# EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DURANTE A INFECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE AS CÉLULAS CALICIFORMES DO CÓLON DE CAMUNDONGOS BALB/C

Valentiny Stival Nunes Silva de Moraes (PIBIC/AF/IS/CNPQ/FA/UEM), Maria Gabriela Lima da Silva, Amanda Gubert Alves dos Santos, Izadora Volpato Rossi, Marcel Ivan Ramirez, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo (Orientadora). E-mail: ganmelo2@uem.br

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

**Ciências Biológicas, Protozoologia de parasitos/ Protozoologia Parasitária Humana.**

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; Tropismo; Interação Parasito-Hospedeiro.

## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é endêmica na América Latina e afeta milhões de pessoas. Durante a infecção, vesículas extracelulares (VEs) liberadas pelo parasito podem modular a resposta imune do hospedeiro. Este estudo analisou os efeitos das VEs de *T. cruzi* sobre as células caliciformes (CCs) do cólon de camundongos BALB/c, com o objetivo de entender o impacto combinado da infecção com a administração de VEs de diferentes fontes. Foram utilizados 42 camundongos machos divididos em seis grupos, incluindo um não infectado e cinco grupos infectados. O cólon foi fixado, emblocado e cortado em lâminas histológicas, em seguida coradas com PAS e Alcian Blue com pH 1,0 e 2,5, para identificar mucinas nas CCs. A quantificação das células foi realizada por microscópio, e os dados foram analisados estatisticamente. Os resultados mostraram que os grupos infectados com as cepas CL Brener e clone Dm28c em cultivo com a linhagem celular C2C12 apresentaram um aumento significativo na proporção de CCs coradas com AB pH 2,5, sugerindo maior secreção de mucinas ácidas. Esse aumento pode indicar uma resposta adaptativa das CCs à presença de fatores de virulência e a maior atividade inflamatória no intestino nas condições experimentais utilizadas. Em contraste, o grupo infectado apenas com a cepa CL Brener não apresentou aumento significativo nas CCs, evidenciando que a associação com as linhagens celulares potencializou a resposta tecidual na presença das VEs.

## INTRODUÇÃO

*Trypanosoma cruzi* é o protozoário responsável pela doença de Chagas, uma infecção endêmica na América Latina que afeta de 6 a 7 milhões de pessoas (OMS, 2024). A transmissão do *T. cruzi* ocorre principalmente pelo contato com fezes de

triatomíneos após a picada, entretanto pode também ocorrer pela via oral, transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e via congênita. Após a infecção, o parasito invade os macrófagos e se multiplica, de forma crônica, essa infecção pode causar lesões cardíacas, afetar o trato gastrointestinal (TGI) e a pele dos indivíduos infectados (NEVES, 2022).

Durante os estágios iniciais da infecção por *T. cruzi*, VEs são liberadas e podem modular a resposta imune do hospedeiro, aumentando a evasão da resposta e alterando a integridade e função das células e tecidos, sendo cruciais para eventos imunomodulatórios desencadeados pelos parasitos (CORTES-SERRA et al., 2022). Sendo assim, essas VEs também podem ser capazes de modular respostas celulares do TGI e atuar como importantes mediadores pró-inflamatórios (TORRECILHAS et al., 2020). Entre os tipos de células que podem ser afetadas estão as células caliciformes, que são responsáveis pela secreção de muco e pela proteção da mucosa intestinal, além de desempenharem um papel importante na regulação da resposta inflamatória (UCHOA; CARNEIRO, 2023). Este trabalho analisou os efeitos das VEs liberadas durante a infecção pelo *T. cruzi* sobre as CCs do cólon em camundongos BALB/c.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*Processamento das Amostras Biológicas*

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob protocolo nº 5864311022. Foram utilizados 42 camundongos machos da linhagem BALB/c, com 60 dias de idade e peso variando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=6), sendo um grupo não infectado (controle) e cinco infectados. Para isso, foram utilizadas VEs provenientes do contato com um estoque clonal (CL Brener) e uma cepa (Dm28c) de *T. cruzi* com duas linhagens celulares (mioblasto - C2C12, ou epitélio intestinal - Caco-2).

*Obtenção dos Laminários Histológicos*

O cólon dos camundongos foi fixado em paraformaldeído tamponado a 4% e posteriormente emblocado em parafina. Foram obtidos cortes transversais semi-seriados com espessura de 5 µm, corados com PAS (Periodic Acid-Schiff) para mucinas neutras e sialomucinas lábeis; o Alcian Blue (AB) pH 2,5 para detectar sialomucinas e sulfomucinas; e o Alcian Blue (AB) pH 1,0 para a identificação de células produtoras de sulfomucinas.

