e o grupo com câncer PIC 250, enquanto no grupo PIC 250, houve diminuição em relação aos grupos (**Figura 79 A**). Quanto ao TNF e IL-6 verificou-se um aumento semelhante nos grupos CC e PIC 250, mas uma elevação ainda maior no grupo PIC 2500 em relação a todos os demais (**Figura 79 e C**). Por outro lado, a IL-5 e IL-13 apresentam queda considerável nos grupos PIC 250 em relação ao grupo As 250 (**Figura 79 D e E**). Em relação a IL-17, o grupo CC não apresentou um aumento nos níveis de IL-17, no entanto, os grupos PIC 250 e PIC 2500 apresentaram elevação, sendo o PIC 2500 mais evidente. As citocinas regulatórias, como IL-10, não houve diferença entre os grupos, apenas o PIC 250 que houve diminuição em relação ao As 250, e o TGF- β , apresentaram valores elevados nos grupos CC e PIC 250, especialmente o PIC 250 que apresentou elevação maior em relação ao grupo CC, enquanto no grupo PIC 2500, os níveis diminuíram em comparação com os outros grupos (**Figura 79 G e H**). Esses resultados evidenciam a complexidade das respostas imunológicas em diferentes estágios da infecção por *A. suum* e sua interação com o câncer de mama murino 4T1

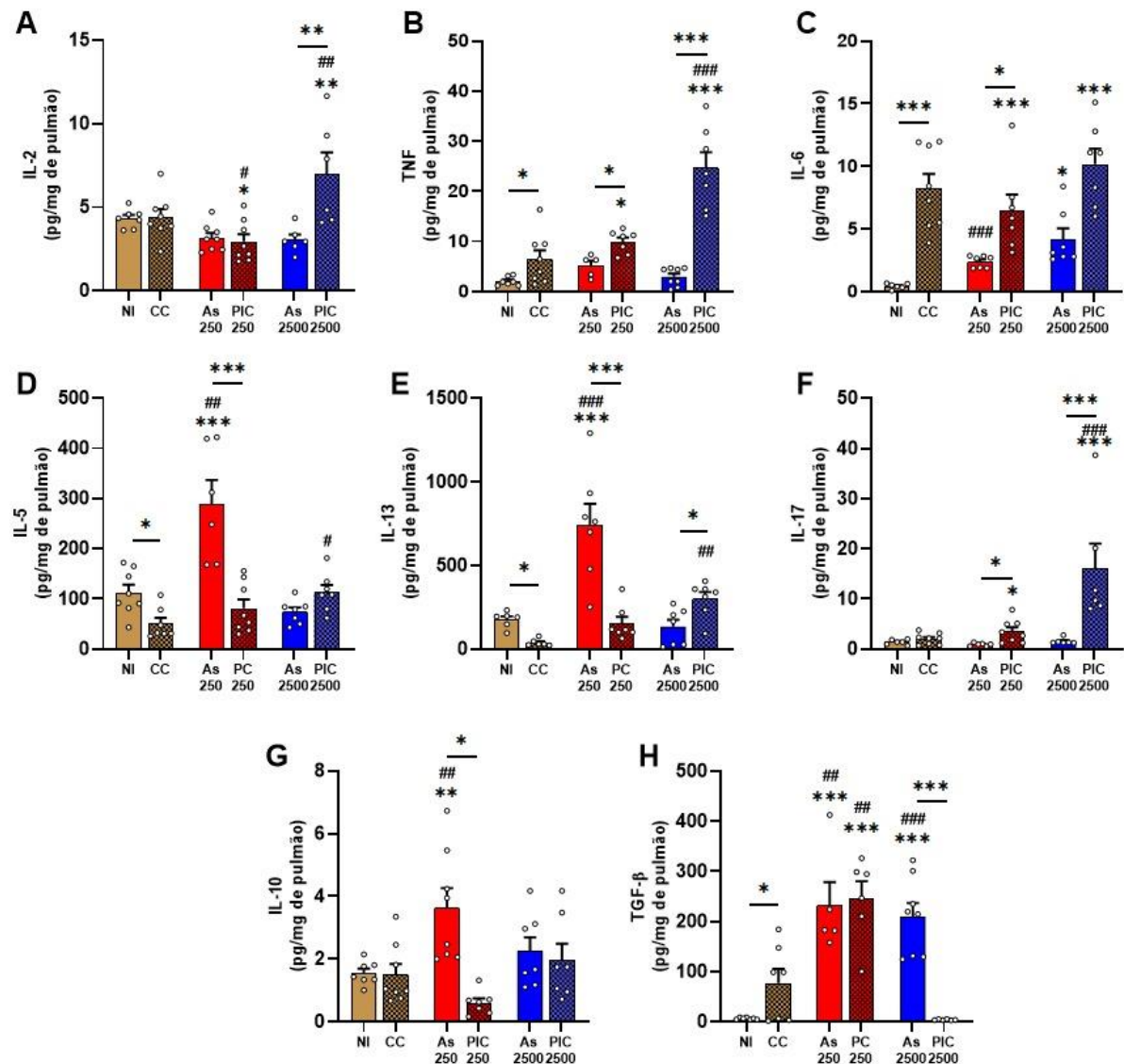


Figura 79: Perfil de produção de citocinas no pulmão de camundongos BALB/c infectados ou não com *A. suum* em diferentes doses e com ou sem carcinoma de mama 4T1. A: Níveis de IL-2; B: Níveis de TNF; C: Níveis de IL-6; D: Níveis de IL-5; E: Níveis de IL-13; F: Níveis de IL-17; G: Níveis de IL-10; H: Níveis de TGF-β. Dados apresentados em média ± SEM. Para as análises estatísticas, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com CC são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

10.3 Agravo tecidual e sistêmico

Devido a observação do agravo da metástase no pulmão dos animais foram realizados alguns experimentos para avaliar os danos que a infecção prévia por doses baixas de *A. suum* podem trazer para o hospedeiro. Inicialmente, observamos os danos no pulmão. Por meio do

BAL, dosamos hemoglobina e proteínas totais para observar a existência de hemorragia. Os resultados revelaram que o processo de metástase no grupo câncer resulta em hemorragia alveolar, entretanto, a exposição prévia ao *A. suum*, em menores doses, agrava esse quadro, elevando as concentrações de hemoglobina (**Figura 80 A**) e proteínas totais (**Figura 80 B**), enquanto a maior dose, promove diminuição, sugerindo resposta mais rápida aos mecanismos de reparo. Além disso, sistemicamente, devido ao quadro hemorrágico, avaliamos o hemograma dos animais. Observamos que a infecção prévia por *A. suum* em menores doses leva ao agravamento do quadro de anemia nos animais PIC 250 em comparação a todos os grupos, devido a diminuição dos níveis de hemoglobina e hematócrito (**Figura 80 D e E**).

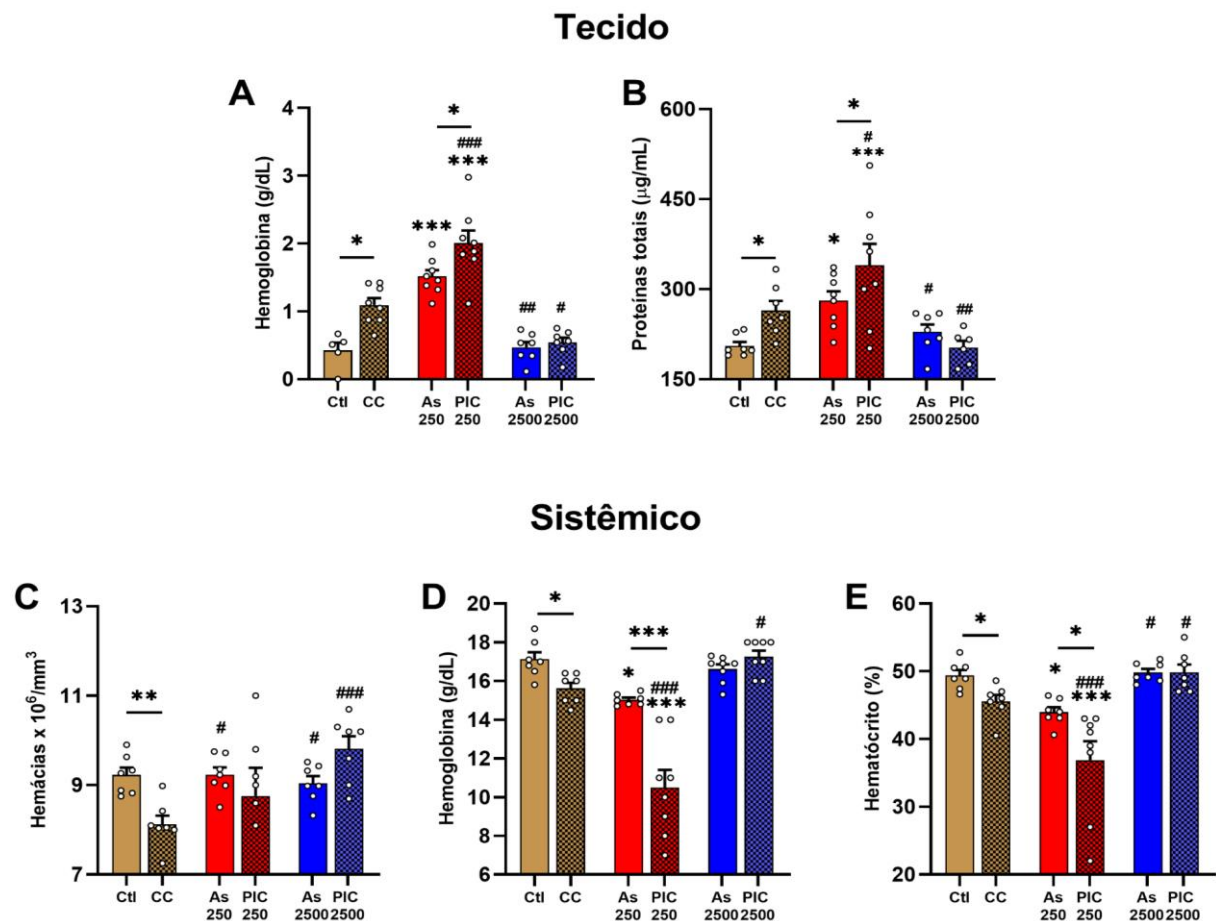


Figura 80: Determinação do dano tecidual e sistêmico em camundongos BALB/c com carcinoma de mama murino 4T1 infectados previamente com doses baixas de *A. suum*. **A:** Concentração de hemoglobina no BAL. **B:** Concentração de proteínas totais no BAL. **C:** Contagem de hemácias no sangue. **D:** Dosagem de hemoglobina no sangue. **E:** Determinação de hematócrito no sangue. Dados apresentados em média ± Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/### $p < 0,01$ e ***/#### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com CC são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Além disso, observamos que os animais expostos à infecção prévia por *A. suum*, especialmente em menores doses, elevam em aproximadamente 4×10^5 vezes mais a leucocitose (**Figura 81**). Observamos predomínio de linfócitos, neutrófilos e monócitos no grupo PIC 250, enquanto eosinófilos se elevaram em todos os grupos, mas pronunciadamente em PIC 2500. Além disso, dosamos o LDH e observamos que estava mais alto em PIC 250 (**Figura 81**).

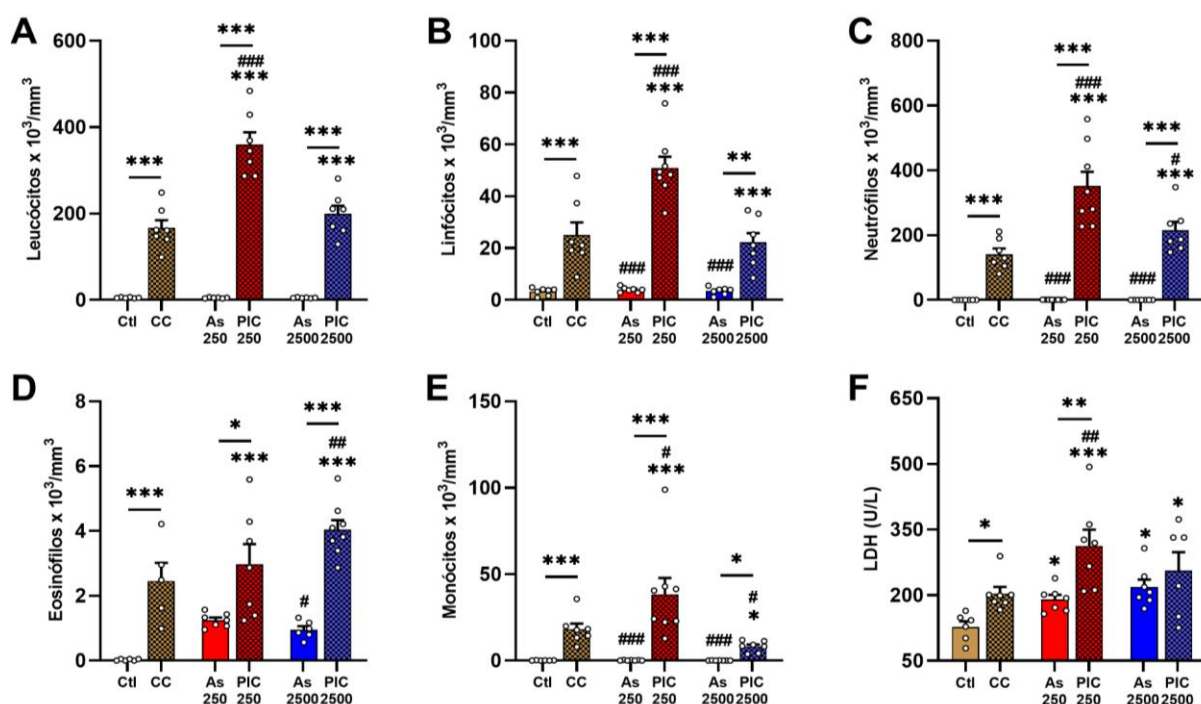


Figura 81: Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c com carcinoma de mama murino 4TI e infectados previamente com doses baixas de *A. suum* e seu impacto nos níveis séricos de LDH. (A) Número total de leucócitos; (B) Contagem de linfócitos; (C) Contagem de neutrófilos; (D) Contagem de eosinófilos; (E) Contagem de monócitos; (F) Níveis séricos de LDH. Dados apresentados em média ± Erro Padrão da Média (SEM). Para as análises estatísticas, o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi usado para avaliar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */#p < 0,05, **/###p < 0,01 e ***/####p < 0,001. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com CC são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

Além dos agravos observados no quadro de hemorragia alveolar, leucocitose e anemia, conduzimos uma avaliação da função pulmonar dos animais para investigar se a exposição prévia aos parasitos poderia exacerbar esses problemas no animal com câncer. Notavelmente, a maioria dos parâmetros avaliados na mecânica pulmonar, incluindo resistência pulmonar,

capacidade inspiratória e complacência, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos PIC 250 e As 250 em comparação com os demais grupos de controle (dados não mostrados). No entanto, destacamos uma evidente piora no quadro de doença obstrutiva, conforme avaliado pelo índice de Tiffeneau (**Figura 82**). Essa análise revelou que a infecção, independentemente da dose, contribuiu para o agravamento da doença obstrutiva aos 21 dias após a indução do tumor (**Figura 82**).

