

ANÁLISE QUANTITATIVA DE POPULAÇÃO TOTAL DE NEURÔNIOS E CÉLULAS DA GLIA DO PLEXO MIOENTÉRICO DO JEJUNO DE CAMUNDONGOS NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL E EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DURANTE A INFECÇÃO

Helena Hassenpflug Costa (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria Gabriela Lima da Silva Zussa, Gessilda Alcantara Nogueira-Melo (Co-orientador), Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Orientador). E-mail: dmgsana@uem.br.

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

Farmácia, Análises toxicológicas

Palavras-chave: Sistema nervoso entérico; Doença de Chagas; vesículas extracelulares.

RESUMO

A Doença de Chagas é uma doença parasitária que vem tendo uma crescente de casos em países em que não é endêmica, demandando mais estudos sobre seus efeitos e possíveis fatores de evolução da doença para melhor compreensão. Este estudo teve como objetivo analisar quantitativamente a população de neurônios e de células da glia presentes no jejuno em um quadro de infecção da doença com a administração de vesículas extracelulares (produtos citoplasmáticos com atuação na relação célula-parasito). Para isso, foram utilizados 30 camundongos divididos em seis grupos (n=5), sendo um grupo controle, um grupo infectado por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e quatro grupos infectados que foram administradas vesículas extracelulares (VEs) para avaliar alterações na população de células neurais sob tais condições. Os resultados demonstraram uma redução no número de neurônios nos grupos infectados que receberam as VEs, enquanto que o número de células da glia reduziu significativamente apenas nos animais do grupo GI-CLC2. Concluímos que as VEs administradas no momento da infecção teve aumentou os danos neuronais da doença de Chagas.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença infecciosa e inflamatória causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, endêmica de países tropicais, porém classificada como uma doença negligenciada. Possui como principais características alterações cardíacas, gastrointestinais e no sistema nervoso, podendo ser transmitida por um vetor triatomíneo ou por transfusão de sangue. É dividida em fase aguda e crônica, sendo a primeira assintomática ou manifesta sintomas inespecíficos, como febre, e a

fase crônica é responsável por manifestações como mega vísceras e cardiopatia. Por ser uma doença inflamatória, também possui efeito sobre células do sistema nervoso, tendo potencial neurotóxico. As vesículas extracelulares (VEs) são produtos do citoplasma celular que carrega lipídeos, metabólitos, proteínas, DNA e RNA, em quadros de interação célula-parasito tem a capacidade de modular a resposta imune e compostos inflamatórios, podendo servir de marcador molecular ou uma forma de proteção da permanência do parasito. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito da administração de diferentes VEs sobre neurônios e células da glia do jejuno em modelo experimental de doença de Chagas, a fim de entender a extensão dos efeitos da invasão do parasito e como as células neurais são afetadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEAU/UEM) no protocolo nº58644311022. Foram utilizados 30 camundongos machos para o experimento, dividindo-os em seis grupos (n=5), sendo um grupo controle (não infectado), um grupo infectado apenas com o parasito de *T. cruzi* da cepa CL Brener, um grupo infectado porém administrado VEs de células C2C12 e a cepa CL Brener, um grupo infectado com VEs de células Caco-2 e CL Brener, um grupo infectado com VEs de células C2C12 e a cepa Dm28c do parasito e um grupo infectado com VEs de células Caco-2 e cepa Dm28c. A obtenção dessas vesículas foi por meio de parceria com pesquisadores do Instituto Carlos Chagas de Curitiba, Paraná. Após 28 dias da infecção foi feita a eutanásia dos animais e a dissecação para coleta do jejuno.

Imunohistoquímica do Sistema Nervoso Entérico

Foi realizada a microdissecção do jejuno para a obtenção do plexo mioentérico, que foi submetido à lavagem com solução salina estéril (PBS), incubadas em solução bloqueio por duas horas e novamente incubado por 48 horas em uma solução com os anticorpos primários anti- β -tubulina e anti-S100 para que haja a demarcação de neurônios e das células da glia, respectivamente. Após as 48 horas, foi feita novamente a lavagem com PBS e a incubação por 2 horas com o anticorpo secundário conjugado com fluoresceína. Ao término do tempo, as amostras foram lavadas e foram montadas as lâminas para análise.