*Análises Quantitativas das Células Caliciformes do Cólon*

Para cada um dos seis grupos experimentais foram capturadas 32 imagens de cada animal, em um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital (objetiva de 40x). A quantificação das CCs foi realizada através da análise dessas imagens. Cada imagem representava uma seção das criptas do cólon, onde as células caliciformes foram identificadas e contadas manualmente.

*Análise Estatística*

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism (versão 8.0.1), sendo a distribuição verificada pelo o teste de Shapiro-Wilk. A distribuição dos dados foi considerada normal para todas as análises. Para comparação entre os grupos foi aplicado o teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Tukey, com $p<0,05$. Os dados foram expressos por média ± desvio padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram um aumento significativo na proporção de CCs coradas com AB pH 2,5. Essa coloração possui afinidade com sialomucinas e sulfomucinas, ou seja, mucinas ácidas presentes na secreção de células caliciformes. O aumento na proporção de CCs pode indicar uma maior atividade secretória das células, especialmente em resposta a estímulos inflamatórios ou infecciosos.
Foi observado um aumento notável na proporção de CCs nos grupos das cepas CLBre e clone Dm28c em cultivo com a linhagem celular C2C12 (Figura 1), em comparação com o grupo não infectado e o grupo controle infectado (CLBre). Esses resultados sugerem que as VEs das cepas CLBre e Dm28c de *T. cruzi*, quando associadas à linhagem mioblástica C2C12, podem estimular as CCs a produzir uma resposta em razão da infecção, promovendo uma maior diferenciação das CCs e poderia estar relacionada à resposta adaptativa tecidual devido à presença de fatores de virulência ou maior resposta inflamatória do órgão durante a infecção pelo *T. cruzi* (TORRECILHAS et al., 2020). Por fim, não houve diferença significativa nos grupos pesquisados com as colorações Alcian Blue pH 1,0 e PAS.

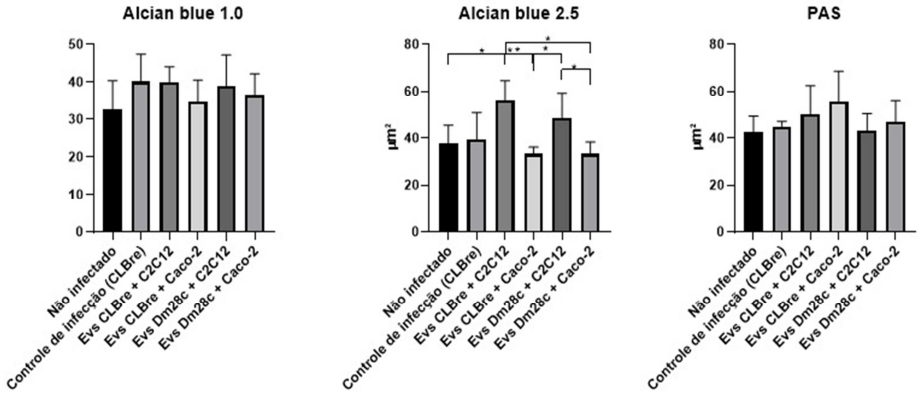


**Figura 1 -** Gráficos de quantificações de células caliciformes em camundongos BALB/c, utilizando colorações com Alcian Blue (AB) a pH 1,0 e 2,5 e PAS. Dados expressos como média ± desvio padrão com nível de significância de 5% e 95% de intervalo de confiança.

## CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados sugerem que a infecção por *Trypanosoma cruzi* e a administração de VEs das cepas CLBrener e Dm28c, em combinação com a linhagem celular C2C12, implicou no aumento da proporção de CCs no cólon dos camundongos analisados. Que pode indicar uma possível resposta imune e adaptativa das células devido à presença de fatores de virulência e à ação inflamatória no órgão proporcionada pela administração das VEs.

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná pelo financiamento que possibilitou a realização deste projeto e incentivo ao avanço científico. Agradeço à minha orientadora, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo, e à minha coorientadora Maria Gabriela de Lima, pelo suporte, orientação e contribuições ao longo da pesquisa, que facilitaram a realização e finalização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

CORTES-SERRA, N. et al. Extracellular Vesicles in *Trypanosoma cruzi* Infection: Immunomodulatory Effects and Future Perspectives as Potential Control Tools against Chagas Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2022, p. 1–11, 17 ago. 2022.

NEVES, DP. **Parasitologia Humana**, 13ª ed., São Paulo, Atheneu, 2022

TORRECILHAS, A. C. et al. Extracellular Vesicles in Trypanosomatids: Host Cell Communication**. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 14 dez. 2020.

UCHOA, C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** - Texto e Atlas, 12ª ed., 2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** WHO, 2024**.** Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab 1>.