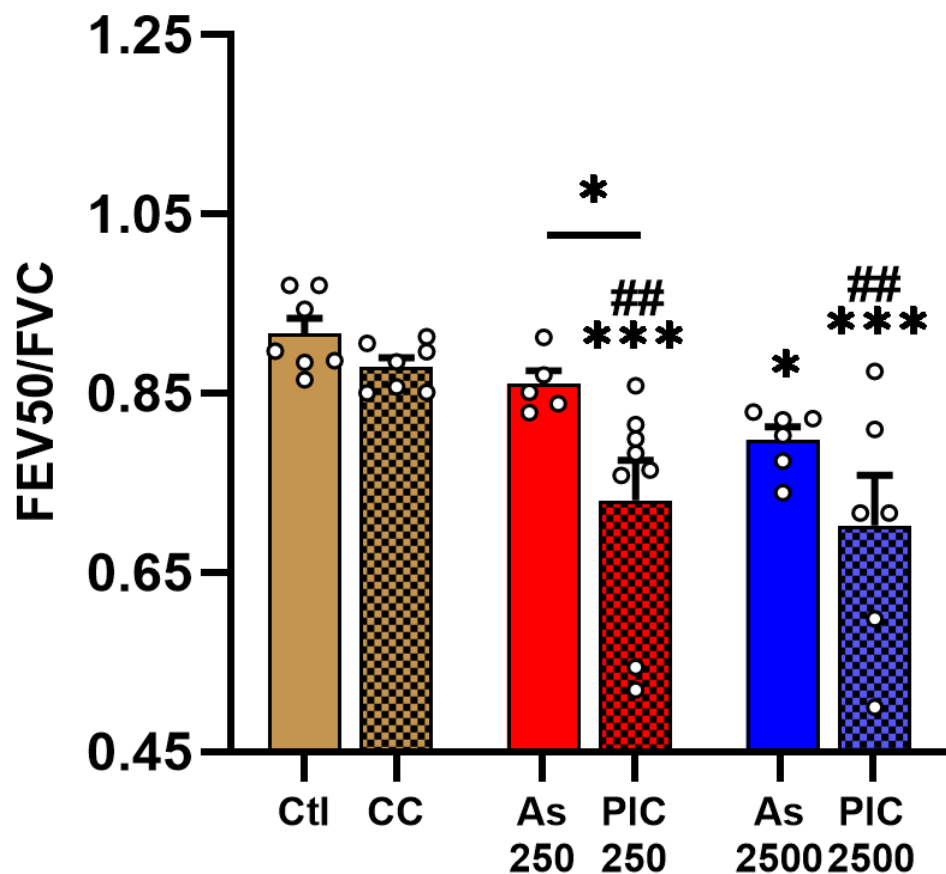


Figura 82: Avaliação do índice de Tiffeneau em camundongos BALB/c infectados com *A. suum* e com carcinoma de mama. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Para avaliar as diferenças entre os grupos foi realizado o teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são representadas por */# $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$ e ***/### $p < 0,001$. As diferenças entre cada grupo com o grupo Ctl é representado por * e diferenças entre cada grupo com CC são representadas por #. Diferenças entre cada grupo e seu respectivo controle é representado com asterisco e barra. Dados não significativos não foram mostrados.

Fonte: Autoria própria.

10.4 Discussão

Apesar de observarmos que a infecção prévia por *Ascaris* resultou na inibição dos tumores e de focos metastáticos, destacamos dois pontos importantes: neste estudo, no capítulo II, observamos que diferentes doses proporcionam respostas imunológicas de forma distintas, o que relacionamos com a carga parasitária. Além disso, em nossa revisão, apesar do discutido no capítulo anterior, observamos que diferentes parasitos também são capazes contribuir com a progressão de diferentes cânceres, e isso inclui nematódeos como *Toxocara canis* e câncer de mama (Ruiz-Manzano et al., 2020; Kazemi et al., 2024), *Anisakis* sp. e câncer de cólon e estômago (Perez et al., 2015; Corcuera et al., 2018); *Dioctophyme renale* e câncer renal (Kuehn et al., 2016), *Enterobius vermiculares* e adenoma tubular retal (Virgone et al., 2015; Coyne et al., 2020), *Schistosoma japonicum* e adenocarcinoma (Imai et al., 2016; Eder et al., 2019) e *S. mansoni* e carcinoma hepatocelular (El-Tonsy et al., 2013; Roderfeld et al., 2020).

No capítulo anterior, foi discutido o potencial papel da infecção prévia por *A. suum* em gerar alta atividade de eosinófilos no tecido no momento do estabelecimento de metástases. Entretanto, conforme observado no capítulo II, menores doses resultam em uma resposta mais prolongada com níveis elevados de algumas citocinas em comparação a infecção com doses mais altas. De acordo com padronização realizada por Amorim (2021) na fase aguda da infecção, e dos achados no capítulo II e III deste trabalho, avaliamos o papel da dose de infecção na evolução do carcinoma de mama 4T1, já que as menores doses se assemelham melhor ao cenário de infecção natural (Lewis et al., 2009; Amorim, 2021)

Ao administrar doses menores de *A. suum* não observamos diferenças na dinâmica de crescimento do tumor quando comparado ao grupo infectado com as maiores doses. Curiosamente, observamos diminuição na sobrevida dos animais juntamente com o surgimento de áreas ulceradas de forma precoce no tumor primário, o que não foi observado nos animais com maiores doses. Entretanto, observamos que mesmo os animais infectados com *A. suum*, as menores doses resultaram em diminuição nos níveis de EPO no tumor, aumento de MPO e redução da atividade de NAG. Assim como discutido no capítulo anterior, os eosinófilos são importantes por auxiliar de diferentes formas em tumores sólidos (Gatault et al., 2012; Sakkal et al., 2016) enquanto neutrófilos podem ser pró-tumorais e favorecer metástases por diferentes vias (Houghton et al., 2010; Di Mitri et al., 2014; Canli et al., 2017; Hedrick; Malanchi, 2021; Yu et al., 2024).

Além disso, observamos que a infecção prévia com doses mais baixas de ovos de *A. suum* não influenciou no aumento da atividade de NAG em comparação ao grupo infectado

com a maior dose. Isso sugere que somente doses altas foram capazes de desencadear esse perfil de recrutamento celular, aparentemente ligada ao controle da progressão tumoral. Por outro lado, também observamos um atraso no crescimento dos tumores nos grupos que receberam doses menores, semelhante aos grupos que receberam doses maiores. No entanto, no grupo infectado com a menor dose, foram observadas extensas áreas macroscópicas de necrose no tumor. Esse resultado pode estar associado a um crescimento mais rápido do tumor cujo a expressão de fatores angiogênicos, como VEGF, não acompanhou de forma proporcional ao desenvolvimento do tumor. Os resultados obtidos pela baixa penetrância da HYNIC- β Ala-Bombesina⁽⁷⁻¹⁴⁾ e o surgimento de áreas ulceradas de forma precoce corroboram com a observação de maiores áreas de necrose no tumor primário nos grupos infectados com menores doses.

Devido à alta mortalidade observada neste grupo, analisamos o perfil de metástases nesses animais. Evidenciamos que a infecção prévia em menores doses promoveu o aumento de focos metastáticos, bem como aumento da área total, incluindo o aumento de áreas de necrose no centro de crescimento de metástase. Esse resultado possivelmente pode estar associado ao observado nos tumores e a relação com a expressão de VEGF. Semelhante ao tumor, os níveis de NAG, EPO e MPO se comportaram da mesma forma.

Em relação a expressão de citocinas, observamos que os animais infectados com as menores doses apresentaram de maior diferença entre todos os grupos foi o aumento exacerbado de TGF- β , o que provavelmente contribuiu com a modulação negativa das respostas Th1/Th2 observados no grupo que recebeu a maior dose de ovos. Vale ressaltar que nos animais infectados apenas com *A. suum* nas menores doses, observamos aumento de citocinas Th2 como IL-5 e IL-13 presentes no pulmão, enquanto nos animais infectados somente com *A. suum* não observamos alterações presentes neste ponto de coleta, exceto de TGF- β e IL-6. Apesar de discutirmos a importância dessas citocinas para imunidade antitumoral, destacamos que trabalhos já evidenciaram que nos estágios iniciais de desenvolvimento do tumor, trabalhos já demonstram que a participação de um maior número de citocinas como IL-5 e IL-13 ocorre um desequilíbrio nas respostas e esta é polarizada para um perfil do tipo 2, a qual além de inibir respostas do tipo 1, essenciais para imunidade antitumoral, promovem aumento de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β (Ghaffari; Rezaei, 2023). Nesse sentido, os animais expostos com menores doses de *A. suum* apresentam um cenário favorável para o estabelecimento de metástase no pulmão devido ao aumento de citocinas como IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β , e diminuição de citocinas TNF e IFN- γ (abaixo do limite de detecção).

Demonstramos neste capítulo que o *A. suum* em doses mais baixas configuram como um potencial fator de risco para o agravamento do câncer de mama, de forma semelhante ao observado no *T. canis* (Ruiz-Manzano et al., 2020; Kazemi et al., 2023).

Além disso, destacamos que doses mais baixas intensificam a evolução do câncer, adicionalmente, também observamos agravo no quadro do animal, incluindo piora no quadro anêmico devido a intensidade alta de hemorragia alveolar. Esses resultados de um mesmo parasito induzindo diferente desfechos na evolução de câncer já foi reportado para o *T. canis* em momentos como protumorigenico (Ruiz-Manzano et al., 2020; Kazemi et al., 2024) e antitumorigenico (Bahadory et al., 2022).

Alguns helmintos podem sobreviver nos hospedeiros por muito tempo induzindo uma resposta crônica como *T. canis* e *Trichuris muris*. O helminto *T. canis* é capaz de induzir respostas do tipo 2 e inibem a produção de citocinas do tipo 1 devido ao aumento de citocinas regulatórias (Othman et al., 2011; Resende et al., 2015). Ambos os parasitos já foram associados a progressão do câncer de mama e *T. muris* ao desenvolvimento de adenomas intestinais (Hayes et al., 2017). No caso do *Ascaris*, evidências mostram que doses mais altas do parasito mantém níveis séricos de citocinas inflamatórias (Wu et al., 2021; Oliveira et al., 2023), o que foi confirmado por nossos dados no capítulo II e demonstramos que em doses menores essa resposta também se mantém, porém com intensidade diferente. Embora, nesse caso, o parasito não está mais presente.

10.5 Conclusão

Dessa forma, observamos que o desfecho da evolução do câncer está relacionado à dose de infecção de ovos de *A. suum* devido ao perfil de resposta imune associada a dose de infecção (**Figura 83**). Aqui, levantamos a preocupação relacionada a utilização de doses menores que mimetizam o cenário de infecção natural, e assim como observado no capítulo II, o microambiente favorável para progressão do câncer nas menores doses de ovos, são observados por até 100 dias. Reforçamos que mais estudos precisam ser realizados para compreender melhor o papel da infecção por *A. suum* na progressão do câncer de mama e que este trabalho possa despertar o interesse para outros estudos envolvendo outros cânceres. Esperamos que este trabalho possa servir como base para sensibilização do poder público e que estratégias de promoção à saúde possam ser reforçadas, uma vez que demonstramos que a infecção por *A. suum* pode ser um potencial fator de risco para progressão do câncer de mama.

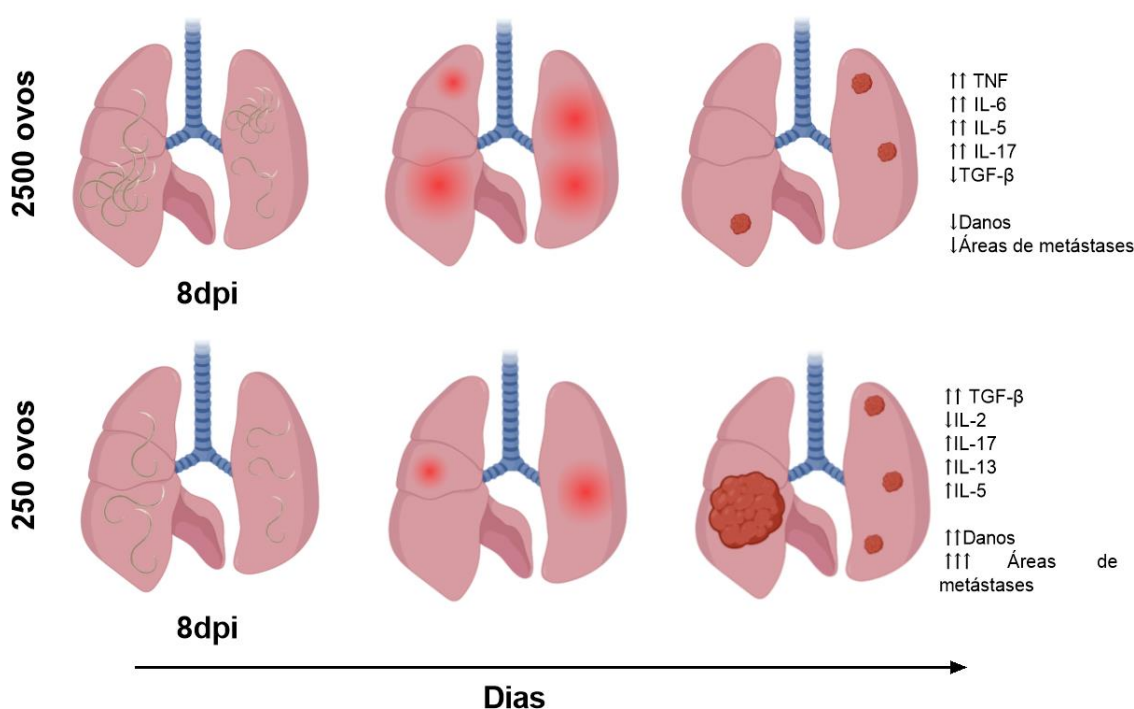


Figura 83: Visão geral da evolução do câncer frente a exposição prévia a infecção por *A. suum* em diferentes doses de infecção

Fonte: Autoria própria.

11 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

- Desenvolvemos e padronizamos um modelo importante para o entendimento da relação entre a infecção por *A. suum* e os fatores relacionados a evolução do câncer de mama e metástases em modelo murino;
- Esse modelo nos permitiu avaliar como algumas doenças infectoparasitárias podem estar relacionadas com agravo no quadro de câncer;
- Demonstramos que a infecção por *A. suum*, mesmo na ausência de larvas, resulta em danos no tecido persistentes que resulta em doenças crônicas (DPOC/ACO, fibrose pulmonar e hepática e doença colestática) as quais serão necessárias outras análises para permitir futuras investigações para melhor entendimento dessa relação com os hábitos de vida da população;
- Esse trabalho traz resultados pioneiros e que poderão contribuir com o poder público ao criar políticas públicas para controle de infecções parasitárias;
- Além dos resultados apresentados, os resultados gerados impulsionaram a condução de outras partes e, portanto, outros braços do estudo ainda sendo realizados (Papel da reinfecção no câncer, aprofundamento do papel da inflamação das metástases no fígado e ossos, análises envolvendo citometria de fluxo, avaliação utilizando animais KO e ensaios de Luminex para melhor descrição dos processos imunológicos e outras análises envolvendo a expressão de outros genes como P53);
- Com os resultados apresentados, pretendemos expandir o modelo para outros tipos de câncer de mama, como luminal A e B, ou ainda outros que não da mama, como próstata (mais prevalente no homem) e colorretal, mas para isso ainda é preciso padronizar os modelos;
- Com os dados gerados de doenças crônicas e *A. suum* pretendemos também no futuro investigar melhor o papel da infecção por *A. suum* como fator de risco para piora de outras doenças como cirrose hepática, tendo em vista os dados de fígado.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, M. AL et al. LyeTx Ib peptide attenuates tumor burden and metastasis in a mouse 4T1 breast cancer model. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1136, 2021.

ABDELRAHMAN, M. Z. et al. Fatal septicemic shock associated with *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a case report and literature review. **Parasitology international**, v. 61, n. 3, p. 508-511, 2012.

ABDOU, A. G. et al. Assessment of *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent and immunocompromised mice and its role in triggering intestinal dysplasia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e593-e600, 2013.

ACEVEDO, N. et al. Association between total immunoglobulin E and antibody responses to naturally acquired *Ascaris lumbricoides* infection and polymorphisms of immune system-related LIG4, TNFSF13B and IRS2 genes. **Clinical and experimental immunology**, v. 157, n. 2, p. 282–290, 2009.

ACEVEDO, N.; CARABALLO, L. IgE cross-reactivity between *Ascaris lumbricoides* and mite allergens: possible influences on allergic sensitization and asthma: Ascariasis, mite allergy and asthma. **Parasite immunology**, v. 33, n. 6, p. 309–321, 2011.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 2, p. 425-430, 2009.

AHMED, M. M. et al. Ascariasis presenting as hematemesis in a young boy. **J Health Res Rev.** v. 2, p. 37-8, 2015.

