

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

**EFEITOS PROTETIVOS DA *THERACURMIN* FRENTE ÀS ALTERAÇÕES
TESTICULARES INDUZIDAS PELA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Trypanosoma cruzi***

Breno Luiz Pimenta dos Santos

**Belo Horizonte
2022**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

EFEITOS PROTETIVOS DA *THERACURMIN* FRENTE ÀS ALTERAÇÕES
TESTICULARES INDUZIDAS PELA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
Trypanosoma cruzi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre junto ao referido Programa.

Orientador: Prof. André Talvani

Coorientadora: Dra. Tatiana Prata Menezes

Linha de pesquisa: Doença de Chagas

Belo Horizonte

2022

Santos, Breno Luiz Pimenta dos.

SA237e Efeitos protetivos da Theracurmin frente às alterações testiculares induzidas pela infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* [recurso eletrônico]. / Breno Luiz Pimenta dos Santos. - - Belo Horizonte: 2022.

60f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): André Talvani Pedrosa da Silva.

Coorientador (a): Tatiana Prata Menezes.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Curcuma. 3. Inflamação. 4. Orquite. 5. Células Intersticiais do Testículo. 6. Dissertação Acadêmica. I. Silva, André Talvani Pedrosa da. II. Menezes, Tatiana Prata. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 705

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às **09:00** horas do dia 29 de julho de 2022, por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET (meet.google.com/vmz-vbzu-qfr), realizou-se a sessão pública para a 405ª defesa de dissertação de **BRENO LUIZ PIMENTA DOS SANTOS**, número de registro 2020714463, graduado no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **ANDRÉ TALVANI**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROFA. SARAH ALVES AUHAREK (UFVJM)**, **PROFA. GRASIELE DE SOUSA VIEIRA TAVARES (UFMG)**, **PROFA. TATIANA PRATA MENEZES – COORIENTADORA (UFOP)**, **PROF. ANDRÉ TALVANI PEDROSA DA SILVA - ORIENTADOR (UFOP)**. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: **"Efeitos protetivos da Theracurmin frente às alterações testiculares induzidas pela infecção experimental por Trypanosoma cruzi"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Sarah Alves Auharek, Usuária Externa**, em 29/07/2022, às 11:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Talvani Pedrosa da Silva, Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grasiele de Sousa Vieira Tavares, Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 13:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiana Prata Menezes, Usuária Externa**, em 29/07/2022, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1615690** e o código CRC **C8F56DD9**.

Dedico esse trabalho à minha filha Aurora e à
minha avó Neise (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todas as bênçãos durante esse difícil período vivido em todo mundo e pela oportunidade de adquirir conhecimento nos últimos dois anos.

Agradeço também à minha família, principalmente a meus pais, André e Regina, meu padrasto Cid, minha madrinha Adriana, meus irmãos Felipe, João Vitor, Ana Carolina e Enzo Luiz, minhas avós Magdalena e Alzira e todos os tios e tias que sempre me apoiaram, torceram e comemoraram cada conquista minha nos últimos anos. Agradeço também aos meus falecidos avôs e avó, Raimundo, Levy e Neise. Sempre quando em conflito, eu buscava sabedoria nas palavras de vocês. Essa conquista minha, na verdade, também é de vocês.

Agradeço à minha linda família que formei desde o começo dessa minha caminhada, Juliana e Aurora. Vocês são o principal motivo por toda minha felicidade diária, sempre que estou com vocês sinto que tudo vai dar certo ao final. Amo vocês! Também agradeço toda a família da Juliana, principalmente meu sogro, sogra e cunhadas pela ajuda e cuidado com minha filha.

Agradeço a meu professor e orientador André Talvani por toda a ajuda e pelos ensinamentos durante o processo, além de acreditar em mim e em meu potencial. Já lhe disse uma vez, mas agora deixo escrito: você é um orientador fora da curva.

Agradeço também imensamente à minha coorientadora Tatiana que, com certeza, leu essa dissertação tanto quanto eu. Sempre procurei agradecer por tudo que você fez, obrigado pelos ensinamentos, pela paciência e pela ajuda durante esses dois anos. Sem você todo esse trabalho não existiria. Muito obrigado.

Agradeço a todos os meus colegas do LABIIN por toda a ajuda durante esses últimos anos, especialmente a Vitória e Laís pelo companheirismo e amizade.

