AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO CÓLON DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *TRYPANOSSOMA CRUZI* ASSOCIADA A VESÍCULAS EXTRACELULARES

Julia Canezin Siscate (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Gessilda Alcantara Nogueira de Melo (Coorientador), Maria Gabriela Lima Zussa, Amanda Gubert Alves dos Santos, Débora de Mello Gonçales Sant'Ana (Orientador). E-mail: dmgsana@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Parasitologia, Protozoologia de parasitos/Protozoologia Parasitária Humana

Palavras-chave: Doença de Chagas. Vesículas extracelulares. Linfócitos intraepiteliais.

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, pode comprometer o trato gastrointestinal e provocar alterações inflamatórias no cólon. Durante a interação parasito-hospedeiro, vesículas extracelulares (VEs) podem atuar na modulação da resposta imune, na infectividade e na virulência do parasito, além de influenciarem a comunicação celular. Este estudo avaliou se a administração de VEs têm efeito sobre o número de linfócitos intraepiteliais do cólon de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*. Foram utilizados 30 camundongos machos, distribuídos em 6 grupos: um controle não infectado e 5 grupos infectados, com ou sem VEs obtidas da interação dos clones CL Brener ou Dm28c com células C2C12 ou Caco-2. Após 30 dias, cortes histológicos do cólon corados por hematoxilina e eosina foram analisados, com quantificação dos linfócitos intraepiteliais (LIEs) e cálculo de sua proporção para cada 100 células epiteliais. Em comparação ao controle, observou-se aumento de 74% no grupo infectado sem VEs, 50% no CLC2, 75% no CLCa, 56% no DmC2 e 49% no DmCa. Os resultados demonstraram aumento dos LIEs em todos os grupos infectados em relação ao controle, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos infectados, indicando que a infecção por *T. cruzi* foi o principal fator associado ao recrutamento dessas células. Conclui-se que, embora as VEs tenham um potencial modulador durante a interação parasito-hospedeiro, nas condições avaliadas sua administração não alterou o recrutamento de LIEs, indicando que esse aumento esteve principalmente associado à infecção por *T. cruzi*.

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, uma infecção parasitária crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi.* Considerada uma doença tropical negligenciada, pode provocar

complicações graves e irreversíveis nos sistemas circulatório, digestório e nervoso (Pan American Health Organization, 2024).
Na fase crônica, a doença pode causar cardiomegalia, megaesôfago e megacólon. O trato gastrointestinal é um importante local de permanência do parasito, podendo apresentar alterações no colágeno, ninhos de amastigotas, infiltrados inflamatórios e comprometimento do Sistema Nervoso Entérico (Khan et al., 2021).
Durante a infecção, há a liberação de vesículas extracelulares tanto pelas células hospedeiras quanto pelo parasito, que possuem componentes de ambas as células, capazes de modular a resposta imunológica e favorecer a sobrevivência, a virulência e a disseminação do parasito. Essas vesículas também podem modificar a expressão gênica das células hospedeiras, estimular a produção de citocinas e influenciar a infectividade de diferentes cepas (Ribeiro et al., 2018).
O cólon possui diferentes tipos celulares, entre eles os LIEs, células imunológicas localizadas entre as células do epitélio intestinal. Esses linfócitos participam da vigilância imunológica, do controle de patógenos e da manutenção da estabilidade tecidual. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar se a administração de VEs exerce efeito sobre a infecção por *T. cruzi,* por meio da análise quantitativa dos LIEs.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM), sob protocolo nº 5864311022.
Foram utilizados 30 camundongos machos BALB/c, com 60 dias de idade e peso entre 25 e 30 g, distribuídos em 6 grupos experimentais. Cinco grupos foram infectados, por via intravenosa, com 1 × 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* do clone CL Brener, associados ou não a 5 µg de vesículas extracelulares (VEs).
As VEs foram previamente isoladas *in vitro* por centrifugação diferencial, a partir da interação dos clones CL Brener ou Dm28c de *T. cruzi* com células C2C12, de origem mioblástica, ou Caco-2, de epitélio intestinal. O grupo controle (CG) não infectado recebeu apenas solução salina estéril (PBS); o grupo IG recebeu 1x10^5 tripomastigotas em PBS; além da infecção, os grupos CLC2, CLCa, DmC2, DmCa receberam as VEs. A infecção foi previamente comprovada por microscopia. Após a inoculação, os animais foram mantidos por 30 dias em biotério, sob temperatura controlada de 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, amostras do cólon foram processadas histologicamente e submetidas à microtomia para obtenção de cortes transversais semisseriados de 5 µm, posteriormente corados com hematoxilina e eosina. A quantificação dos LIEs foi realizada em quatro cortes histológicos, divididos em quatro quadrantes, em que 2560 células epiteliais e os LIEs presentes entre elas foram quantificados. Para a análise estatística, foi calculado a proporção de LIEs para 100 células epiteliais.
A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, seguido de pós teste de Tukey. Em todas as análises, os dados foram apresentados com média simples e desvio padrão, foi considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, apresentados na Figura 1, demonstraram aumento no recrutamento de linfócitos para o epitélio em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle (CG). Foram observados aumentos de 74% no grupo IG, 50% no CLC2, 75% no CLCa, 56% no DmC2 e 49% no DmCa, com maior recrutamento observado no grupo CLCa.