AIZAWA, K. et al. Tobacco carcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation: Tobacco carcinogen induces NAFLD, NASH and HCC in ferrets. **Journal international of cancer**, v. 139, n. 5, p. 1171–1181, 2016.

AL-BADER, M. D.; AL-SARRAF, H. A. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat—validation by semi-quantitative RT-PCR. **Developmental Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 38-45, 2005.

AL-DHAHERI, W. S. et al. Characterization of breast cancer progression in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1138, n. 1, p. 121–131, 2008.

ALFARO, C. et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. **Cancer treatment reviews**, v. 60, p. 24–31, 2017.

ALISON, M. R. The cellular origins of cancer with particular reference to the gastrointestinal tract. **International journal of experimental pathology**, v. 101, n. 5, p. 132–151, 2020.

ALPERN, J. D. et al. *Strongyloides* hyperinfection following hematopoietic stem cell transplant in a patient with HTLV-1-associated T-cell leukemia. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n. 1, p. e12638, 2017.

ALSHARAYDEH, I. et al. Histological detection of *Schistosoma mansoni* infection in a mature cystic teratoma of the ovary. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 37, n. 4, p. 541-542, 2017.

ALVARADO, A. et al. Experimental mammary carcinogenesis - Rat models. **Life sciences**, v. 173, p. 116–134, 2017.

ALVES, A. C. A; SOUZA, A. M.; SANCHES, C. S. Síndrome de Loeffler. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 26, n. 2, abr./ jun. 2012.

AMORIM, Chiara Cássia Oliveira, et al. Aspectos protetores envolvidos na reinfecção por *Ascaris suum* em função do número de exposição e da dose da infecção na ascaridíase larval. 2021.

ANDERSEN, C. L. et al. Eosinophilia in routine blood samples as a biomarker for solid tumor development—a study based on The Copenhagen Primary Care Differential Count (CopDiff) Database. **Acta Oncologica**, v. 53, n. 9, p. 1245-1250, 2014.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.

ANDERSON, K. N.; SCHWAB, R. B.; MARTINEZ, M. E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast cancer research and treatment**, v. 144, p. 1-10, 2014.

ANDERSON, T. J. C. et al. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. **Parasitol.** v. 107, p. 319-34, 1993.

ANDERSON, T. J. C. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. **TRENDS Parasitol.** v. 17, n. 4, p. 183-88, 2001.

ANDRADE, Angel Medina et al. Intestinal obstruction in a 3-year-old girl by *Ascaris lumbricoides* infestation: case report and review of the literature. **Medicine**, v. 94, n. 16, p. e655, 2015.

ANDREU-SANZ, D.; KOBOLD, S. Role and potential of different T helper cell subsets in adoptive cell therapy. **Cancers**, v. 15, n. 6, p. 1650, 2023.

ANTONI, S. et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. **European urology**, v. 71, n. 1, p. 96-108, 2017.

ASIF, M. et al. Biliary ascariasis - Atypical infestation of *Ascaris lumbricoides*. **Int J Surg Pakistan.** v. 19, n 3, p. 123-24, 2014.

ASLAKSON, C. J.; MILLER, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer research**, v. 52, n. 6, p. 1399–1405, 1992.

AVANZO, G. U. **Padronização de modelo de carcinogênese mamária induzido quimicamente por DMBA em camundongos.** 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, 2008.

AVERY, R. H. et al. Molecular confirmation of *Ascaris suum*: Further investigation into the zoonotic origin of infection in an 8-year-old boy with Loeffler syndrome. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 18, n. 11, p. 638–640, 2018.

AZHAR, M. et al. Case report: Hepatobiliary ascariasis complicated by pancreatitis. **J Ayub Med Coll Abbottabad.** v. 27, n. 2, p. 479-81, 2015.

BAHADORY, S. et al. In vitro anti-gastrointestinal cancer activity of *Toxocara canis*-derived peptide: Analyzing the expression level of factors related to cell proliferation and tumor growth. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 878724, 2022.

BAILEY-DOWNS, L. C. et al. Development and characterization of a preclinical model of breast cancer lung micrometastatic to macrometastatic progression. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e98624, 2014.

BAJGAIN, P. et al. CAR T cell therapy for breast cancer: harnessing the tumor milieu to drive T cell activation. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 6, n. 1, 2018.

BAJNOK, J. et al. High frequency of infection of lung cancer patients with the parasite *Toxoplasma gondii*. **ERJ open research**, v. 5, n. 2, 2019.

BALLERINI, P. et al. Inflammation and cancer: From the development of personalized indicators to novel therapeutic strategies. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 838079, 2022.

BANNA, S. C.; GONDINHO, B. V. C. Assistência em oncologia no sistema único de saúde (SUS). **JMPHC | Journal of Management & Primary Health Care | ISSN 2179-6750**, v. 11, 2019.

BARBOSA, F. S. **Potencial zoonótico da ascaridiose humana e suína: aspectos moleculares, morfológicos, genéticos e filogenéticos das espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum***. 2015. 101 f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

BARCELOS, L. S. et al. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 2, p. 352–358, 2005.

BARRETO, M. L. et al. Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. **Environ Health Perspect.** v. 118, n. 11, p. 1637-42, 2010.

BEAUJOT, J. et al. Potential role of parasitosis in tumorigenesis: case study of heart metastasis as the only presenting symptom of an ileal neuroendocrine tumor. **Presse Medicale (Paris, France: 1983)**, v. 44, n. 1, p. 102-106, 2014.

BECKER, C. et al. TGF- β suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 491-501, 2004.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 551–589, 2009.

BENAMROUZ, S. et al. *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 6, p. 693-700, 2014.

BERRIEL, E. et al. Antitumor activity of human hydatid cyst fluid in a murine model of colon cancer. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 230176, 2013.

BETHONY, J. R. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, p.1521-1532, 2006.

BETSON, M. et al. Molecular epidemiology of Ascariasis: A global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 210, p. 932-94, 2014.

BHARTI, B.; BHARTI, S.; KHURANA, S. Worm infestation: diagnosis, treatment and prevention. **Indian Journal of Pediatrics**, p. 1-8, 2017.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature immunology**, v. 11, n. 10, p. 889-896, 2010.

BOES, J. et al. Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. **Parasit**. v. 117, n. 6, p. 589-96, 1998.

BOIX-MONTESINOS, P. et al. The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development. **Advanced drug delivery reviews**, v. 173, p. 306–330, 2021.

BORISH, L. The immunology of asthma: Asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 117, n. 2, p. 108-114, 2016.

BOUCHERY, T. et al. The differentiation of CD4⁺ T-helper cell subsets in the context of helminth parasite infection. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 487, 2014.

BRADLEY, J. E.; JACKSON, J. A. Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. **Parasite Immunology**, v. 26, n. 11-12, p. 429-441, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia Prático para o controle das geo-helminthiases**. Brasília, DF: MS, 2018. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_controle_geohelminthiases.pdf. Acesso em: 26 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – 5. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BRAUMÜLLER, H. et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. **Nature**, v. 494, n. 7437, p. 361–365, 2013.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2021.

BRICARELLO, P. A. et al. Immunological responses and cytokine gene expression analysis to *Cooperia punctata* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. **Veterinary parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 95-103, 2008.

BRINDLEY, P. J.; LOUKAS, A. Helminth infection–induced malignancy. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 7, p. e1006393, 2017.

- BROOKER, S et al. Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya. **East Afr Med J.** v. 77, p. 157-161, 2000
- BROWN, J. R. et al. Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 23, p. 5995–6005, 2014.
- BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. **Journal of molecular endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of molecular endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.
- CALLEJAS, B. E.; MARTÍNEZ-SAUCEDO, D.; TERRAZAS, L. I. Parasites as negative regulators of cancer. **Bioscience reports**, v. 38, n. 5, 2018.
- CANEPA, M. et al. Schistosomiasis and signet ring cell carcinoma of the rectum. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 16, n. 5, p. 385-387, 2012.
- CANLI, Ö. et al. Myeloid cell-derived reactive oxygen species induce epithelial mutagenesis. **Cancer cell**, v. 32, n. 6, p. 869-883. e5, 2017.
- CARABALLO, L.; ACEVEDO, N.; ZAKZUK, J. Ascariasis as a model to study the helminth/allergy relationships. **Parasite immunology**, v. 41, n. 6, p. e12595, 2019.
- CARRETERO, R. et al. Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8⁺ T cells. **Nature immunology**, v. 16, n. 6, p. 609-617, 2015.
- CAVAGNOLLI, N. I. et al. Prevalência de enteroparasitoses e análise socioeconômica de escolares em Flores da Cunha-RS. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 44, n. 3, p. 312-322, 2015.
- CDC (2023) CDC – Ascariasis – General Information – Frequently Asked Questions (FAQs).
- CERTAD, G. et al. Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human *Cryptosporidium parvum* strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and

cholangiocarcinoma in an experimental model. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1746-1751, 2012.

CHAKRAVARTHY, A. et al. TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 4692, 2018.

CHAMMARTIN, F. et al. Modelling the geographical distribution of soil-transmitted helminth infections in Bolivia. **Parasit Vectors**. v. 25, n. 6, p. 152, 2013. CHAMMARTIN et al., 2013?

CHAMMARTIN, F. et al. Spatio-temporal distribution of soil-transmitted helminth infections in Brazil. **Parasites Vect.** v. 7, p. 440, 2014.

CHANG, M.-H. et al. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 19, p. 1348–1355, 2009.

CHANG, Y.; MOORE, P. S.; WEISS, R. A. Human oncogenic viruses: nature and discovery. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, **Biological sciences**, v. 372, n. 1732, p. 20160264, 2017.

CHAUHAN, V. et al. Ascariasis as a cause of hepatic abscess: A report of 3 cases. **Indian J Med Microbiol.** v. 33, p. 427-9, 2015.

CHEN, D. et al. Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. **Immunology**. v. 139, n. 4, p. 523-32, 2013.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1–10, 2013.

CHEN, J. et al. Selection of suitable reference genes for qPCR gene expression analysis of HepG2 and L02 in four different liver cell injured models. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

CHIEFFI, P. P. Helmintoses e alterações ambientais e climáticas. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, São Paulo, p.27-31, 2015.

CHIU, H.-W. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, enhances radiosensitivity and suppresses lung metastasis in breast cancer in vitro and in vivo. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76340, 2013.

CHOI, J. H.; SEO, M. A case of biliary ascariasis in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 55, p.659-660, 2017.

CHOU, J. et al. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. **Nature cell biology**, v. 15, n. 2, p. 201-213, 2013.

CIEZA, A. et al. Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **Lancet**, v. 396, n. 10267, p. 2006–2017, 2021.

CLAUS, P.; CEUPPENS, A.; COOL, M.; ALLIET, G. *Ascaris lumbricoides*: challenges in diagnosis, treatment and prevention strategies in a European refugee camp. **Acta Clinica Belgica**, v. 19, p. 1-4, 2018.

COELHO, T. C. et al. Reference gene selection for quantitative PCR in liver, skeletal muscle, and jejunum of *Bos indicus* cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 51, p. e20210120, 2022.

COOPER, P. J. et al. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. **The journal of infectious diseases**, v. 182, n. 4, p. 1207–1213, 2000.

COOPER, P. J.; FIGUIEREDO, C. A. Immunology of *Ascaris* and Immunomodulation. In: HOLLAND, C. **Ascaris – the neglected parasite**. Dublin: Academic Press, 1996. p. 4-13.

CORCUERA, M. T. et al. Exploring tumourigenic potential of the parasite *Anisakis*: a pilot study. **Parasitology research**, v. 117, p. 3127-3136, 2018.

CORDÓN, G. P. et al. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. **Parasitology research**, v. 103, n. 2, p. 459, 2008.

CORMIER, S. A. et al. Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. 6, p. 1131-1139, 2006.

COSMI, L; LIOTTA, F.; ANNUNZIATO, F. Th17 regulating lower airway disease. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2016.

COSTA, E. et al. Experimental models as refined translational tools for breast cancer research. **Scientia pharmaceutica**, v. 88, n. 3, p. 32, 2020.

COYNE, J. D; CHARAN, V; GANJIFROCKWALA, A. *Enterobius vermicularis* in a Tubulovillous Adenoma. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 28, n. 6, 2020.

CROMBIE, J. A.; ANDERSON, R. M. Population dynamics of *Schistosoma mansoni* in mice repeatedly exposed to infection. **Nature**, v. 315, n. 6019, p. 491–493, 1985.

CUNHA, G. M., **Prevalência da infecção por enteroparasitas e sua relação com as condições socioeconômicas e ambientais em comunidades extrativistas do município de Cairu - Bahia. 2013.** 247f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Saúde, Ambiente e Trabalho, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador (Bahia), 2013.

DA SILVA ALVES, E. B.; CONCEIÇÃO, M. J.; LELES, D. *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, or “*Ascaris lumbricoides*”? **The journal of infectious diseases**, v. 213, n. 8, p. 1355, 2016.

DAJOTOY, T. et al. Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon stimulation with IFN- γ . **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 3, p. 685-691, 2004.

DANESHPOUR, S. et al. Effect of hydatid cyst antigens on inhibition of melanoma cancer growth in mouse model. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 12, p. 1-5, 2018.

DANFORTH, D. N. The role of chronic inflammation in the development of breast cancer. **Cancers**, v. 13, n. 15, p. 3918, 2021.

DARB-ESFAHANI, S. et al. Morphology and tumour-infiltrating lymphocytes in high-stage, high-grade serous ovarian carcinoma correlated with long-term survival. **Histopathology**, v. 73, n. 6, p. 1002-1012, 2018.

DAS, A. K. Hepatic and biliary ascariasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, 6.2: 65-72, 2014.

DE BARROS, A. L. B. et al. Bombesin derivative radiolabeled with technetium-99m as agent for tumor identification. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 21, p. 6182-6184, 2010.

DE BARROS, A. L. B. et al. Kit formulation for ^{99m}Tc-labeling of HYNIC-βAla-Bombesin (7–14). **Applied Radiation and Isotopes**, v. 70, n. 10, p. 2440-2445, 2012.

DE BEULE, N. et al. Experimental African *trypanosome* infection suppresses the development of multiple myeloma in mice by inducing intrinsic apoptosis of malignant plasma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p. 52016, 2017.

DE JONG, M.; MAINA, T. Of Mice and Humans: Are They the Same? - Implications in Cancer Translational Research. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 4, p. 501–504, 2010.

DE KOK, J. B. et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. **Laboratory investigation**, v. 85, n. 1, p. 154-159, 2005.

DE SILVA, N. R.; GUYATT, H. L.; BUNDY, D. A. Worm burden in intestinal obstruction caused by *Ascaris lumbricoides*. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 2, n. 2, p. 189–190, 1997.

DE SOUZA, C. M. et al. Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 68, n. 1, p. 51–57, 2014.

- DEGAREGE, A. et al. Intestinal helminth infection, Anemia, undernutrition and academic performance among school children in northwestern Ethiopia. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1353, 2022.
- DELYON, J. et al. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 6, p. 1697-1703, 2013.
- DERYNCK, R.; TURLEY, S. J.; AKHURST, R. J. TGF β biology in cancer progression and immunotherapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, n. 1, p. 9-34, 2021.
- DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 6, p. 439-448, 2017.
- DEY, R. K. et al. Right-sided scrotal ascariasis. **Trop Parasitol.** v. 2, n. 1, p. 80-1, 2012.
- DI MITRI, D. et al. Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. **Nature**, v. 515, n. 7525, p. 134-137, 2014.
- DJUARDI, Y. et al. Soil-transmitted helminth infection, anemia, and malnutrition among preschool-age children in Nangapanda subdistrict, Indonesia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009506, 2021.
- DOLD, C.; HOLLAND, C. V. Investigating the underlying mechanism of resistance to *Ascaris* infection. **Microbes and infection**, v. 13, n. 7, p. 624–631, 2011.
- DONSKOW-ŁYSONIEWSKA, K. et al. Intestinal nematode infection affects metastasis of EL4 lymphoma cells. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 68, p. 1-7, 2020.
- DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in medical virology**, v. 25, p. 2-23, 2015.
- DOS REIS, D. C. et al. Versican and tumor-associated macrophages promotes tumor progression and metastasis in canine and murine models of breast carcinoma. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 577, 2019.