Análise quantitativa e estatística dos neurônios e das células da glia

Foram capturadas e analisadas 32 imagens com o navegador de imagens FSXBSW integrado a um microscópio óptico Olympus FSX100 (Olympus, Tóquio,

Japão) equipado com filtros de imunofluorescência. Posteriormente foi feita a contagem de neurônio e de células da glia, coletando dados para a análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram uma redução da quantidade populacional de neurônios nos grupos infectados em comparação ao grupo controle, o que indica uma redução de neurônios em um quadro de infecção por *T. cruzi*. Já sobre a quantidade populacional de células da glia não houve uma alteração significativa exceto no grupo infectado que recebeu as VEs CLC2 em comparação ao grupo controle, onde houve uma redução.

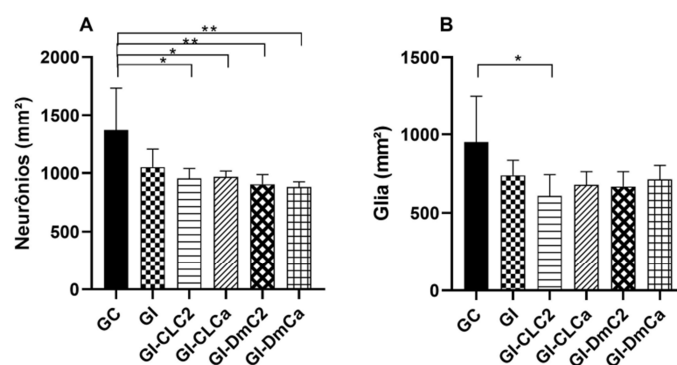


Figura 1 - Análise quantitativa de células gliais imunomarcadas com anti-S100 e neurônios imunomarcados com β -tubulina no cólon de camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* que receberam EVs. CLC2: EVs obtidas da cultura de CL Brener em células C2C12; CLCa: EVs obtidas da cultura de CL Brener em células Caco-2; DmC2: EVs obtidas da cultura de Dm28c em células C2C12; DmCa: EVs obtidas da cultura de Dm28c em células Caco-2. GC: Grupo controle. GI: Grupo infectado. A) Total de neurônios no plexo mioentérico, B) Total de células gliais no plexo mioentérico. Dados apresentados como média $\pm$ DP (n = 5). * p < 0,05, **p < 0,01, ANOVA seguido do teste de Tukey).

Há estudos que contribuem para a compreensão da atuação das VEs e suas diferentes variações (diferentes cepas de *T. cruzi* e de linhagens celulares), avaliando seus efeitos fisiopatológicos e imunes, como abordado nos estudos de CORTE-SERRA, 2022, NOGUEIRA, 2015 e outros, que avaliam sistemicamente as alterações e modulações causadas pela vesículas, porém ainda são escassos os estudos específicos sobre os efeitos no sistema nervoso entérico ou sobre os efeitos diretos nos neurônios locais. Porém há estudos como de CARMO NETO, 2021 que relacionam a neurotoxicidade da inflamação à Doença de Chagas, ainda que não foquem em uma análise quantitativa das células neurais.

CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados mostraram que os neurônios o plexo mientérico sofrem uma redução maior do que as células da glia quando as VE foram administradas aumentando os danos no jejuno da infecção pelo *T. cruzi*.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são direcionados ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que possibilitou realização do projeto, ao laboratório de Neurogastroenterologia da Universidade Estadual de Maringá, à professora Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo e à doutoranda Maria Gabriela de Lima, que me auxiliaram e contribuíram imensamente para a execução do projeto.

REFERÊNCIAS

CARMO NETO, J. R. do; SILVA, M. V. da; BRAGA, Y. L. L.; COSTA, A. W. F. da; FONSECA, S. G.; NAGIB, P. R. A.; CELES, M. R. N.; OLIVEIRA, M. A. P.; MACHADO, J. R. Correlation between intestinal BMP2, IFN γ , and neural death in experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. PLoS One, v. 16, n. 2, e0246692, 9 fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246692>.

CORTES-SERRA, N.; GUALDRON-LOPEZ, M.; PINAZO, M. J.; TORRECILHAS, A. C.; FERNANDEZ-BECERRA, C. 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. 1-15, 17 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/5230603>.

NOGUEIRA, P. M.; RIBEIRO, K.; SILVEIRA, A. C.; CAMPOS, J. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; BELA, S. R.; CAMPOS, M. A.; PESSOA, N. L.; COLLI, W.; ALVES, M. J.; SOARES, R. P.; TORRECILHAS, A. C. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. Journal of Extracellular Vesicles, v. 4, p. 28734, 26 nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>.