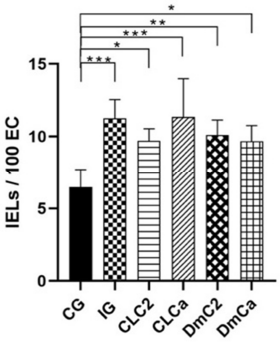


Figura 1 – Análise estatística dos LIEs no cólon de camundongos Balb/c.

A presente pesquisa demonstrou aumento da proporção de LIEs no cólon de todos os grupos infectados por *T. cruzi* em comparação ao grupo controle, indicando uma resposta imunológica local à infecção. Esse achado está de acordo com estudos que demonstraram intensa resposta inflamatória e recrutamento de linfócitos T CD4+ e CD8+ no cólon de animais infectados, reforçando a participação ativa do epitélio intestinal na resposta contra o parasito (Espinoza et al., 2011). Como os LIEs atuam na vigilância imunológica da mucosa intestinal, seu aumento pode estar relacionado à tentativa do hospedeiro de controlar a presença e a replicação do *T. cruzi* no tecido, embora apenas sua quantificação não permita determinar a eficiência dessa resposta (Ward et al., 2022).

Embora tenham sido observadas variações percentuais na proporção de LIEs entre os grupos infectados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre eles. Todos os grupos infectados apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle, independentemente da presença ou da origem das vesículas extracelulares. Estudos demonstraram que VEs derivadas de macrófagos infectados por *T. cruzi*, incluindo o clone CL Brener, podem modular tanto o perfil inflamatório quanto o comportamento funcional de células imunes, de maneira dependente da cepa do parasito (Mesías et al., 2025). Apesar das VEs apresentem potencial para modular mecanismos associados à resposta inflamatória e ao recrutamento celular, nas condições avaliadas neste estudo esse efeito não resultou em alteração significativa na quantidade de LIEs, indicando que a infecção por *T. cruzi* foi o principal fator associado ao aumento dessas células no epitélio intestinal.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a administração de VEs não modificou o recrutamento de LIEs para o cólon de camundongos BALB/c infectados por *T. cruzi*, independentemente do clone de origem das vesículas (CL Brener ou Dm28c) ou da célula hospedeira utilizada em sua obtenção (C2C12 ou Caco-2). Considerando que a quantificação de LIEs corresponde a uma análise morfológica e não discrimina subpopulações dessas células nem estado de ativação, os resultados obtidos não descartam possíveis efeitos imunomoduladores das VEs em nível funcional. Dessa forma, estudos complementares são necessários para esclarecer a participação das VEs na resposta imune local da Doença de Chagas digestiva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desse projeto, a minha orientadora Profa. Dra. Débora de Mello Gonçales Sant'Ana e as professoras Dra. Gessilda Melo, Dra. Amanda Gubert e Ma. Maria Gabriela Zussa, que me auxiliaram na realização desse projeto.

REFERÊNCIAS

ESPINOZA, Bertha et al. Gastrointestinal infection with Mexican TcI *Trypanosoma cruzi* strains: different degrees of colonization and diverse immune responses. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1357–1370, 2011. DOI: 10.7150/ijbs.7.1357. Acesso em: 10 ago. 2026.

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. Acesso em: 7 ago. 2026.

MESÍAS, A. C. et al. Strain-Dependent Immune Signaling by Small Extracellular Vesicles Derived From *Trypanosoma cruzi*-Infected Macrophages. **Traffic**, v. 26, e70017, 2025. DOI: 10.1111/tra.70017. Acesso em: 7 ago. 2026.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. OPAS: 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas. Disponível em: https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas. Acesso em: 7 ago. 2026.

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. Acesso em: 8 ago. 2026.

WARD, Alexander I.; LEWIS, Michael D.; TAYLOR, Martin C.; KELLY, John M. Incomplete recruitment of protective T cells is associated with *Trypanosoma cruzi*

persistence in the mouse colon. **Infection and Immunity**, v. 90, n. 2, e00382-21, 2022. DOI: 10.1128/IAI.00382-21. Acesso em: 10 ago. 2026.