DUPRÉ, S. A.; REDELMAN, D.; HUNTER JR, K. W. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci.

International journal of experimental pathology, v. 88, n. 5, p. 351-360, 2007.

EASTON, A.; GAO, S.; LAWTON, S. P.; BENNURU, S. et al. Molecular evidence of hybridization between pig and human *Ascaris* indicates an interbred species complex infecting humans. **ELife**, v. 9, p. e61562, 2020.

ECHAZÚ, A. et al. Effect of poor access to water and sanitation as risk factors for soil-transmitted helminth infection: selectiveness by the infective route. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, e0004111, 2015.

ECKHARDT, B. L. et al. Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. **Molecular cancer research: MCR**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2005.

EDER, B. V. A et al. Sigmoid colon cancer due to Schistosomiasis. **Infection**, v. 47, p. 1071-1072, 2019.

EISSA, M. M. et al. Immuno-therapeutic potential of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* antigens in a murine model of colon cancer. **Investigational New Drugs**, v. 37, p. 47-56, 2019.

EKINCI, M. et al. Radiolabeled Human Serum Albumin Nanoparticles Co-Loaded with Methotrexate and Decorated with Trastuzumab for Breast Cancer Diagnosis. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 14, n. 9, p. 477, 2023.

ELHASAWY, F. A. et al. The apoptotic effect of *Trichinella spiralis* infection against experimentally induced hepatocellular carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 22, n. 3, p. 935, 2021.

ELLYARD, J. I. et al. Eotaxin selectively binds heparin: an interaction that protects eotaxin from proteolysis and potentiates chemotactic activity in vivo. **Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 20, p. 15238-15247, 2007.

ELSE, K. J. et al. Whipworm and roundworm infections. **Nature reviews. Disease primers**, v. 6, n. 1, p. 44, 2020.

EL-TONSY, M. M. et al. *Schistosoma mansoni* infection: is it a risk factor for development of hepatocellular carcinoma?. **Acta tropica**, v. 128, n. 3, p. 542-547, 2013.

ENGELS, D.; ZHOU, X.-N. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious diseases of poverty**, v. 9, n. 1, p. 10, 2020.

EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G.; BARR, Y. M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **The Lancet**, v. 283, n. 7335, p. 702-703, 1964.

FAN, X. et al. High-fat diet alters the expression of reference genes in male mice. **Frontiers in nutrition**, v. 7, p. 589771, 2020.

FARHAN, R. K. et al. Effective antigen presentation to helper T cells by human eosinophils. **Immunology**, v. 149, n. 4, p. 413-422, 2016.

FAVORETTO, B. C. et al. TLR2- and 4-independent immunomodulatory effect of high molecular weight components from *Ascaris suum*. **Mol Immunol**. v. 58, p. 17-26, 2014.

FEDOROVA, O. S. et al. *Opisthorchis felineus* infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: a review of medical statistics. **Parasitology international**, v. 66, n. 4, p. 365-371, 2017.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer, Genève**, v. 136, n. 5, p. 359- 386, 2015.

FINERTY, J. C. et al. Neoplasms in rats exposed to single-dose total-body X radiation. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 14, n. 1, p. 149–157, 1953.

FINN, O. J. Cancer immunology. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 25, p. 2704-2715, 2008.

FORTES, B. P. M. D. et al. Modelagem geoestatística da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Cad. Saúde Pública**. v. 20, n. 3, p. 727-34, 2004.

FRANCO, M. S. et al. Investigation of the antitumor activity and toxicity of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in a murine breast cancer animal model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1728-1739, 2019.

FULBRIGHT, L. E.; ELLERMANN, M.; ARTHUR, J. C. The microbiome and the hallmarks of cancer. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006480, 2017.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822-1832, 2019.

FUSCALDI, L. L. et al. Evaluation of the optimal LNCaP prostate tumour developmental stage to be assessed by 99m Tc-HYNIC- β Ala-Bombesin (7–14) in an experimental model. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 300, p. 801-807, 2014.

FUSCALDI, L. L. et al. Feasibility of the 99m Tc-HYNIC- β Ala-Bombesin (7–14) for detection of LNCaP prostate tumour in experimental model. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, 305: 379-386, 2015.

GALLO, R. C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5926-5930, 2005.

GALVIN, T. J. Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. **J. Parasitol.** v. 54, p. 1085-91, 1968.

GANEM, D. et al. KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 4, p. 939-949, 2010.

GARCIA-PEREZ, J. C. et al. Previous exposure to the fish parasite *Anisakis* as a potential risk factor for gastric or colon adenocarcinoma. **Medicine**, v. 94, n. 40, p. e1699, 2015.

GAO, Z. G. et al. Prevention of metastasis in a 4T1 murine breast cancer model by doxorubicin carried by folate conjugated pH sensitive polymeric micelles. **Journal of controlled release**, v. 152, n. 1, p. 84-89, 2011.

GATAULT, S. et al. IL-18 is involved in eosinophil-mediated tumoricidal activity against a colon carcinoma cell line by upregulating LFA-1 and ICAM-1. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 2483-2492, 2015.

GATAULT, S. et al. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, p. 1527-1534, 2012.

GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C. et al. ASCVac-1, a multi-peptide chimeric vaccine, protects mice against *Ascaris suum* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 788185, 2021.

GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C. et al. IgG induced by vaccination with *Ascaris suum* extracts is protective against infection. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2535, 2018.

GAZZINELLI-GUIMARAES, P. H. et al. Allergen presensitization drives an eosinophil-dependent arrest in lung-specific helminth development. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 9, p. 3686-3701, 2019.

GAZZINELLI-GUIMARÃES, P. H. et al. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* sp. infection in mice. **International Journal for Parasitology**. v. 43, p. 697-706, 2013

GEETIKA, A. et al. A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. **Journal of Radiology Nursing**, v. 36, n. 3, p. 158-165, 2017.

GEIGER, S. M. et al. *Necator americanus* and helminth co-infections: further down-modulation of hookworm-specific type 1 immune responses. **PLoS neglected tropical diseases**. v. 5, n. 9, p. e1280, 2011.

GEIGER, S. M. et al. Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. **Parasite immunology**. v. 29, n. 7, p. 347-58, 2007.

GELPI, A. P.; MUSTAFA, A. *Ascaris* pneumonia. **The American journal of medicine**, v. 44, n. 3, p. 377–389, 1968.

GHAFFARI, S.; REZAEI, N. Eosinophils in the tumor microenvironment: implications for cancer immunotherapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, n. 1, p. 551, 2023.

GHAGHADA, K. B. et al. Evaluation of tumor microenvironment in animal model using a nanoparticle contrast agent in computed tomography imaging. **Academic Radiology**, v.18, n.1, 2011.

GLENN, K. et al. Case report: a case of recurrent *Strongyloides stercoralis* colitis in a patient with multiple myeloma. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1619, 2017.

GLOBAL BURDEN DISEASE STUDY. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Data Resources. Ghdx. GBD Results Tool (2019 version), 2019. Disponível em: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.

GLOBOCAN: Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence Worldwide in 2012 (2014).

GORJI-BAHRI, G.; MORADTABRIZI, N.; HASHEMI, A. Uncovering the stability status of the reputed reference genes in breast and hepatic cancer cell lines. **Plos one**, v. 16, n. 11, p. e0259669, 2021.

GRAVEKAMP, C. et al. In vivo responses to vaccination with Mage-b, GM-CSF and thioglycollate in a highly metastatic mouse breast tumor model, 4T1. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 57, n. 7, p. 1067–1077, 2008.

GRISARU-TAL, S. et al. A new dawn for eosinophils in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 10, p. 594-607, 2020.

GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 2, p. 229–244, 2013.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. Suppl 1, p. i104-i108, 2011.

GUERRERO-WOOLEY, R. et al. Case report: *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with chronic lymphocytic leukemia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1629, 2017.

GUEVARA MIRANDA, J. et al . Linfoma duodenal asociado a infección por *Strongyloides stercoralis*. Dos manifestaciones de la infección por HTLV-1. **Rev. gastroenterol. Perú**, Lima, v. 37, n. 2, p. 169-172, 2017 .

GUO, R.; KI, J-S. Evaluation and validation of internal control genes for studying gene expression in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* using real-time PCR. **European journal of protistology**, v. 48, n. 3, p. 199-206, 2012.

GUPTA, S. K. et al. Combined administration of the apoptin gene and poly (I:C) induces potent anti-tumor immune response and inhibits growth of mouse mammary tumors. **International immunopharmacology**, v. 35, p. 163–173, 2016.

GUR-DEDEOGLU, B. et al. Identification of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in normal matched breast tumor tissues. **Oncology research**, v. 17, n. 8, 2009.

HAFEZ, E. N. et al. Gamma radiation-attenuated *Toxoplasma gondii* provokes apoptosis in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice generating long-lasting immunity. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 19, p. 1533033820926593, 2020.

HAHN, W. C. et al. An expanded universe of cancer targets. **Cell**, v. 184, n. 5, p. 1142-1155, 2021.

HAN, Y. W.; WANG, X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. **Journal of dental research**, v. 92, n. 6, p. 485-491, 2013.

HAN, I. H.; SONG, H. O.; RYU, J. S. IL-6 produced by prostate epithelial cells stimulated with *Trichomonas vaginalis* promotes proliferation of prostate cancer cells by inducing M2 polarization of THP-1-derived macrophages. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008126, 2020.

HANAHAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARBAUM, Lars et al. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. **Modern Pathology**, v. 28, n. 3, p. 403-413, 2015.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 05. 31p. 2019.

HERMAN, A. M. et al. Colorectal cancer in a patient with intestinal schistosomiasis: a case report from Kilimanjaro Christian Medical Center Northern Zone Tanzania. **World journal of surgical oncology**, v. 15, p. 1-5, 2017.

HERNANDEZ-PRERA, J. C.; POLYDORIDES, A. D. Anisakidosis of the sigmoid colon disguising as metastatic carcinoma: a case report and review of the literature. **Pathology-Research and Practice**, v. 208, n. 7, p. 433-435, 2012.

HERRERA, L. A. et al. Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 61-65, 2000.

HASHIM, D. et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. **Annals of oncology**, v. 27, n. 5, p. 926–933, 2016.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of cancer research and practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.

HAYES, K. S. et al. Chronic *Trichuris muris* infection causes neoplastic change in the intestine and exacerbates tumour formation in APC min/+ mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005708, 2017.

HAZELL, L.; BRAUN, L.; TEMPLETON, M. R. Ultraviolet sensitivity of WASH (water, sanitation, and hygiene)-related helminths: A systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 9, p. e0007777, 2019.

HEDRICK, C. C.; MALANCHI, I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 3, p. 173-187, 2022.

HERRERA, I. A.; MENESES, L. T. Síndrome de Loeffler: Presentación de un caso. **Cuadernos del Hospital de Clinicas**. v. 50, n. 2, 69-73, 2005.

HERRERA, L. A. et al. Induction of DNA damage in human lymphocytes treated with a soluble factor secreted by *Taenia solium* metacestodes. **Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis**, v. Suppl 1, n. S1, p. 79–83, 2003.

HERRERA, L. A.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Do helminths play a role in carcinogenesis? **Trends in parasitology**, v. 17, n. 4, p. 172–175, 2001.

HILDYARD, J. C. W; FINCH, A. M.; WELLS, D. J. Identification of qPCR reference genes suitable for normalizing gene expression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0211384, 2019.

HIRAGA, T. et al. Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. **Clinical cancer research**, v. 10, n. 13, p. 4559-4567, 2004.

HO, K. H.; PATRIZI, A. Assessment of common housekeeping genes as reference for gene expression studies using RT-qPCR in mouse choroid plexus. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3278, 2021.

HOLANDA, T. B. et al. Geo-Helminths: análise e sua relação com saneamento: uma revisão integrativa. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, Uberlândia, 2015.

HOLLAND, C. et al. Global prevalence of *Ascaris* infection in humans (2010–2021): a systematic review and meta-analysis. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 11, n. 1, p. 113, 2022.

HOLLAND, C. The long and winding road of *Ascaris* larval migration: the role of mouse models. **Parasitology**, v. 148, p.1735–1743, 2021.

HOLLAND, C. V., et al. The epidemiology of *Ascaris lumbricoides* and other soil-transmitted helminths in primary school children from Ile-Ife, Nigeria. **Parasitology**, 99.2: 275-285, 1989.

HOLLAND, C. V.; BEHNKE, J. M.; DOLD, C. Larval Ascariasis: Impact, Significance, and Model Organisms. In: **Ascaris the neglected parasite**. Ed. Elsevier. Amsterdam. c. 5, p. 107-125, 2013.

HOLLAND, J. F.; POGO, B. G. T. Mouse mammary tumor virus-like viral infection and human breast cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 17, p. 5647–5649, 2004.

HONEYCUTT, J. et al. Controversies and challenges in research on urogenital schistosomiasis-associated bladder cancer. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 7, p. 324-332, 2014.

HOTEZ, P. J. et al. The Giant Anteater in the Room: Brazil's Neglected Tropical Diseases Problem. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 2, n. 1, p. e177, 2008.

HOTEZ, P. J. et al. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2865, 2014.

HOTEZ, P. J; KAMATH A. Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. **PLoS Negl. Trop. Dis**. 3: 412, 2009.

HOU, M. et al. Icariside I reduces breast cancer proliferation, apoptosis, invasion, and metastasis probably through inhibiting IL-6/STAT3 signaling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 499-513, 2024.

HOUGHTON, A. M. et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. **Nature medicine**, v. 16, n. 2, p. 219-223, 2010.

HU, Guoming et al. Tumor-associated tissue eosinophilia predicts favorable clinical outcome in solid tumors: a meta-analysis. **BMC cancer**, v. 20, p. 1-9, 2020.

HUANG, S. et al. TGF- β 1 secreted by Tregs in lymph nodes promotes breast cancer malignancy via up-regulation of IL-17RB. **EMBO molecular medicine**, v. 9, n. 12, p. 1660-1680, 2017.

HULVAT, M. C. Cancer incidence and trends. **Surgical Clinics**, v. 100, n. 3, p. 469-481, 2020.

HUMMEL, K. P.; RICHARDSON, F. L.; FEKETE, E. Anatomy. In: GREEN, E. L. (Ed.). **Biology of the laboratory mouse**. 2. ed. New York: Dover, 1966.

IKUTANI, M. et al. Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 2, p. 703-713, 2012.

IMAI, J. et al. Colonic high-grade tubular adenomas associated with *Schistosoma japonicum*. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 41, n. 1, p. 22, 2016.

IMANIMOGHADAM, M. et al. Improving Chemotherapy Effectiveness: Utilizing CuS Nanoparticles Coated with AS1411 Aptamer and Chitosan for Targeted Delivery of Doxorubicin to Cancerous Cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2024.

IMAOKA, T. et al. High relative biologic effectiveness of carbon ion radiation on induction of rat mammary carcinoma and its lack of H-ras and Tp53 mutations. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 69, n. 1, p. 194–203, 2007.

INGERSLEV, K. et al. The potential role of infectious agents and pelvic inflammatory disease in ovarian carcinogenesis. **Infectious agents and cancer**, 12.1: 1-10, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 6. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

ISMAILI-JAHA, V. et al. Gallbladder ascariasis in Kosovo—focus on ultrasound and conservative therapy: a case series. **Journal of Medical Case Reports**, v. 12, p. 1-5, 2018.

ITO, N. et al. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). **Carcinogenesis**, v. 12, n. 8, p. 1503–1506, 1991.

ITO, T. et al. Anti-tumor immunity via the superoxide-eosinophil axis induced by a lipophilic component of *Mycobacterium lipomannan*. **International immunology**, v. 29, n. 9, p. 411-421, 2017.

JACKSON, J. A. et al. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 18-27, 2009.

JACOBS, B. A. et al. Hookworm exposure decreases human papillomavirus uptake and cervical cancer cell migration through systemic regulation of epithelial-mesenchymal transition marker expression. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11547, 2018.

