

AVALIAÇÃO DOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO PLEXO MIENTÉRICO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi* ASSOCIADA A DIFERENTES VESÍCULAS EXTRACELULARES.

Laura Lavagnoli Barchi (PIBIC - CNPq-FA-UEM). Maria Gabriela Lima da Silva Zussa. Amanda Gubert Alves dos Santos (Coorientadora). E-mail: agasantos@uem.br. Gessilda de Alcântara Nogueira-Melo (Orientadora). E-mail: ganmelo2@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia; Análises toxicológicas

Palavras-chave: Neurônios; Vesículas Extracelulares; *Trypanosoma cruzi*.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, promove alterações no trato gastrointestinal, entretanto, os impactos sobre o intestino delgado permanecem pouco investigados. O intestino delgado possui camadas musculares reguladas pelos plexos submucoso e mientérico. Estes plexos integram o sistema nervoso entérico, responsável pelo peristaltismo. Os neurônios nitrérgicos, exercem papel crucial no relaxamento da musculatura lisa e na vasodilatação do intestino como neurotransmissores inibitórios. Evidências recentes destacam o papel das vesículas extracelulares de *T. cruzi* na modulação da resposta imune e na patogênese, associando-se a inflamação exacerbada. Diante disso, o presente projeto objetiva investigar possíveis alterações nos neurônios mientérico de camundongos infectados com o parasito e submetidos a diferentes vesículas extracelulares. Para isso, 30 camundongos foram distribuídos em seis grupos experimentais: 1 controle não infectado e 5 grupos infectados. Após inoculação intravenosa com tripomastigotas e vesículas, os jejunos foram coletados no 28º dia pós-infecção e processados para análise imuno-histoquímica. A marcação neuronal foi realizada com anticorpos PGP (neurônios totais) e nNos (neurônios nitrérgicos) e avaliada por microscopia de fluorescência, com quantificação da população total de neurônios e da proporção de nitrérgicos. Os resultados demonstraram a influência das vesículas extracelulares na dinâmica do sistema nervoso entérico, indicando maior lesão quando presentes, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a doença de Chagas.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, é uma infecção parasitária causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi*, e um problema de saúde pública na América Latina. Este protozoário possui como vetor o inseto conhecido popularmente como “barbeiro”. As principais formas de transmissão são: a penetração a partir da lesão

na pele ocasionada pela picada do inseto e por via oral, com a ingestão de alimentos contaminados pelo parasito, via transfusional e congênita (Pérez-Molina; Molina, 2018). Sabe-se que, em infecções crônicas por *T. cruzi*, o trato gastrointestinal apresenta alterações de colágeno no esôfago e no cólon, que causam aumento no seu tamanho e diâmetro. Além disso, também foram observados alterações no Sistema Nervoso Entérico. Contudo, pouco se sabe a respeito das alterações da infecção por este parasito nos outros segmentos intestinais, como no intestino delgado, que é um órgão importante para a manutenção da homeostase do organismo. O intestino delgado é dividido em duodeno, jejuno e íleo. Sua mucosa apresenta vilosidades e microvilosidades que ampliam a superfície de contato, além das criptas intestinais. Abaixo da mucosa, encontram-se os plexos submucoso e mientérico, componentes do sistema nervoso entérico, fundamentais para a regulação da motilidade (Junqueira; Carneiro, 2017). Estes plexos fazem parte do sistema nervoso entérico, que está distribuído por todo o intestino, sendo constituído por uma rede conectada de neurônios que podem estar reunidos em gânglios que se organizam em plexos, que contém neurônios, seus axônios e células da glia entérica. Os neurônios pertencentes ao plexo mientérico, atuam na regulação do relaxamento e da contração intestinal. Neurônios chamados de nitrérgicos, atuam no relaxamento da musculatura lisa e na vasodilatação (Furness, 2012). Tendo em vista que o parasito é capaz de secretar vesículas extracelulares e que estas desempenham um papel importante na fisiopatologia da doença de Chagas, podem também estar envolvidas na migração do parasito para determinados tecidos além de promover a sobrevivência e virulência do parasito (Rossi; Gavinho; Ramirez, 2019). Sendo assim, torna-se importante avaliar as alterações intestinais em nível de intestino delgado, que ocorrem na infecção pelo parasito e a influência das vesículas extracelulares nestas alterações. Assim, podendo fornecer insights valiosos para o desenvolvimento de novos tratamentos e de manejo da doença de Chagas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEAU/Uem) sob o parecer de nº58644311022. Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram realizados previamente ao início do projeto. Foram utilizados 30 camundongos da linhagem Balb/c com 60 dias de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Foram distribuídos em 6 grupos de forma aleatória, sendo um desses grupos o grupo controle não infectado e 5 grupos infectados, inoculados com cepa CL Brener de *T. cruzi* e/ou vesículas extracelulares provenientes de diferentes isolados in vitro a partir da interação de duas cepas do parasito (CL Brener e Dm28c) e duas linhagens celulares, sendo elas: Caco-2 (células epiteliais intestinais) e C2C12 (mioblastos). Para infecção, os animais foram anestesiados, e então inoculados, por via intravenosa, tripomastigotas da cepa CL Brener e as vesículas extracelulares. Os animais foram mantidos 28 dias após infecção em biotério, em condições ideais. Após esse período, os animais foram eutanasiados e então foi realizada a coleta do jejuno, que foi lavado com PBS e