Agradeço a todos os meus amigos, principalmente ao grupo “Irmandade”, aos amigos da Biologia 15.2/UFOP, aos amigos de Belo Horizonte/MG e aos amigos da república K-zona, Ouro Preto/MG. Obrigado pelo apoio, pelas descontrações, pelas cervejas geladas e pelas conversas fiadas.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que auxiliaram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho e à UFMG pelo ensino gratuito e de qualidade e às agências financiadoras: CNPq, CAPES e FAPEMIG.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Essa dissertação de mestrado tem como objetivo avaliar a infecção do protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, na região testicular de camundongos tratados diariamente com doses de curcumina altamente biodisponível (CurcuminRich®, Natural Factors, Canadá). O estudo se encontra dentro da linha de pesquisa sobre infecções experimentais por *T. cruzi* que é desenvolvida pelo Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LABIIN) e foi escolhido pela necessidade de maior entendimento da infecção experimental desse parasito na região testicular.

Outro fator importante para a escolha do tema foi a junção do principal tema estudado pelo grupo do Prof. Talvani, a infecção por *T. cruzi*, e a expertise da Dra. Tatiana Menezes com a infecção testicular e com as técnicas utilizadas nesse trabalho. Os resultados desse estudo nos possibilitaram a escrita do 1º artigo científico acerca deste tema. Os documentos serão apresentados nesta dissertação de mestrado.

A apresentação deste documento foi realizada de acordo com a Resolução nº02/2013, de 18 de setembro de 2013; que regulamenta o formato dos trabalhos finais de qualificação, estabelecendo condições para a marcação das defesas de teses e de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada causada pela infecção do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e se mantém como uma das significantes causas de morbidade e mortalidade na América Latina. Essa enfermidade é causada por uma intensa e persistente resposta inflamatória, caracterizada pela regulação positiva da expressão e da produção de marcadores inflamatórios que favorecem a ativação e recrutamento de diferentes células do sistema imune em diversos tecidos para a eliminação do parasito. Os tecidos musculares, cardíaco e esquelético, e tecidos do sistema gástrico são mais comumente estudados como regiões propícias ao tropismo do *T. cruzi*, mas este protozoário pode se estabelecer e ocasionar uma resposta inflamatória em outros sítios do hospedeiro, como o trato reprodutor masculino. A *Theracurmin* é um composto derivado da curcumina que possui propriedades anti-inflamatórias, tornando esse composto bioativo um potencial fator mitigante de respostas inflamatórias exacerbadas causadas pelo parasito. Nosso estudo focou na investigação da infecção testicular em camundongos Swiss infectados com 10^3 tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e tratados com *Theracurmin*. Os 28 animais foram agrupados em: não infectado, não infectado + *Theracurmin*, *T. cruzi* e *T. cruzi* + *Theracurmin*. Os camundongos foram tratados com 30mg/Kg de *Theracurmin* por 30 dias e a parasitemia foi realizada diariamente. No 30º dia após o início do tratamento, os animais foram eutanasiados e seus testículos retirados para análises histomorfométricas e imunológicas. Os animais do grupo *T. cruzi* + *Theracurmin* apresentaram uma diminuição na parasitemia e nos níveis de IL-15 e IL-6 quando comparados ao grupo *T. cruzi*. Além disso, o diâmetro e a área luminal aumentaram na presença do protozoário, resultando em uma diferente relação túbulo-epitélio entre o grupo não infectado e o grupo *T. cruzi*. O volume da área da túnica própria também aumentou em todos os animais infectados com o *T. cruzi*, mas a *Theracurmin* reduziu esse parâmetro no grupo *T. cruzi* + *Theracurmin* quando comparados ao grupo apenas infectado. Na área intertubular, as porcentagens de intertúbulo diminuíram significativamente panos animais infectados, quando comparados àqueles sem infecção, assim como reduziu a porcentagem de células de Leydig, de tecido conjuntivo e de macrófagos nesta região. Em conjunto, nossos dados apontam para alterações estruturais causadas por *T. cruzi* no sítio testicular e apontam para o uso diário da *Theracurmin* na dieta como um elemento de proteção testicular.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; *theracurmin*; inflamação; infecção testicular; célula de Leydig.