JAIN, N. et al. Selecting suitable reference genes for qPCR normalization: a comprehensive analysis in MCF-7 breast cancer cell line. **BMC molecular and cell biology**, v. 21, n. 1, p. 68, 2020.

JAIN, N. et al. Selecting suitable reference genes for qPCR normalization: a comprehensive analysis in MCF-7 breast cancer cell line. **BMC Molecular and Cell Biology**, v. 21, p. 1-19, 2020.

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, 2018.

JESKE, S. et al. Intestinal parasites in cancer patients in the South of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 574-578, 2017.

JESSEN, H. et al. Turnover of type I and III collagen predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory Research**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2021.

JIA, S. et al. A role of eosinophils in mediating the anti-tumour effect of cryo-thermal treatment. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 13214, 2019.

JIA, T.-W. et al. Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, p. e1621, 2012.

JO, J. et al. Conventionally used reference genes are not outstanding for normalization of gene expression in human cancer research. **BMC bioinformatics**, v. 20, p. 13-21, 2019.

JOHNSTON, L. K.; BRYCE, P. J. Understanding interleukin 33 and its roles in eosinophil development. **Frontiers in medicine**, v. 4, p. 51, 2017.

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

JUNG, K.-J.; WALLIG, M. A.; SINGLETARY, K. W. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. **Cancer letters**, v. 233, n. 2, p. 279–288, 2006.

JUNG, B.K. et al. High *Toxoplasma gondii* seropositivity among brain tumor patients in Korea. **The Korean journal of parasitology**, v. 54, n. 2, p. 201, 2016.

JUNQUEIRA, C. et al. *Trypanosoma cruzi* adjuvants potentiate T cell-mediated immunity induced by a NY-ESO-1 based antitumor vaccine. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36245, 2012.

KAMARKHANI, Z. et al. Molecular examination of *Trichomonas vaginalis* infection and risk of prostate cancer in the biopsy of patients with different prostate lesions. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, v. 31, n. 2, 2021.

KAMIŃSKA, M.; ŁOPACKA-SZATAN, K.; MIOTŁA, P.; STAROSŁAWASKA, E. Breast cancer risk factors. **Menopause Review/Przegląd Menopauzalny**, v. 14, n. 3, p. 196-202, 2015.

KANEKO, M. K., et al. A Cancer-Specific Monoclonal Antibody against HER2 Exerts Antitumor Activities in Human Breast Cancer Xenograft Models. **International Journal of Molecular Sciences**, 25.3: 1941, 2024.

KANG, Y. et al. *Trichinella spiralis* infection reduces tumor growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 1-2, p. 106-113, 2013.

KANNEGANTI, K.; MAKKER, J. S.; REMY, P. *Ascaris lumbricoides*: to expect the unexpected during a routine colonoscopy. **Case Reports in Medicine**, v. 2013, p.4, 2013.

KAPLANOV, I. et al. Blocking IL-1 β reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 4, p. 1361-1369, 2019.

KARABEY, M. et al. *Cryptosporidium* spp. during chemotherapy: a cross-sectional study of 94 patients with malignant solid tumor. **Annals of Saudi Medicine**, v. 41, n. 5, p. 293-298, 2021.

KARNAM, K. C. et al. Preventive effect of berberine against DMBA-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 92, p. 207–214, 2017.

KAST, K.; RHIEM, K. Familial Breast Cancer - Targeted Therapy in Secondary and Tertiary Prevention. **Breast Care**, v. 10, n. 1, p. 27-31, 2015.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses**. Belo Horizonte: CPqRR, 2018. 76 p.

KAUR, P. et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 120, 2012.

KAZEMI, F. et al. *Toxocara canis* Increases the Potential of Breast Cancer by Reducing the Expression of the P53 Protein. **Current Molecular Medicine**, v. 24, n. 3, p. 335-343, 2024.

KELLY, G. L.; RICKINSON, A. B. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. **Hematology**, v. 2007, n. 1, p. 277–284, 2007.

KHANDIA, R.; MUNJAL, A. Interplay between inflammation and cancer. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 119, p. 199-245, 2020.

KHURROO, M. S. Ascariasis. **Parasitic Diseases of the Liver and Intestines**, v. 25, p. 553-577, 1996.

KHURROO, M. S.; KHURROO, N. S.; KHURROO, M. S. Biliary ascariasis in the etiology of recurrent pyogenic cholangitis in an endemic area. **International journal of hepatobiliary and pancreatic diseases**, v. 5, p. 22, 2015.

KHURROO, M. S.; RATHER, A. A.; KHURROO, N. S.; KHURROO, M. S. Hepatobiliary and pancreatic ascaridiasis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, p.7507-7517, 2016.

KILIÇ, Y.; ÇELEBILER, A. Ç.; SAKIZLI, M. Selecting housekeeping genes as references for the normalization of quantitative PCR data in breast cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 16, p. 184-190, 2014.

- KIM, E. J. et al. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. **Breast Cancer Research**, v. 13, p. 1-13, 2011.
- KIM, H. S. et al. Relationship between *Clonorchis sinensis* infection and cholangiocarcinoma in Korea. **The Korean journal of parasitology**, v. 60, n. 4, p. 261, 2022.
- KIM, Hwa Sun et al. Relationship between *Clonorchis sinensis* infection and cholangiocarcinoma in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 60, n. 4, p. 261, 2022.
- KINJO, T. et al. Acute respiratory distress syndrome due to *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with cervical cancer. **Internal Medicine**, v. 54, n. 1, p. 83-87, 2015.
- KNECHT, D.; JANKOWSKA, A.; ZALESNY, G. The impact of gastrointestinal parasites infection on slaughter efficiency in pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 291-297, 2012.
- KNOLL, L. J. et al. Pearls collections: What we can learn about infectious disease and cancer. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 3, p. e1006915, 2018.
- KOCATÜRK, B.; VERSTEEG, H. H. Orthotopic injection of breast cancer cells into the mammary fat pad of mice to study tumor growth. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 96, p. e51967, 2015.
- KOLIARAKIS, I. et al. Oral bacteria and intestinal dysbiosis in colorectal cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 17, p. 4146, 2019.
- KONNICK, E. Q. et al. Incidental identification of *Strongyloides stercoralis* infection by broad-range 28S rDNA gene sequencing in a patient with a hematolymphoid malignancy. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 86, n. 4, p. 362-364, 2016.
- KOSAŁKA-WĘGIEL, J. et al. Disseminated disease with "*Strongyloides stercoralis*" infestation in follicular lymphoma. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej= Polish Archives of Internal Medicine**, v. 130, n. 10, 2020.
- KUEHN, J. et al. Giant kidney worms in a patient with renal cell carcinoma. **Case Reports**, v. 2016, p. bcr2015212118, 2016.

KUMAR, V. et al. Cancer-associated fibroblasts neutralize the anti-tumor effect of CSF1 receptor blockade by inducing PMN-MDSC infiltration of tumors. **Cancer Cell**, v. 32, n. 5, p. 654- 668.e5, 2017.

KUNST, H. et al. Parasitic infections of the lung: a guide for the respiratory physician. **Thorax**, v. 66, n. 6, p. 528–536, 2011.

KUSHEKHAR, K. et al. Role of Lymphocytes in Cancer Immunity and Immune Evasion Mechanisms. In: **Biomarkers of the Tumor Microenvironment**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 159-182.

KYU, H. H. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1859-1922, 2018.

LABANIA, L. et al. The associated risk of Blastocystis infection in cancer: A case control study. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1115835, 2023.

LEAL-SILVA, T. et al. Detrimental role of IL-33/ST2 pathway sustaining a chronic eosinophil-dependent Th2 inflammatory response, tissue damage and parasite burden during *Toxocara canis* infection in mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 7, p. e0009639, 2021.

LEAL-SILVA, T. et al. IL-17RA receptor signaling contributes to lung inflammation and parasite burden during *Toxocara canis* infection in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 864632, 2022.

LEE, J. S. et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. **Medicine**, v. 97, n. 32, p. 1–8, 2018.

LEE, S.; MARGOLIN, K. Cytokines in cancer immunotherapy. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 3856-3893, 2011.

LEGRAND, F. et al. Human eosinophils exert TNF- α and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7443-7451, 2010.

LEONARDI-BEE, J.; PRITCHARD, D.; BRITTON, J. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis: Systematic review and meta-analysis.

American journal of respiratory and critical care medicine, v. 174, n. 5, p. 514–523, 2006.

LEÓN-CABRERA, S. et al. Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis. **International journal of biological sciences**, v. 10, n. 9, p. 948–956, 2014.

LEONG, C. et al. Antitumour 2-(4-aminophenyl) benzothiazoles generate DNA adducts in sensitive tumour cells in vitro and in vivo. **British journal of cancer**, 88.3: 470-477, 2003.

LEUNG, J. W. C., & Chung, S. S. Endoscopic management of biliary ascariasis. **Gastrointestinal endoscopy**, (1988), 34(4), 318-320.

LEWIS, R. et al. Dose-dependent impact of larval *Ascaris suum* on host body weight in the mouse model. **Journal of helminthology**, v. 83, n. 1, p. 1–5, 2009.

LEWIS, R. et al. The development of a mouse model to explore resistance and susceptibility to early *Ascaris suum* infection. **Parasit.** v. 132, p. 289-300, 2006.

LI, J. et al. Long-term cadmium exposure induces epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by activating CYP1B1-mediated glutamine metabolic reprogramming in BT474 cells and MMTV-ErbB2 mice. **Science of The Total Environment**, 2024, 170773.

LI, C.Y; CHANG, Y.L.; LEE, Y.C. Human pulmonary dirofilariasis coexisting with intercostal neurilemmoma: a case report and literature review. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 112, n. 10, p. 644-647, 2013.

LI, Q. Y.; ZHAO, D. H.; QU, H. Y.; ZHOU, C. N. Life-threatening complications of ascariasis in trauma patients: a review of the literature. **World Journal of Emergency Medicine**, v. 5, p.165-170, 2014.

LIN, C. et al. Simultaneous giant mucinous cystadenoma of the appendix and intestinal schistosomiasis: ‘case report and brief review’. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 12, p. 1-4, 2014.

- LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, 2007.
- LIN, Y. et al. Global burden and trends of neglected tropical diseases from 1990 to 2019. **Journal of travel medicine**, v. 29, n. 3, 2022.
- LIU, L. et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. **PloS one**, v. 10, n. 1, p. e0117058, 2015.
- LIU, M. et al. TGF- β suppresses type 2 immunity to cancer. **Nature**, v. 587, n. 7832, p. 115-120, 2020.
- LIU, W. et al. Schistosomiasis combined with colorectal carcinoma diagnosed based on endoscopic findings and clinicopathological characteristics: a report on 32 cases. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 8, p. 4839-4842, 2013.
- LIU, Y. et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative imaging in medicine and surgery**, v. 5, n. 5, p. 708–729, 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOFFLER, W. Transient lung infiltrations with blood eosinophilia. **International archives of allergy and applied immunology**, v. 8, n. 1–2, p. 54–59, 1956.
- LOUKAS, A. et al. Hookworm infection. **Nature reviews Disease primers**, v. 2, n. 1, p. 1-18, 2016.
- LOUW, J. H. Abdominal complications of *Ascaris lumbricoides* infestation in children. **Brit J Surg**, v. 53, n. 6, p. 510-22, 1966.
- LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-2128, 2012.

LU, Y. et al. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68059, 2013.

LUCARINI, V. et al. IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 6, p. e1317420, 2017.

LUO, J. et al. Study on the mitochondrial apoptosis pathways of small cell lung cancer H446 cells induced by *Trichinella spiralis* muscle larvae ESPs. **Parasitology**, v. 144, n. 6, p. 793-800, 2017.

SOUZA, J. L. N. et al. Analysis of the stability of the reference genes GAPDH, SDHA and RPL-19 in sheep from a semi-arid region infected by gastrointestinal nematodes. **BMC Veterinary Research**, v. 19, n. 1, p. 147, 2023.

LUO, J. et al. Study on the mitochondrial apoptosis pathways of small cell lung cancer H446 cells induced by *Trichinella spiralis* muscle larvae ESPs. **Parasitology**, v. 144, n. 6, p. 793-800, 2017.

LUSTIGMAN, S. et al. A Research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiasis. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, n. 4, p. e1582, 2012.

LYNG, Maria B. et al. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. **BMC cancer**, v. 8, p. 1-11, 2008.

MA, M; HUANG, W; KONG, D. IL-17 inhibits the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer via activating STAT3. **International immunopharmacology**, v. 59, p. 148-156, 2018.

MA, N. et al. Nitrate DNA damage and Oct3/4 expression in urinary bladder cancer with *Schistosoma haematobium* infection. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 414, n. 2, p. 344-349, 2011.

MAGALHÃES, L. et al. Immunological underpinnings of *Ascaris* infection, reinfection and co-infection and their associated co-morbidities. **Parasitology**, v. 148, n. 14, p. 1764-1773, 2021.

- MAHMOUDVAND, H. et al. Possible association and risk factors of *Blastocystis* infection and colorectal cancers in Western Iran. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, 2021.
- MAJIDZADEH-A, K; ESMAEILI, R; ABDOLI, N. TFRC and ACTB as the best reference genes to quantify Urokinase Plasminogen Activator in breast cancer. **BMC research notes**, v. 4, p. 1-7, 2011.
- MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer biology & therapy**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010.
- MALTA, D. C. et al. Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e regiões, projeções para 2025. **Revista brasileira de epidemiologia [Brazilian journal of epidemiology]**, v. 22, n. 0, p. e190030, 2019.
- MANFROI, A.; STEIN, A. T.; CASTRO FILHO, E. D. Abordagem das parasitoses intestinais mais prevalentes na infância. **Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 8, p. 1-26, 2009.
- MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 88, n. 4, p. 937– 941, 2015.
- MARIATHASAN, S. et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. **Nature**, v. 554, n. 7693, p. 544-548, 2018.
- MARSLAND, B. J. et al. *Nippostrongylus brasiliensis* infection leads to the development of emphysema associated with the induction of alternatively activated macrophages. **European journal of immunology**, v. 38, n. 2, p. 479-488, 2008.
- MARTEL, Catherine et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e180-e190, 2020.

MATSUZAKI, Yu et al. β 2-Microglobulin is an appropriate reference gene for RT-PCR-based gene expression analysis of hematopoietic stem cells. **Regenerative Therapy**, v. 1, p. 91-97, 2015.

MAYER, D. A.; FRIED, B. The role of helminth infections in carcinogenesis. **Advances in parasitology**, v. 65, p. 239–296, 2007.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, p. 571-582, 2009.

MCKAY, D.; SHUTE, A.; LOPES, F. Helminths and intestinal barrier function. **Taylor & Francis**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2017.

MEI, J. et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 2, n. 23, 2016.

MEI, J. et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 34217, 2016.

MESRI, E. A.; CESARMAN, E.; BOSHOFF, C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 10, p. 707-719, 2010.

MIGOWSKI, A. et al. A atenção oncológica e os 30 anos do Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2018, 64.2: 247-250.

MILLER, F. R.; MILLER, B. E.; HEPPNER, G. H. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. **Invasion & metastasis**, v. 3, n. 1, p. 22–31, 1983.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: Epidemiology and global burden. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 2017.

MITTEREGGER, Dieter et al. High detection rate of *Trichomonas vaginalis* in benign hyperplastic prostatic tissue. **Medical microbiology and immunology**, v. 201, p. 113-116, 2012.

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F. M.; YOUNG, H. A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 5, p. 1043-1051, 2005.

MOHAMMADI, M. et al. MicroRNA-365 promotes apoptosis in human melanoma cell A375 treated with hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* sensu stricto. **Microbial Pathogenesis**, v. 153, p. 104804, 2021.

MOJARAD, E. N.; ESAFAHANI, A. T.; ZALI, M. R. Intratumoral infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in colorectal cancer patients: Independent of oncogenetic features. **Journal of Cellular Physiology**, p. 1–10, 2018.

MOLINA, F. Xavier et al. Colangiocarcinoma intrahepático sobre quiste hidatídico. **Cirugía Española**, v. 82, n. 3, p. 182-184, 2007.

