

ESTUDO MORFOMÉTRICO DA PAREDE DO CÓLON DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi* ASSOCIADO A ADMINISTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Caroline Volpato Senhorini (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria Gabriela Lima da Silva, Debora de Mello Gonçales San´Ana, Izadora Volpato Rossi, Marcel Ivan Ramirez, Amanda Gubert Alves dos Santos (Coorientadora), Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo (Orientadora). E-mail: 130084@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Parasitologia, Protozoologia de Parasitos/Protozoologia Parasitária Humana

Palavras-chave: Morfometria de parede; *Trypanosoma cruzi*; Vesículas extracelulares.

RESUMO

Esse trabalho objetivou avaliar a morfologia do cólon de camundongos Balb/c após infecção por *Trypanosoma cruzi* associada ou não com vesículas extracelulares (VEs). Foram utilizados 46 camundongos machos, distribuídos em 6 grupos (n=7): Grupo Controle (GC), Grupo Infectado apenas com CL Brener (GI) e quatro grupos que receberam as VEs: CLBre + C2C12, CLBre + Caco-2, Dm28c + C2C12 e Dm28c + Caco-2. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e as amostras coletadas foram fixadas, emblocadas e coradas com a técnica de hematoxilina e eosina. Assim, foi efetuada a mensuração da profundidade e largura das criptas, espessura da túnica mucosa, submucosa, das camadas musculares e da parede intestinal total. Foi realizada a análise estatística e a partir dos resultados obtidos, foi possível observar uma redução da camada muscular nos grupos infectados com vesículas extracelulares em comparação com o grupo de animais infectados, o que pode estar associado à resposta inflamatória.

INTRODUÇÃO

Apesar de ser negligenciada, a Doença de Chagas é um dos maiores problemas de saúde pública, especialmente na América Latina, sendo uma infecção parasitária causada pelo protozoário hemoflagelado intracelular obrigatório *Trypanosoma cruzi* (NEVES et al., 2016). Em infecções experimentais crônicas por *T. cruzi*, foi demonstrado que o trato gastrointestinal e a pele são os principais reservatórios do

parasito (KHAN et al., 2021), sendo observadas alterações na deposição de colágeno no esôfago e no cólon, com a detecção do DNA do parasito. Porém, ainda não se sabe quais mecanismos determinam a migração do parasito para determinados tecidos, contudo uma hipótese é a de que as VEs estejam envolvidas, uma vez que estudos sugerem que essas vesículas desempenham um papel importante na dinâmica parasito-hospedeiro e na fisiopatologia da doença de Chagas (ROSSI; GAVINHO; RAMIREZ, 2019). Estudos com camundongos infectados com VEs mostram o desenvolvimento de uma patologia cardíaca grave com uma reação inflamatória intensa e um maior número de ninhos de amastigotas (TROCOLI TORRECILHAS et al., 2009). Também foi observado que as VEs derivadas de uma cepa do parasito podem afetar a taxa de infectividade de outra cepa (RIBEIRO et al., 2018). Assim, com o estudo da morfometria de parede, seria possível não somente verificar as possíveis alterações na histoarquitetura do cólon dos animais após a infecção pelo parasito, mas também compreender se as vesículas extracelulares influenciam nessas alterações. Sendo assim, devido a importância da doença e das alterações descritas no trato gastrointestinal, neste trabalho avaliamos as camadas que compõem o cólon dos animais após a infecção crônica por *T. cruzi* e a influência das vesículas extracelulares no curso da infecção.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob o protocolo 5864311022. Foram utilizados 42 camundongos machos da linhagem Balb/c, que foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos ($n = 7$): um grupo não infectado (controle) e cinco infectados por meio da inoculação intravenosa (veia peniana) de uma suspensão contendo 1×10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* juntamente com as vesículas extracelulares purificadas (5 μg de vesículas por animal). Após 30 dias de infecção, os camundongos foram submetidos a eutanásia e as amostras do cólon coletadas foram fixadas, emblocadas e coradas com a técnica de hematoxilina e eosina. A partir do teste de Shapiro-Wilk foi definido que aqueles com distribuição normal seriam comparados pelo teste ANOVA e os de distribuição livre, pelo teste de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar a mensuração da Muscular Total e da Muscular Longitudinal, observou-se que houve um aumento na camada muscular do Grupo Infectado (GI) em relação ao Grupo Controle (GC), enquanto os grupos que receberam as vesículas apresentaram uma diminuição quando comparados ao GI, apresentando valores

semelhantes aos apresentados pelo GC. Já na análise da espessura da camada Muscular Circular, é possível constatar que os grupos EVs CLBre + C2C12, Evs CLBre + Caco-2, Evs Dm28c + C2C12 e Evs Dm28c + Caco-2 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Em contrapartida, o grupo o grupo Evs Dm28c + C2C12 apresentou alterações notáveis. De maneira geral, nota-se um aumento das camadas musculares ao comparar GI com GC. Assim, é possível inferir que a infecção dos animais causou um aumento das camadas musculares, o que refletiu em um aumento da Muscular Total.