ABSTRACT

Chagas' disease is a tropical neglected illness caused by *Trypanosoma cruzi* and remains one of the most significant causes of morbidity and mortality in South and Central Americas. The disease is caused by a moderate to intense and persistent inflammatory response characterized by local upregulated expression and production of inflammatory mediators that favors the activation and recruitment of distinct cells of the immune system into different tissues to eliminate the parasites. Muscular tissue, cardiac and skeletal, and tissues of the gastric system are mostly common to be studied as a regular tissue tropism of the *T. cruzi*, but the protozoan can infect and cause an inflammatory response in several systems on its host, such as the reproductive system. *Theracurmin* is a curcumin's derived formulation of nanoparticles. Its anti-inflammatory properties make this bioactive compound a mitigating factor in pathological cases after an overwhelming inflammatory response. Our research focused on the testicular investigation in 28 mice infected by 10^3 trypomastigote forms of Colombian strain of *T. cruzi* and treated with *Theracurmin*. These animals were grouped as: uninfected, uninfected + *Theracurmin*, *T. cruzi*, and *T. cruzi* + *Theracurmin*. The mice were treated with 30 mg/Kg of *Theracurmin* during the period of 30 days and parasitemia was evaluated daily. At the 30th day post infection animals were euthanized, and its testicles were collected to morphological and immunological assays. The animals infected and treated with *Theracurmin* presented a reduction in the parasitemia and in the testicular levels of IL-15 and IL-6. The luminal diameter and area increased in the presence of the protozoan resulting in a different seminiferous tubules/epithelial relation between the uninfected and the *T. cruzi* group. The volume of the tunica propria are also higher in all infected animals, but *Theracurmin* decreased this parameter in the *T. cruzi* + *Theracurmin* group when compared to the *T. cruzi* group. In the intertubular area, the percentage of the intertubule was decreased in the infected animals, in comparison to those without the protozoan infection, such as the percentage and volume of Leydig cells, connective tissue, and macrophages. Furthermore, our data pointed to the daily use of *Theracurmin* in the diet as a protective element of the testicular area.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; *theracurmin*; inflammation; testicular infection; Leydig cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental da pesquisa.....	23
Figura 2. Linha temporal da pesquisa.....	24
Figura 3. Imagem do medicamento contendo o extrato de <i>Theracurmin</i> (curcumina altamente biodisponível) de raízes de <i>Curcuma longa</i> e sua bula.....	25
Figura 4. Histological images of testicles of Swiss mice infected with <i>T. cruzi</i> and treated with Theracurmin.....	36
Figura 5. Production of CCL2 (A), CXCL10 (B), IL-15 (C), and IL-6 (D) at testicles of Swiss mice infected with <i>T. cruzi</i> and treated with Theracurmin.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biometric and testicular parameters of mice infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> and treated with Theracurmin.....	35
Tabela 2. Parameters of the tubules seminiferous of Swiss mice infected with <i>T. cruzi</i> and treated with Theracurmin.....	37
Tabela 3. Stereological analysis of the tubules seminiferous of Swiss mice infected with <i>T. cruzi</i> and treated with Theracurmin.....	38
Tabela 4. Percentage and volume of the intertubular components in mice infected with <i>T. cruzi</i> and treated with Theracurmin.....	39
Tabela 5. Morphometric and stereological parameters of Leydig cells in mice infected with <i>T. cruzi</i> and treated with Theracurmin.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AW	Peso da albugínea
BSA	Albumina sérica bovina
BV	Vaso sanguíneo
CCA	Centro de ciência animal
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Tecido conjuntivo
CXCL10	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 10</i>
D	Diâmetro
E/EP	Epitélio
EH	Altura do epitélio
ELISA	Análise de imunoabsorção por ligação enzimática
EP/SE	Erro padrão
g	Grama
gp130	Glicoproteína 130
gt	Grama de testículo
h	Hora
IES/ESI	Índice epiteliossomático
IGS/GSI	Índice gonadossomático
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
ILS/LSI	Índice leydigossomático
In/IT	Intertúbulo
IPS/PSI	Índice parenquiossomático
ITS/TSI	Índice tubulossomático
Kg	Quilograma
L	Lúmen
LADOC	Laboratório de doença de Chagas
LC	Célula de Leydig
Lcit	Citoplasma de Leydig

LD	Diâmetro Luminal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr	Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
LN	Núcleo de Leydig
LS	Espaço Linfático
M/MAC	Macrófago
mg	Micrograma
mL	Mililitros
n	Número
NK	<i>Natural killer</i>
NLGT	Número de células de Leydig por grama de testículo
NLT	Número de células de Leydig por testículo
°C	Graus Celsius
PBS	Tampão fosfato salina
PC/CW	Peso corporal
PW	Peso do parênquima
R	Raio nuclear
t	Testículo
TD	Diâmetro Tubular
TER	Relação túbulo-epitélio
TLT	Comprimento total do túbulo
TP	Túnica própria
TS	Túbulo seminífero
TW	Peso testicular
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VC/CV	Volume citoplasmático
VL/LV	Volume de células de Leydig
VN/NV	Volume nuclear
Vol.	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i>
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão de Literatura	17
2.1. A doença de Chagas	17
2.2. Biologia testicular	18
2.3. Testículos e a inflamação	19
2.3.1. Imunoprivilégio	20
2.3.2. IL-6	21
2.3.3. IL-15	21
2.3.4. CCL2 e CXCL10	22
2.4. Infecção testicular por <i>T. cruzi</i>	22
2.5. A Curcumina e a inflamação	23
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivo específico	25
4. Metodologia	26
4.1. Animais em condições experimentais	26
4.2. Infecção e parasitemia	27
4.3. Terapia com curcumina altamente biodisponível	27
4.4. Processamento histológico	28
4.5. Histomorfometria testicular	29
4.5.1. Proporção volumétrica testicular e volume do intertúbulo e seus elementos ...	29
4.5.2. Parâmetros da célula de Leydig e Índice Leydigossomático	29
4.6. Avaliação dos marcadores inflamatórios teciduais	30
4.7. Análise estatística	31
5. Resultados e Discussão	32
6. Perspectivas	52