MONTERO, R. et al. Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. **Mutagenesis**, v. 14, n. 2, p. 217-220, 1999.

MOORE, P. S.; CHANG, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. **Nature reviews cancer**, v. 10, n. 12, p. 878-889, 2010.

MORANO, J.; MORANO, J. F. B. Ascaridiose vesicular. **RECCS**. p. 12-3, 1988.

MOREIRA, A. et al. Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 9, n. 2, p. 115-121, 2017.

MOTORNA, O. O. et al. Analysis of lacI mutations in Big Blue® transgenic mice subjected to parasite-induced inflammation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 484, n. 1-2, p. 69-76, 2001.

MUKHERJEE, S. **O imperador de todos os males: uma biografia do câncer**. São Paulo: Companhia das Letras, 2012.

MULDER, W. J. M. Therapeutic targeting of trained immunity. **Nature Reviews Drug Discovery**, n. 18, v. 7, p. 553–566, 2019.

MURAOKA, R. S. et al. Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 12, p. 1551-1559, 2002.

MURATA, M. Inflammation and cancer. **Environmental health and preventive medicine**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2018.

MURDOCK, B. J. et al. Coevolution of Th1, TH2, and Th17 responses during repeated pulmonary exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect Immun.** v. 79, n. 1, p. 125-35, 2011.

MURRELL, K. D. et al. *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. **The journal of parasitology**, v. 83, n. 2, p. 255–260, 1997.

NA, B.-K.; PAK, J. H.; HONG, S.-J. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis. **Acta tropica**, v. 203, n. 105309, p. 105309, 2020.

NAGAOKA, K. et al. Deep immunophenotyping at the single-cell level identifies a combination of anti-IL-17 and checkpoint blockade as an effective treatment in a preclinical model of data-guided personalized immunotherapy. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 8, n. 2, 2020.

NAIR, S.; DHODAPKAR, M. V. Natural killer T cells in cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1178, 2017.

NASCIMENTO, R. G.; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, n. 1, p. e20200024, 2020.

NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E. et al. Intratumoral infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in colorectal cancer patients: Independent of oncogenetic features. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 4, p. 4768-4777, 2019.

NOGUEIRA, D. S. et al. Eosinophils mediate SIgA production triggered by TLR2 and TLR4 to control *Ascaris suum* infection in mice. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 11, p. e1010067, 2021.

NOGUEIRA, D. S. et al. Multiple exposures to *Ascaris suum* induce tissue injury and mixed Th2/Th17 immune response in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004382, 2016.

NOTO, J. M.; PEEK, J. R.; RICHARD, M. The gastric microbiome, its interaction with *Helicobacter pylori*, and its potential role in the progression to stomach cancer. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 10, p. e1006573, 2017.

NOYA, V. et al. Mucin-like peptides from *Echinococcus granulosus* induce antitumor activity. **International journal of oncology**, v. 43, n. 3, p. 775–784, 2013.

NUTMAN, T. B. Evaluation and differential diagnosis of marked, persistent eosinophilia. **Immunol Allergy Clin North Am.** v. 27, n. 3, p. 529-49, 2007.

O’LORCAIN, P.; HOLLAND, C. V. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. **Parasitology**, v. 121, p.51-71, 2000.

OIKONOMOPOULOU, K. et al. Association between *Echinococcus granulosus* infection and cancer risk—a pilot study in Cyprus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, 54.12: 1955-1961, 2016.

OLIVEIRA, F. M. S et al. The long-lasting *Ascaris suum* antigens in the lungs shapes the tissue adaptation modifying the pulmonary architecture and immune response after infection in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 186, p. 106483, 2024.

OLIVEIRA, F. M. S. et al. Comorbidity associated to *Ascaris suum* infection during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007896, 2019.

OLIVEIRA, F. M. S. et al. Nitric oxide contributes to liver inflammation and parasitic burden control in *Ascaris suum* infection. **Experimental parasitology**, v. 238, n. 108267, p. 108267, 2022.

OLIVEIRA, F. M. S. et al. The long-lasting *Ascaris suum* antigens in the lungs shapes the tissue adaptation modifying the pulmonary architecture and immune response after infection in mice. **Microbial pathogenesis**, p. 106483, 2024.

OLIVEIRA, Y. L. C., et al. Inflammatory Profile of Th9 Cells and Their Protective Potential in Helminth Infections. **Immuno**, 2023, 3.2: 228-236.

OTHMAN, A. A.; EL-SHOUBAGY, S. H.; SOLIMAN, R. H. Kinetics of Foxp3-expressing regulatory cells in experimental *Toxocara canis* infection. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 454-459, 2011.

OWNBY, H. E. et al. Peripheral lymphocyte and eosinophil counts as indicators of prognosis in primary breast cancer. **Cancer**, v. 52, n. 1, p. 126-130, 1983.

PALUCKA, A. K.; COUSSENS, L. M. The basis of oncoimmunology. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1233–1247, 2016.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 439–445, 2010.

PAPANDRINOPOULOU, D., et al. Lung compliance and chronic obstructive pulmonary disease. **Pulmonary medicine**, 2012, 2012.

PARFENOV, M. et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 43, p. 15544-15549, 2014.

PARK, M. K.; LEE, C. H.; LEE, H. Mouse models of breast cancer in preclinical research. **Laboratory animal research**, v. 34, n. 4, p. 160–165, 2018.

PARKIN, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **International journal of cancer**, v. 118, n. 12, p. 3030-3044, 2006.

PARVANI, J. G. et al. Deptor enhances triple-negative breast cancer metastasis and chemoresistance through coupling to survivin expression. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 3, p. 317–328, 2015.

PASTILLE, E. et al. Intestinal helminth infection drives carcinogenesis in colitis-associated colon cancer. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006649, 2017.

PAUNOVIC, Brankica et al. Colonic Schistosomiasis and Associated Cecal Neuroma. **Connecticut Medicine**, v. 77, n. 6, 2013.

- PAYNE, S. N. et al. Novel murine pancreatic tumor model demonstrates immunotherapeutic control of tumor progression by a *Toxoplasma gondii* protein. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 12, 2021.
- PEISONG, G. et al. An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation. **Genes and immunity**, v. 5, n. 1, p. 58–62, 2004.
- PENG, W. et al. Recent insights into the epidemiology and genetics of *Ascaris* in China using molecular tools. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 3, p. 325–330, 2007.
- PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters**, 26: 509-515, 2004.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.
- PHILLS, J. A. et al. Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. **The New England journal of medicine**, v. 286, n. 18, p. 965–970, 1972.
- PINLAOR, S. et al. 8-nitroguanine formation in the liver of hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 309, n. 3, p. 567–571, 2003.
- PINLAOR, S. et al. Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. **Nitric oxide: biology and chemistry**, v. 11, n. 2, p. 175–183, 2004.
- PIOTROWSKI, I.; KULCENTY, K.; SUCHORSKA, W. Interplay between inflammation and cancer. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 25, n. 3, p. 422-427, 2020.
- PLEDGIE-TRACY, A. et al. The role of the polyamine catabolic enzymes SSAT and SMO in the synergistic effects of standard chemotherapeutic agents with a polyamine analogue in human breast cancer cell lines. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 1067–1081, 2010.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

POPOV, H; DONEV, I. S.; GHENEV, P. Quantitative analysis of tumor-associated tissue eosinophilia in recurring bladder cancer. **Cureus**, v. 10, n. 9, 2018.

PORTO-MASCARENHAS, Elisa Cancado et al. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 110, p. 62-73, 2017.

PRIZMENT, A. E. et al. Tumor eosinophil infiltration and improved survival of colorectal cancer patients: Iowa Women's Health Study. **Modern pathology**, v. 29, n. 5, p. 516-527, 2016.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. et al **Current protocols in immunology**, v. Chapter 20, n. 1, p. Unit 20.2, 2001.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7. 1 cell-based tumor vaccines. **Cancer research**, v. 58, n. 7, p. 1486-1493, 1998.

PULLAN, R. L. et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasit Vectors**. v. 7, n 37, 2014.

PULLAN, R. L.; BROOKER, S. J. The global limits and population at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 81-95, 2012.

QIAN, B.-Z. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 222–5, 2011.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013.

RAD, S.R. et al. Effect of hydatid cyst antigens on inhibition of melanoma cancer growth in mouse model. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, p. 1-5, 2018.

RAJAGOPAL, S; HOTEZ, P. J.; BUNDY, D. AP. Micronutrient supplementation and deworming in children with geohelminth infections. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e2920, 2014.

RAZAVI, S. A. et al. Validation of reference genes for normalization of relative qRT-PCR studies in papillary thyroid carcinoma. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 15241, 2019.

RAZZAK, M; MARSHAL, L. Breast Cancer. **Nature Reviews Disease Primers**. 10.1038/s41572-019-0111-2. 1p. 2019.

REGITANO, LC de A. et al. On the search for markers of tick resistance in bovines. In: **Animal genomics for animal health**. Karger Publishers, 2008. p. 225-230.

REIS, D. C. et al. Evaluation of the immunomodulatory activity of thalidomide on tumor-associated macrophages in the 4T1 murine metastatic breast cancer model. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, p. 1334-1345, 2021.

REIS, D. C. et al. Versican and tumor-associated macrophages promotes tumor progression and metastasis in canine and Murine models of breast carcinoma. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 577, 2019.

RESENDE, N. M. et al. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 1-11, 2015.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., p.585-597, 2011.

RODERFELD, M. et al. *Schistosoma mansoni* Egg–Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma–Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. **Hepatology**, v. 72, n. 2, p. 626-641, 2020.

ROSTAMIRAD, S. et al. Inhibition of mouse colon cancer growth following immunotherapy with a fraction of hydatid cyst fluid. **Experimental Parasitology**, v. 249, p. 108501, 2023.

ROY, L. D. et al. Collagen induced arthritis increases secondary metastasis in MMTV-PyV MT mouse model of mammary cancer. **BMC cancer**, v. 11, p. 1-20, 2011.

ROY, L. D. et al. Systemic neutralization of IL-17A significantly reduces breast cancer associated metastasis in arthritic mice by reducing CXCL12/SDF-1 expression in the metastatic niches. **BMC cancer**, v. 14, p. 1-13, 2014.

RUAN, S. L. et al. Expression of vascular growth factors in intestinal tissues in colorectal carcinoma patients with schistosomiasis japonica. **Chinese Journal of Schistosomiasis Control**, v. 25, n. 3, p. 250, 2013.

RUBINSTEIN, Mara Roxana et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 2, p. 195-206, 2013.

RUENCHIT, P. et al. Peptide of *Trichinella spiralis* infective larval extract that harnesses growth of human hepatoma cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 882608, 2022.

RUFFELL, B. et al. Leukocyte composition of human breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 8, p. 2796– 801, 2012.

RUIZ-MANZANO, R. A. et al. Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 12, p. e12672, 2019.

RUIZ-MANZANO, R. A. et al. Potential novel risk factor for breast cancer: *Toxocara canis* infection increases tumor size due to modulation of the tumor immune microenvironment. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 736, 2020.

RUSSO, R. C. et al. Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 40, n. 4, p. 410–421, 2009.

RUSSO, R. C. et al. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 45, n. 1, p. 72–80, 2011.

RUSTAGI, T; DASANU, C. A. Risk factors for gallbladder cancer and cholangiocarcinoma: similarities, differences and updates. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 43, p. 137-147, 2012.

RUSTAGI, Tarun; DASANU, Constantin A. Risk factors for gallbladder cancer and cholangiocarcinoma: similarities, differences and updates. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 43, p. 137-147, 2012.

SABINO, K. R.; NUNES, M. B.; PETROIANU, A. Case Report: Ectopic *Schistosoma mansoni* Eggs Inside a Lipoma. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 156, 2016.

SABOYÁ, M. I. et al. Prevalence and intensity of infection of Soil-transmitted Helminths in Latin America and the Caribbean Countries: Mapping at second administrative level 2000-2010. **Pan American Health Organization: Washington D.C.** 2011.

SABRY, A. E. H. A. et al. An initial indication of predisposing risk of *Schistosoma mansoni* infection for hepatocellular carcinoma. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 45, n. 2, p. 233-240, 2015.

SADAOW, L. et al. Molecular identification of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* recovered from humans and pigs in Thailand, Lao PDR, and Myanmar. **Parasitology research**, v. 117, n. 8, p. 2427–2436, 2018.

ŞAHAR, E. A. et al. *Toxoplasma gondii* destroys Her2/Neu-expressing mammary cancer cells in vitro using a continuous feed medium approach. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, n. 10, p. 1204-1209, 2020.

SAHU, K. K. et al. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in mantle cell lymphoma in post-transplant setting. **Annals of Hematology**, v. 100, p. 1089-1091, 2021.

SAKKAL, S. et al. Eosinophils in cancer: favourable or unfavourable?. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 7, p. 650-666, 2016.

SANJEEV, S. M.; LUM, L. C. Biliary ascariasis from a rural setting: A case study. **Med & Health**. v. 7, n. 2, p. 102-6, 2012.

SAPOLNIK, R. Suporte de terapia intensiva no paciente oncológico. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 79, Supl.2, p. 231-242, 2003.

SARDJONO, T. W. et al. Dioctophymatosis renalis in humans: first case report from Indonesia. 2009.

SAUER, S. et al. Hymenolepis diminuta-based helminth therapy in C3 (1)-TAg mice does not alter breast tumor onset or progression. **Evolution, medicine, and public health**, v. 9, n. 1, p. 131-138, 2021.

SAWANT, M. et al. Persistent *Cryptosporidium parvum* infection leads to the development of the tumor microenvironment in an experimental mouse model: results of a microarray approach. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 2569, 2021.

SCHALPER, K. A. et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 3, p. 1–9, 2015.

SCHMIDT, M. I., et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The lancet**, 377.9781: 1949-1961, 2011.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SCHRÖRS, B. et al. Multi-omics characterization of the 4T1 Murine mammary gland tumor model. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 1195, 2020.

SCOTT, M. E. *Ascaris lumbricoides*: a review of its epidemiology and relationship to other infections. **Annales Nestlé**, v. 66, p.7-22, 2008.

SENECAL, J.; NORDIN, A.; VINNERÅS, B. Fate of *Ascaris* at various pH, temperature and moisture levels. **Journal of Water and Health**, v. 18, p.375-382, 2020.

SEO, A. N. et al. Comorbid gastric adenocarcinoma and gastric and duodenal *Strongyloides stercoralis* infection: a case report. **The Korean journal of parasitology**, v. 53, n. 1, p. 95, 2015.

- SEYEDEH, M. S. et al. Low titer of antibody against *Toxoplasma gondii* may be related to resistant to cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 11, n. 2, p. 305-307, 2015.
- SHACTER, E.; WEITZMAN, S. A. Chronic inflammation and cancer. **Oncology (Williston Park)**, v.16, n.2, p.217-226, 2002.
- SHAH, J.; SHAHIDULLAH, A. *Ascaris lumbricoides*: a startling discovery during screening colonoscopy. **Case Reports in Gastroenterology**, v. 12, p.224-229, 2018.
- SHAH, K. N.; FARIDI, Jesika S. Estrogen, tamoxifen, and Akt modulate expression of putative housekeeping genes in breast cancer cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 3-5, p. 219-225, 2011.
- SHAN, M. et al. Agonistic induction of PPAR γ reverses cigarette smoke–induced emphysema. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 3, p. 1371-1381, 2014.
- SHANI, O. et al. Fibroblast-derived IL33 facilitates breast cancer metastasis by modifying the immune microenvironment and driving type 2 immunity. **Cancer research**, v. 80, n. 23, p. 5317-5329, 2020.
- SHELTON, C. L. et al. Rare disease: *Strongyloides* hyperinfection syndrome following resection of meningioma. **BMJ Case Reports**, v. 2012, 2012.
- SHI, H-Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 3, p. 520-527, 2004.
- SHIELS, M. S. et al. Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 24, p. 1871–1880, 2013.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11–30, 2013.
- SILVA, A. V. M; MASSARA, C. L. *Ascaris lumbricoides*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L. de.; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia Humana**, 13 ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. p. 295-301.