A análise morfométrica da Submucosa demonstrou que houve uma diminuição da espessura mensurada do grupo EVs CLBre + C2C12 em relação ao GI, entretanto Evs CLBre + Caco-2, Evs Dm28c + C2C12, Evs Dm28c + Caco-2 e Evs Dm28c + C2C12 obtiveram resultados semelhantes ao GI.

Na análise da espessura da Parede Total, Profundidade de Cripta e Largura de Cripta não foram obtidos resultados estatisticamente significados ao comparar o GI em relação ao GC ou ao comparar o GI com os grupos infectados com as vesículas extracelulares.

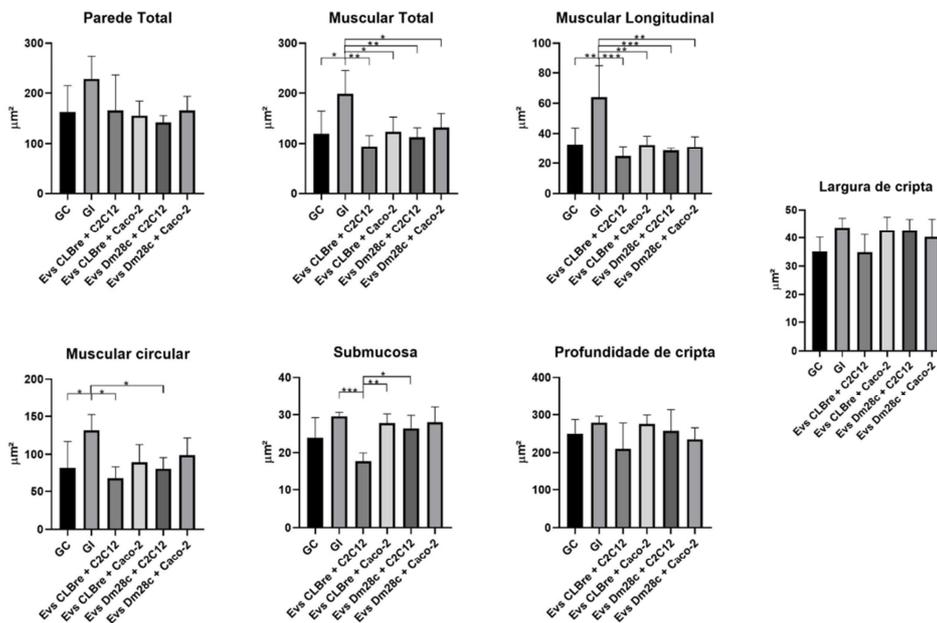


Figura 1 - Análises da morfometria de parede do colón de animais infectados com cepas e vesículas extracelulares de acordo com os grupos: Grupo Controle (GC), Grupo Infectado (GI), EVs CLBre + C2C12 (clone CL Brener + células C2C12); Evs CLBre + Caco-2 (clone CL Brener + células Caco-2); Evs Dm28c + C2C12 (cepa Dm28c + células C2C12) e Evs Dm28c + Caco-2 (cepa Dm28c + células Caco2). Teste Anova uma via + pós teste de Tukey. (N=5). $p < 0,05$; $**p < 0,01$; $**p < 0,001$.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da morfometria de parede indicam uma redução da camada muscular nos grupos infectados com vesículas extracelulares em comparação com o grupo infectado apenas com CL Brener, o que pode estar associado à resposta inflamatória. Outros estudos precisam ser realizados para avaliar melhor essa questão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo apoio financeiro, e ao Grupo de Estudos em Neurogastroenterologia da UEM pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

KHAN, A. A. et al. Local association of *Trypanosoma cruzi* chronic infection foci and enteric neuropathic lesions at the tissue micro-domain scale. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 8, 1 ago. 2021

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

RIBEIRO, K. S. et al. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2018.

ROSSI, I. V.; GAVINHO, B.; RAMIREZ, M. I. Isolation and characterization of extracellular vesicles derived from *Trypanosoma cruzi*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1955, p. 89–104, 2019.

TROCOLI TORRECILHAS, A. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 1, p. 29–39, 1 jan. 2009.