preenchido com paraformaldeído. Posteriormente foi realizada a abertura do órgão e lavado com PBS para armazenamento. Então, foi dado início a metodologia proposta do projeto. Foi realizada a microdissecção do jejuno com pinça e estereomicroscópio. Os preparados foram lavados com PBS + triton 0,3% por 5 minutos e incubados em solução bloqueio por 2 horas. Em seguida foram incubados por 48 horas em solução contendo o anticorpo primário anti-PGP, (1:200) e anti-nNos (1:200) para marcação da população neuronal total e da subpopulação nitrérgica. A seguir, os preparados foram lavados e incubados com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (1:200). Por fim, as amostras foram lavadas e foi realizada a montagem das lâminas com glicerol tamponado. A partir dessas lâminas, foram capturadas 32 imagens do jejuno em microscópio de fluorescência na objetiva de 20x, para a realização da contagem dos neurônios presentes no plexo mientérico no software Image-Pro Plus. A seguir, foi avaliada a proporção de neurônios nitrérgicos/população total neuronal em mm² intestinais. Para análises estatísticas, foi realizada a avaliação da distribuição de dados, pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram apresentados pela média $\pm$ desvio padrão e comparados entre os grupos pelo teste ANOVA seguido de Tukey, foi considerado um $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que entre os grupos infectados com vesículas diferentes não houve diferença significativa, mas quando comparamos com o grupo infectado é perceptível uma redução de neurônios nos grupos que receberam as VEs (Figura 1). É possível observar uma diferença entre o grupo controle e o grupo infectado, onde o grupo infectado apresenta maior número de neurônios, tanto totais quanto nitrérgicos, o que pode refletir uma resposta adaptativa inicial ou um mecanismo compensatório frente à infecção (Chuenkova, MV, 2010), já citado em outros estudos. Quando comparamos o grupo controle com os demais grupos infectados, mas que receberam as vesículas, não observamos significância. Outros pesquisadores afirmam que a presença de vesículas extracelulares resultam em uma reação inflamatória intensa, pois são capazes de induzir a produção de citocinas (Chowdhury et al., 2017), justificando a gravidade da lesão neuronal.

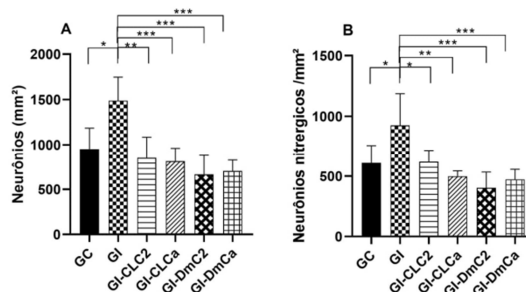


Figura 1 – Análise quantitativa de neurônios imunomarcados com anti-PGP 9.5 e anti-nNOS no cólon de camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* que receberam EVs. GC: grupo controle; GI: grupo infectado; CL: cultura de CL Brener; Dm: cultura em Dm28c; C2: células C2C12;

Ca: células Caco-2. A) Total de neurônios no plexo mioentérico, B) Total de neurônios nitrérgicos. Dados apresentados como média $\pm$ DP (n = 5) (* p < 0,05, **p < 0,01, ANOVA seguido teste Tukey).

CONCLUSÕES

Os resultados confirmam a interferência das vesículas extracelulares na dinâmica da infecção por *T. cruzi*, mostrando que seu papel aumenta a virulência do parasito. Assim, ressalta-se a importância da continuidade de estudos nesse assunto, visando desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de manejo da doença de Chagas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora pelo apoio técnico e científico durante o desenvolvimento deste projeto. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa que possibilitou a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

CHOWDHURY, I. H. et al. Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Macrophages in Response to Circulatory Microparticles Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease. *Journal of Innate Immunity*, v. 9, n. 2, p. 203, 1 fev. 2017.

CHUENKOVA, M. V.; PEREIRAPERRIN, M. *Trypanosoma cruzi*-derived neurotrophic factor: role in neural repair and neuroprotection. *Journal of Neuroparasitology*, v. 1, p. 55-60, 2010. DOI: 10.4303/jnp/N100507.

FURNESS J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, v. 9, p. 286–94, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. *Lancet* (London, England), v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 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.