- SILVA, L. P. et al. Parasitic and intestinal commensals in the neoplastic patients undergoing chemotherapy. 2011.
- SILVA, T. E. DA et al. Unraveling *Ascaris suum* experimental infection in humans. *Microbes and infection*, v. 23, n. 8, p. 104836, 2021.
- SILVEIRA, M. R. et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6263-6272, 2002.
- SIMONE, B. A. et al. Caloric restriction coupled with radiation decreases metastatic burden in triple negative breast cancer. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 15, n. 17, p. 2265–2274, 2016.
- SIMSON, L. et al. Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4222-4229, 2007.
- SITHITHAWORN, P. et al. The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. **Parasitology international**, v. 61, n. 1, p. 10-16, 2012.
- SITHITHAWORN, P. et al. The systematics and population genetics of *Opisthorchis viverrini* sensu lato: implications in parasite epidemiology and bile duct cancer. **Parasitology International**, v. 61, n. 1, p. 32-37, 2012.
- SITOTAW, E. et al. Prevalence of Intestinal Helminths among Cancer Patients Who Are under Chemotherapy at the University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital Oncology Clinic, Northwest Ethiopia. **Journal of Cancer Epidemiology**, 2022, 2022.
- SMITH, M. CP et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. **Cancer research**, v. 64, n. 23, p. 8604-8612, 2004.
- SOMARELLI, J. A. The hallmarks of cancer as ecologically driven phenotypes. **Frontiers in ecology and evolution**, v. 9, p. 661583, 2021.
- SONODA, H. et al. An *Anisakis* larva attached to early gastric cancer: report of a case. **Surgery today**, v. 45, p. 1321-1325, 2015.

- SOUSA-FIGUEIREDO, J. C. et al. Epidemiology of malaria, schistosomiasis, geohelminths, anemia and malnutrition in the context of a demographic surveillance system in northern Angola. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e33189, 2012.
- SOUZA, C. M. et al. Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2013.
- SOUZA, C. M. et al. Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.66, p.491-498, 2012.
- SOUZA, J. L. N. et al. Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in different tissues from mice infected by *Ascaris suum*. **Microbial Pathogenesis**, 2024, 106567.
- SPRENT, J. F. A. On the migratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. I distribution of larvae in tissues. **J Infect Dis.** v. 90, p. 165-76, 1952.
- SRIPA, B. et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. **PLoS medicine**, v. 4, n. 7, p. e201, 2007.
- SRIPA, B. et al. Opisthorchiasis and *Opisthorchis*-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. **Acta tropica**, v. 120, p. S158-S168, 2011.
- STARK, J. R. et al. Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 20, p. 1406-1411, 2009.
- STEPHENSON, L. S. et al. The impact of helminth infections on human nutrition: schistosomes and soil-transmitted helminths. **Taylor and Francis Ltd**, 1987.
- STRATH, M. et al. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Met.** v. 83, p. 209-15, 1985.
- SULŻYC-BIELICKA, V. et al. Colorectal cancer and *Blastocystis* sp. infection. **Parasites & Vectors**, v. 14, p. 1-9, 2021.

- SULŻYC-BIELICKA, V. et al. Colorectal cancer and *Cryptosporidium* spp. infection. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. e0195834, 2018.
- SUN, L. et al. Activating a collaborative innate-adaptive immune response to control metastasis. **Cancer cell**, v. 39, n. 10, p. 1361-1374. e9, 2021.
- SUN, Y. et al. Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. 2012.
- SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.
- SUTCLIFFE, S. et al. Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial. **International journal of cancer**, v. 124, n. 9, p. 2082-2087, 2009.
- TABARIÈS, S. et al. Granulocytic immune infiltrates are essential for the efficient formation of breast cancer liver metastases. **Breast cancer research**, v. 17, p. 1-18, 2015.
- TAGHIPOUR, A. et al. Is *Ascaris lumbricoides* a risk factor for development of asthma? A systematic review and meta-analysis. **Microbial pathogenesis**, v. 142, n. 104099, p. 104099, 2020.
- TAKATA, I. Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. **Kitasato Arch. Exp. Med.** v. 23, p. 151, 1951.
- TAKEUCHI, E. et al. Interleukin-5-producing malignant pleural mesothelioma with eosinophilic pleural effusion. **Thoracic Cancer**, v. 11, n. 10, p. 3043-3046, 2020.
- TANAKA, T. et al. Relationship among *Strongyloides stercoralis* infection, human T-cell lymphotropic virus type 1 infection, and cancer: a 24-year cohort inpatient study in Okinawa, Japan. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 2, p. 365, 2016.
- TANG, X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. **Cancer Letters**, v. 332, n. 1, p. 3–10, 2013.
- TANG, Y. et al. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 5, p. 335-343, 2016.

- TAO, K. et al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC cancer**, v. 8, p. 1-19, 2008.
- TAURIELLO, D. VF. et al. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. **Nature**, v. 554, n. 7693, p. 538-543, 2018.
- TEIXEIRA, L. A.; FONSECA, C. M. O. **De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2007.
- TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Binding of excreted and/or secreted products of adult hookworms to human NK cells in *Necator americanus*-infected individuals from Brazil. **Infection and immunity**, v. 76, n. 12, p. 5810–5816, 2008.
- TESAN, F. C. et al. 99m Tc-Radiolabeled TPGS Nanomicelles Outperform 99m Tc-Sestamibi as Breast Cancer Imaging Agent. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 2019, 2019.
- THAMSBORG, S. M.; NEJSUM, P.; MEJER, H. Impact of *Ascaris suum* in Livestock. In: *Ascaris: The Neglected Parasite*. [s.l.] **Elsevier**, . p. 363–381, 2013.
- THANAN, R. et al. Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. **Mediators of inflammation**, v. 2012, p. 165879, 2012.
- THOMAS, F. et al. Incidence of adult brain cancers is higher in countries where the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is common. **Biology letters**, v. 8, n. 1, p. 101-103, 2012.
- THONGPIYA, J. et al. Filariasis of the breast caused by *Brugia pahangi*: A concomitant finding with invasive ductal carcinoma. **Parasitology international**, v. 80, p. 102203, 2021.
- THORLEY-LAWSON, D. et al. The link between *Plasmodium falciparum* malaria and endemic Burkitt's lymphoma—new insight into a 50-year-old enigma. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 1, p. e1005331, 2016.
- THORSSON, V. et al. The immune landscape of cancer. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 812-830. e14, 2018.

TIASH, S.; CHUA, M. J.; CHOWDHURY, E. H. Knockdown of ROS1 gene sensitizes breast tumor growth to doxorubicin in a syngeneic mouse model. **International journal of oncology**, v. 48, n. 6, p. 2359–2366, 2016.

TILLI, Tatiana M. et al. A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases. **BMC genomics**, v. 17, p. 1-11, 2016.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science**, v. 347, n. 6217, p. 78–81, 2015.

TORGBOR, C. et al. A multifactorial role for *P. falciparum* malaria in endemic Burkitt's lymphoma pathogenesis. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004170, 2014.

TOSCANO, J. H. B. et al. Identification of appropriate reference genes for local immune-related studies in Morada Nova sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, p. 1253-1262, 2018.

TSOCHEVA, N. T. et al. Combined effect of fascioliasis and diethylnitrosamine carcinogenesis on the activity of the rat liver monooxygenase system. Comparative Biochemistry and physiology. **C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 101, n. 3, p. 475-479, 1992.

TSUDA, H.; ARIMA, N. Sparganosis in follicular lymphoma patient. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 10, p. 857-858, 2014.

TUFFOUR, I. et al. *Schistosoma* egg antigen induces oncogenic alterations in human prostate cells. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2018, 2018.

UBILLOS, L. et al. *Trypanosoma cruzi* extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. **International journal of cancer**, v. 138, n. 7, p. 1719-1731, 2016.

UMANSKY, Vr; UTIKAL, J; GEBHARDT, C. Predictive immune markers in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 6, p. e1158901, 2016.

VALENTINE, C. C.; HOFFNER, R. J.; HENDERSON, S. O. Three common presentations of ascariasis infection in an urban emergency department. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 20, p.135-139, 2001.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VANOIRBEEK, J. A. et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 42, n. 1, p. 96-104, 2010.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. Nature reviews. **Cancer**, v. 7, n. 9, p. 659–672, 2007.

VARRICCHI, G. et al. Eosinophils: The unsung heroes in cancer?. **Oncoimmunology**, v. 7, n. 2, p. e1393134, 2018.

VENNERVALD, B. J.; POLMAN, K. Helminths and malignancy. **Parasite immunology**, v. 31, n. 11, p. 686-696, 2009.

VENNERVALD, B. J.; POLMAN, K. Helminths and malignancy: Helminths and malignancy. **Parasite immunology**, v. 31, n. 11, p. 686–696, 2009.

VIRGONE, C. et al. Bowel parasitosis and neuroendocrine tumours of the appendix. A report from the Italian TREP project. **Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 7, p. 1552-1555, 2015.

VLAMINCK, J.; LEVECKE, B.; VERCRUYSSSE, J.; GELDHOF, P. Advances in the diagnosis of *Ascaris suum* in pigs and their possible applications in humans. **Parasitology**, v. 141, p. 1904-1911, 2014.

WALKER, M.; HALL, A.; BASÁÑEZ, M. G. Trickle or clumped infection process? A stochastic model for the infection process of the parasitic roundworm of humans, *Ascaris lumbricoides*. **International journal for parasitology**. v. 40, n. 12, p. 1381-88, 2010.

WANG, G-P; XU, C-S. Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. **Molecular biotechnology**, v. 46, p. 49-57, 2010.

WANG, J. H. et al. Associations between eosinophils and cancer risk in the UK Biobank. **International Journal of Cancer**, 2024.

WANG, M. et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of schistosomal colorectal cancer. **Colorectal Disease**, v. 18, n. 10, p. 1005-1009, 2016.

WEATHERHEAD, J. E., et al. Ascaris larval infection and lung invasion directly induce severe allergic airway disease in mice. **Infection and immunity**, v. 86, 2018.

WEATHERHEAD, J. E., Gazzinelli-Guimaraes, P., Knight, J. M., Fujiwara, R., Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., & Corry, D. B. Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

WEATHERHEAD, J. E., Porter, P., Coffey, A., Haydel, D., Versteeg, L., Zhan, B., ... & Beaumier, C. M. *Ascaris* larval infection and lung invasion directly induce severe allergic airway disease in mice. **Infection and immunity**, v. 86, n. 12, 2018.

WENZEL, J.; ZEISIG, R.; FICHTNER, I. Inhibition of metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. **Clinical & experimental metastasis**, v. 27, p. 25-34, 2010.

WEST, William H. et al. Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 15, p. 898-905, 1987.

WHITESIDE, T. L. The local tumor microenvironment. **General principles of tumor immunotherapy: basic and clinical applications of tumor immunology**, p. 145-167, 2007.

WHITMORE, S. E.; LAMONT, R. J. Oral bacteria and cancer. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003933, 2014.

WILLIAMS-BLANGERO, S. et al. Genes on chromosomes 1 and 13 have significant effects on *Ascaris* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5533–5538, 2002.

- WILLIAMS-BLANGERO, S. et al. Genetic analysis of susceptibility to infection with *Ascaris lumbricoides*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 6, p. 921–926, 1999.
- WILSON, M. S. et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. **J Exp Med**. v. 207, n. 3, p. 535–52, 2010.
- WILSON, M. S. et al. IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *Schistosoma mansoni*. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 8, p. e1002171, 2011.
- WONG, M. S.; BUNDY, D. A. Quantitative assessment of contamination of soil by the eggs of *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 567–570, 1990.
- WONG, W. J. et al. Concomitant classic Hodgkin lymphoma and schistosomiasis. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 7, p. 840-841, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. Global status report on noncommunicable diseases 2010. **World Health Organization**, 2011.
- WRIGHT, J. E. et al. Current epidemiological evidence for predisposition to high or low intensity human helminth infection: a systematic review. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 65, 2018.
- WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3490, 2018.
- WU, Y. et al. Host gastric corpus microenvironment facilitates *Ascaris suum* larval hatching and infection in a murine model. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 18.2: e0011930, 2024.
- WU, Y. et al. Transient *Ascaris suum* larval migration induces intractable chronic pulmonary disease and anemia in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 12, p. e0010050, 2021.
- XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant molecular biology**, v. 80, n. 1, p. 75–84, 2012.

XIE, F.; WANG, J.; ZHANG, B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. **Functional & integrative genomics**, v. 23, n. 2, p. 125, 2023.

YANG, F. et al. A human case of *Dioctophyma renale* (giant kidney worm) accompanied by renal cancer and a retrospective study of dioctophymiasis. **Parasite**, v. 26, 2019.

YASEN, A. et al. Roles of immune cells in the concurrence of *Echinococcus granulosus* sensu lato infection and hepatocellular carcinoma. **Experimental Parasitology**, v. 240, p. 108321, 2022.

YASUDA, K. et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 9, p. 3451-3456, 2012.

YEUNG, T. L. et al. TGF- β modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment. **Cancer Research**, v. 73, n. 16, p. 5016–5028, 2013.

YONEDA, T. et al. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, n. S12, p. 2979–2988, 2000.

YOUSOFI DARANI, H. et al. Hydatid cyst protoscolices induce cell death in WEHI-164 fibrosarcoma cells and inhibit the proliferation of baby hamster kidney fibroblasts in vitro. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 304183, 2012.

YUAN, X. et al. Activation of C3a receptor is required in cigarette smoke-mediated emphysema. **Mucosal immunology**, v. 8, n. 4, p. 874-885, 2015.

YUE, T. et al. Anti-osteosarcoma effect of antiserum against cross antigen TPD52 between osteosarcoma and *Trichinella spiralis*. **Parasites & Vectors**, v. 14, p. 1-13, 2021.

ZARBL, H. Toxicogenomic analyses of genetic susceptibility to mammary gland carcinogenesis in rodents: implications for human breast cancer. **Breast disease**, v. 28, n. 1, p. 87–105, 2007.

ZAROS, L. G. et al. Evaluation of reference genes for real-time PCR studies of Brazilian Somalis sheep infected by gastrointestinal nematodes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 486-490, 2010.

ZAROS, L. G. et al. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 575-579, 2007.

ZAYNAGETDINOV, R. et al. Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment. **Cancer Research**, v. 75, n. 8, p. 1624–1634, 2015.

ZEDELJ, J. et al. Concomitant presence of hydatid cyst and colorectal liver metastasis. **Turkiye Parazitol Derg**, v. 45, n. 2, p. 146-148, 2021.

ZENG, L.; LI, W.; CHEN, C.-S. Breast cancer animal models and applications. **Zoological research**, v. 41, n. 5, p. 477–494, 2020.

ZHAI, Z.; YAO, Y.; WANG, Y. Importance of suitable reference gene selection for quantitative RT-PCR during ATDC5 cells chondrocyte differentiation. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64786, 2013.

ZHANG, B. et al. M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 66, n. 11, p. 1879–1886, 2011.

ZHANG, N. et al. High prevalence of *Pentatrichomonas hominis* infection in gastrointestinal cancer patients. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-9, 2019.

ZHANG, N. et al. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium parvum* in gastrointestinal cancer patients. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 11, p. 3334, 2020.

ZHANG, Q. et al. Targeting Th17-IL-17 pathway in prevention of micro-invasive prostate cancer in a mouse model. **The Prostate**, v. 77, n. 8, p. 888-899, 2017.

ZHANG, Y. et al. Lack of IL-17 signaling decreases liver fibrosis in murine schistosomiasis japonica. *International immunology*, v. 27, n. 7, p. 317-325, 2015.

- ZHANG, Z. et al. Evaluation of Reference Genes for Quantitative PCR in Four Tissues from Rabbits with Hypercholesterolaemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180403, 2019.
- ZHAO, H. et al. Identification of valid reference genes for mRNA and microRNA normalisation in prostate cancer cell lines. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1949, 2018.
- ZHAO, X. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 30576–30586, 2017.
- ZHOU, Y. et al. Experimental mouse models for translational human cancer research. **Frontiers in immunology**, v. 14, p. 1095388, 2023.
- ZHU, J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 14-24, 2015.
- ZHU, Y. et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. **Cancer research**, v. 74, n. 18, p. 5057–5069, 2014.
- ZHU, Y. C. et al. Synergy between *Toxoplasma gondii* type I Δ GRA17 immunotherapy and PD-L1 checkpoint inhibition triggers the regression of targeted and distal tumors. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 9, n. 11, 2021.
- ZUETER, A. M. et al. Detection of *Strongyloides stercoralis* infection among cancer patients in a major hospital in Kelantan, Malaysia. **Singapore medical journal**, v. 55, n. 7, p. 367, 2014.
- ZÚÑIGA-CONTRERAS, M. et al. *Toxoplasma gondii* IgG seroprevalence in children with cancer from National Children's Antineoplastic Drug Program network in the Metropolitan Region, Chile: a multicenter study. **Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de la Sociedad Chilena de Infectología**, v. 38, n. 2, p. 212-217, 2021.

13 ANEXOS

13.1 Anexo I - Certificados de aprovação da CEUA/UFMG para condução deste projeto



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Fisiopatologia e modulação da resposta imunológica na primoinfecção e reinfecção por *Ascaris suum* em modelo experimental neoplásico", protocolo do CEUA: 178/2021 sob a responsabilidade de Lilian Lacerda Bueno que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 13/09/2021.

Vigência da Autorização	13/09/2021 a 12/09/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	90
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	90
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	90
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	90
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	90
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	90

13.2 Anexo II - Certificados de aprovação da CEUA/UFMG para condução deste projeto



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo da resposta imune inata na ascarirose experimental", protocolo do CEUA: 126/2019 sob a responsabilidade de Lillian Lacerda Bueno que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/10/2019.

Vigência da Autorização	21/10/2019 a 20/10/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6j
Nº de animais	54
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6j
Nº de animais	54
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6j
Nº de animais	54
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / Camundongos geneticamente deficientes para NOD1
Nº de animais	54
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - ICB
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / Camundongos geneticamente deficientes para NOD1
Nº de animais	54
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - ICB

13.3 Anexo III - Artigo publicado na revista *Microbial Pathogenesis*

Microbial Pathogenesis 189 (2024) 106567



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath



Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in different tissues from mice infected by *Ascaris suum*

Jorge Lucas Nascimento Souza^{a,b,1}, Camila de Almeida Lopes^{a,1}, Thais Leal-Silva^a, Flaviane Vieira-Santos^a, Chiara Cássia Oliveira Amorim^a, Luiza de Lima Silva Padrao^a, Ana Rafaela Antunes Porto^a, Ricardo Toshio Fujiwara^a, Remo Castro Russo^b, Lilian Lacerda Bueno^{a,*}

^a Laboratory of Immunobiology and Control of Parasites, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

^b Laboratory of Pulmonary Immunology and Mechanics, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:
Housekeeping genes
Helminths
Experimental ascariasis
RT-qPCR

ABSTRACT

Human ascariasis is the most prevalent helminth infection, affecting 445 million people worldwide. To better understand the impact of the immune system on the pathophysiology of individuals infected with *Ascaris suum*, mice have been used as experimental models. The RT-qPCR technique is a critical auxiliary tool of investigation used to quantify mRNA levels. However, proper normalization using reference genes is essential to ensure reliable outcomes to avoid analytical errors and false results. Despite the importance of reference genes for experimental *A. suum* infection studies, no specific reference genes have been identified yet. Therefore, we conducted a study to assess five potential reference genes (GAPDH, 18s, ACTB, B2M, and HPRT1) in different tissues (liver, lungs, small and large intestines) affected by *A. suum* larval migration in C57BL/6j mice. Tissue collection was carried out to analyze parasite burden and confirm the presence of larvae during the peak of migration in each tissue. Upon confirmation, we analyzed different genes in the tissues and found no common gene with stable expression. Our results highlight the importance of analyzing different genes and using different software programs to ensure reliable relative expression results. Based on our findings, B2M was ranked as the ideal reference gene for the liver, while 18S was the most stable gene in the lung and small intestine. ACTB, or a combination of ACTB with GAPDH, was deemed suitable as reference genes for the large intestine due to their stable expression and less variation between the control and infected groups. To further demonstrate the impact of using different reference genes, we normalized the expression of a chemokine gene (CXCL9) in all tissues. Significant differences in CXCL9 expression levels were observed between different groups in all tissues except for the large intestine. This underscores the importance of selecting appropriate reference genes to avoid overestimating target gene expression levels and encountering normalization-related issues that can lead to false results. In conclusion, our study highlights the significance of using reliable reference genes for accurate RT-qPCR analysis, especially in the context of *A. suum* infection studies in different tissues. Proper normalization is crucial to ensure the validity of gene expression data and avoid potential pitfalls in interpreting results.

1. Introduction

Ascaris lumbricoides, the causative agent of human ascariasis,

represents the most prevalent helminth in impoverished regions, posing a significant public health concern with an estimated 445 million individuals infected worldwide [1]. To comprehend the physiological and

* Corresponding author. Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, 31270 Minas Gerais, Brazil.
E-mail address: lilacerdabueno@gmail.com (L.L. Bueno).

¹ This authors have contributed equally to this work and share the first authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106567>

Received 3 October 2023; Received in revised form 19 January 2024; Accepted 31 January 2024

Available online 14 February 2024

0882-4010/© 2024 Published by Elsevier Ltd.

14 APÊNDICES: PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO (2020-2024)

14.1 Artigos derivados da tese publicados:

1. **SOUZA, J. L. N.**; ANTUNES-PORTO, A. R.; OLIVEIRA, I. da S.; AMORIM, C. C. O.; PIRES, L. O.; DUVAL, I. de B.; AMARAL, L. V. B. do; SOUZA, F. R.; OLIVEIRA, E. A.; CASSALI, G. D.; CARDOSO, V. N.; FERNANDES, S. O. A.; FUJIWARA, R. T.; RUSSO, R. C.; BUENO, L. L. Screening and validating the optimal panel of housekeeping genes for 4T1 breast carcinoma and metastasis studies in mice. **Scientific Reports**, v. 14, p. 1-13, 2024. **DOI: [10.1038/s41598-024-77126-x](https://doi.org/10.1038/s41598-024-77126-x)**.

2. **SOUZA, J. L. N.**; LOPES, C. de A.; LEAL-SILVA, T.; VIEIRA-SANTOS, F.; AMORIM, C. C. O.; PADRÃO, L. de L. S.; ANTUNES-PORTO, A. R.; FUJIWARA, R. T.; RUSSO, R. C.; BUENO, L. L. Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in different tissues from mice infected by *Ascaris suum*. **Microbial Pathogenesis**, p. 1-10, 2024. **DOI: [10.1016/j.micpath.2024.106567](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106567)**.

14.2 Artigos derivados da tese submetidos:

1. **SOUZA, J. L. N.**; AMORIM, C. C. O.; LOPES, C. de A.; VIEIRA-SANTOS, F.; ANTUNES-PORTO, A. R.; VIEIRA, T. C.; OLIVEIRA, E. A.; SOUZA, F. R.; KRAEMER, L.; CARDOZO, M. E.; BRITO, R. M. de M.; MAGALHÃES, L. M. D.; CASSALI, G. D.; FUJIWARA, R. T.; RUSSO, R. C.; BUENO, L. L. Single and re-infection with *Ascaris suum* triggers anemia, persistent inflammation, and chronic pulmonary disease in a dose-dependent manner. **Heliyon**. 2024.

2. **SOUZA, J. L. N.**; AMORIM, C. C. O.; VIEIRA-SANTOS, F.; PORTO, A. R. A.; OLIVEIRA, I. da S.; ELIAS, A. M. S.; OLIVEIRA, E. A.; SOUZA, F. R.; DUVAL, I. de B.; CARDOZO, M. E.; BRITO, R. M. de M.; MAGALHÃES, L. M. D.; CASSALI, G. D.; FUJIWARA, R. T.; RUSSO, R. C.; BUENO, L. L. Larval infection by *A. suum* triggers chronic liver inflammation, cholestatic disease, fibrosis and persistent systemic inflammation **ACS Infectious Diseases**. 2024.

14.3 Artigos derivados da tese em processo de submissão:

1. *Parasitic Infections and Cancer: Occurrence, immune aspects and Insights from Human Diseases and Experimental Models* – Revista pretendida: **European Journal of Cancer**.
2. *Impact of eosinophilia caused by high parasite burden of A. suum on progression of 4T1 murine breast carcinoma and metastases in lung* – Revista pretendida: **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**
3. *Previous Ascaris suum infection is a risk factor for 4T1 breast carcinoma progression and lung metastasis* – Revista pretendida: **Frontiers immunology**.
4. *Aspects related to liver metastasis of 4T1 murine breast carcinoma after exposure to low doses of A. suum infection* – Revista pretendida: **Plos Neglected Tropical Diseases**.

14.4 Artigos publicados como primeiro autor:

1. **SOUZA, J. L. N.**; SILVA, F. C.; DA SILVA, C. G.; BOMFIM, I. M. F. N.; MEDEIROS, H. R. DE; ZAROS, L. G. Analysis of the stability of the reference genes GAPDH, SDHA and RPL-19 in sheep from a semi-arid region infected by gastrointestinal nematodes. **BMC Veterinary Research**, v. 19, p. 1-8, 2023. **DOI: 10.1186/s12917-023-03709-x**.
2. **SOUZA, J. L. N.** Um pouco do meu eu professor. **Cadernos de Estágio**, v. 1, n. 1, p. 24-26, 2020. **DOI: 10.21680/2763-6488.2019v1n1ID24784**.

14.5 Artigos como colaborador:

1. BASTILHO, A. L.; BRITO, R. M. M.; ANDRADE, J. L.; RIHS, J. B. R.; DUVAL, I. B.; CARDOZO, M. E.; PORTO, A. R. A.; AMARAL, L. B.; **SOUZA, J. L. N.**; CASSALI, G. D.; MELO, B. K. C.; LEMOS, J. A. B.; CAVALCANTE, R. S.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T.; SOUTO, J. T.; MAGALHÃES, L. M. D.; ANDRADE-NETO, V. F. **Parasitology**. (Artigo submetido).

2. DUVAL, I. B.; CARDOZO, M. E.; SOUZA, J. L. N.; BRITO, R. M. M.; FUJIWARA, R. T.; BUENO, L. L.; MAGALHÃES, L. M. D. Parasite Infections: How Inflammation alters brain function. **Trends in parasitology. (Artigo aceito para publicação)**

3. LOPES, C. A.; LEAL-SILVA, T.; VIEIRA-SANTOS, F.; **SOUZA, J. L. N.**; OLIVEIRA, C. C. A.; OLIVEIRA, F. M. S.; KRAEMER, L.; MAGALHAES, L.; BARA-GARCIA, P.; KANG, B.; ZAMBONI, D.; RUSSO, R. C.; FUJIWARA, R. T.; NUTMAN, T. B.; GAZZINELLI-GUIMARAES, P.; BUENO, L. L. NOD1 signaling regulates tissue inflammation during helminth infection. **Mucosal immunology. DOI: 10.1016/j.mucimm.2024.12.004**

4. AMORIM, C. C. O.; NOGUEIRA, D. S.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C.; SILVA, T. L.; BARBOSA, F. S.; OLIVEIRA, F. M. S.; KRAEMER, L. R.; ALMEIDA, R. M.; **SOUZA, J. L. N.**; MAGALHÃES, L. M. D.; RUSSO, R. C.; CALIARI, M. V.; GAZE, S.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T. Dose-response effects of multiple *Ascaris suum* exposures and their impact on lung protection during larval ascariasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 12, p. e0012678, 2024. **DOI: 10.1371/journal.pntd.0012678.**

5. VIEIRA-SANTOS, F.; BRITO, R. M. de M.; LOPES, C. de A.; LEAL-SILVA, T.; **SOUZA, J. L. N.**; AMORIM, C. C. O.; RUAS, A. C. L.; PADRÃO, L. de L. S.; KRAEMER, L.; OLIVEIRA, F. M. S.; CALIARI, M. V.; RUSSO, R. C.; FUJIWARA, R. T.; MAGALHÃES, L. M. D.; BUENO, L. L. Alveolar macrophages and monocyte subpopulations during *Plasmodium berghei* NK65 experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Heliyon**, v. 10, n. 14, 2024. **DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e33739.**

6. BRITO, R. M. de M.; SILVA, M. C. M.; VIEIRA-SANTOS, F.; LOPES, C. de A.; **SOUZA, J. L. N.**; BASTILHO, A. L.; FERNANDES, H. de B.; MIRANDA, A. S.; OLIVEIRA, A. C. P.; VITOR, R. W. A.; ANDRADE-NETO, V. F.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T.; MAGALHÃES, L. M. D. Chronic infection by atypical *Toxoplasma gondii* strain induces disturbance in microglia population and altered behaviour in mice. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 30, p. 100652, 2023. **DOI: 10.1016/j.bbih.2023.10065.**

7. LEAL-SILVA, T.; LOPES, C. D. A.; VIEIRA-SANTOS, F.; OLIVEIRA, F. M. S.; KRAEMER, L.; PADRÃO, L. D. L. S.; AMORIM, C. C. O.; **SOUZA, J. L. N.**; RUSSO, R. C.; FUJIWARA, R. T.; MAGALHÃES, L. M. D.; BUENO, L. L. IL-17RA receptor signaling contributes to lung inflammation and parasite burden during *Toxocara canis* infection in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 3568, 2022. **DOI: 10.3389/fimmu.2022.864632**.

8. LEAL-SILVA, T.; DE ALMEIDA LOPES, C.; VIEIRA-SANTOS, F.; OLIVEIRA, F. M. S.; KRAEMER, L.; PADRÃO, L. D. L. S.; AMORIM, C. C. O.; **SOUZA, J. L. N.**; BARBOSA, F. S.; RACHID, M. A.; RUSSO, R. C.; FUJIWARA, R. T.; BUENO, L. L. Tissue eosinophilia correlates with mice susceptibility, granuloma formation and damage during *Toxocara canis* infection. **Parasitology**, v. 149, p. 893-904, 2022. **DOI: 10.1017/S0031182022000075**.

14.6 Premiações:

1. Premiação na categoria Relevância acadêmica pelo trabalho *Inflamação crônica derivada da alta dose de ovos de Ascaris suum pode inibir o crescimento de metástases hepáticas em modelo experimental murino* apresentado na Semana do conhecimento UFMG/2024 em Belo Horizonte/MG (2024).

2. Menção honrosa pelo trabalho *Chronic inflammation driven by high load of Ascaris suum eggs inhibits the growth of breast cancer metastases in the liver in experimental model* na categoria Helminologia apresentado na modalidade pôster no XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia em Aracaju/SE (2023).

3. Prêmio Ph.D Poster of Distiction (co-autor) pelo trabalho *Plasmodium Berghei NK65 malaria induces neuroinflammation and promotes cognitive deficits in mice* apresentado na modalidade oral no XLVII Congress of the Brazilian Society of immunology em Ouro Preto/MG (2023).

4. Premiação na categoria Relevância acadêmica pelo trabalho *A infecção por Ascaris suum pode constituir um potencial fator de risco para progressão do câncer de mama e*

metástase pulmonar apresentado na Semana do conhecimento UFMG/2023 em Belo Horizonte/MG (2023).

5. Premiação pelo destaque na categoria helmintologia pelo trabalho ***Aspectos relacionados a associação entre a primoinfecção de Ascaris suum com o câncer de mama e metástase pulmonar em modelo experimental*** apresentado na modalidade pôster no XII Encontro de Pesquisa em Parasitologia Paulo Marcos Zech Coelho - Parasitologia e saúde única: conectar conhecimentos e transcender barreiras em Belo Horizonte/MG (2022).

6. Menção honrosa pelo trabalho ***A infecção por Ascaris suum constitui um potencial fator de risco para progressão do câncer de mama e metástase pulmonar em modelo experimental*** apresentado na modalidade oral na 57^a edição do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical em Belém/PA (2022).

7. Mérito de melhor dissertação defendida no **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária - UFRN na área de Parasitologia no ano de 2020** em Natal/RN (2021).