7. Referências.....	53
8. Anexos	58

1. Introdução

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, é uma enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Pertencente à família *Trypanosomatidae*, o *T. cruzi* apresenta três principais estágios evolutivos em seu ciclo biológico: amastigota, epimastigota e tripomastigota. As formas amastigotas, estruturas arredondadas e sem flagelos exteriorizados e desenvolvidos, são encontradas nos tecidos do hospedeiro vertebrado infectado (Alvarenga & Bronfen, 1997). As formas epimastigotas, flageladas e alongadas, são encontradas no sistema digestório do vetor invertebrado – triatomíneo (De Souza *et al.*, 1975; Pérez-Molina and Molina, 2018). Finalmente, a forma infectante do protozoário, os tripomastigotas são encontradas na circulação sanguínea (tripomastigota sanguíneo) e na ampola retal do triatomíneo (tripomastigota metacíclico) (Tyler and Engman, 2001). O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é complexo, envolvendo diferentes espécies de vetores triatomíneos e de hospedeiros mamíferos vertebrados (Rassi Jr *et al.*, 2010).

A infecção pelo *T. cruzi* gera uma intensa resposta inflamatória do sistema imune do hospedeiro, resultando em uma massiva liberação de marcadores pró-inflamatórios para tentar proteger a diversa gama de tecidos que as diferentes cepas deste protozoário conseguem infectar (Talvani & Teixeira, 2011). Após a infecção do protozoário, a doença pode ser dividida em três principais fases: (i) a fase aguda da infecção, caracterizada pela alta presença de parasitos na circulação sanguínea (Chagas, 1909); (ii) a fase crônica indeterminada, considerada uma fase transitória em que não há sintomas aparentes e de difícil diagnóstico (Hernández, 2016); (iii) a fase crônica sintomática, caracterizada pelo acometimento do coração e/ou do sistema digestivo (Pérez-Molina and Molina, 2018).

Durante a fase aguda, os medicamentos, principalmente os nitrocompostos, como o benzonidazol, são eficazes ao conter a evolução da doença e até mesmo curá-la – dependendo de características biológicas do protozoário, como virulência e infectividade – mas falham quando a mesma se cronifica (Cunha-Neto and Chevillard, 2014). Como o diagnóstico da doença é bastante difícil em sua fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados a descobrem na fase crônica, tornando difícil seu tratamento (Ministério da Saúde, 2021).

A infecção pelo protozoário *T. cruzi* é conhecida por ser transmitida pela forma vetorial, pelo repasto sanguíneo do inseto triatomíneo durante a sua picada (Rassi Jr *et al.*, 2010); oral, pelo consumo de alimentos infetados, principalmente o açaí (Coura, 2015); pela transfusão de sangue e/ou órgãos, o principal meio de transmissão em países não endêmicos (Coura and Dias, 2009); congênita (Messenger *et al.*, 2015) e por acidentes laboratoriais (Coura, 2015). Porém,

poucos estudos dão ênfase a uma rota de transmissão já confirmada experimentalmente, a transmissão sexual do *T. cruzi* (Almeida *et al.*, 2019). Além disso, pouco se conhece sobre a infecção crônica em pacientes infectados com o parasito quando a relacionamos com o sistema urogenital. Ainda, para se compreender o processo de transmissão sexual, é necessário estabelecer o papel do *T. cruzi* sobre o sítio testicular e sobre sua funcionalidade. Nem mesmo em modelos experimentais pode-se afirmar sobre o papel do sistema genital masculino como rota de escape do *T. cruzi*. O testículo, que é um órgão imunoprivilegiado, é um dos órgãos afetados pela capacidade de invasão do protozoário e, por isso, esse estudo norteará aspectos da infecção do *T. cruzi* em modelo experimental.

2. Revisão de Literatura

2.1. A doença de Chagas

No ano de 1909, o médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas identificou o *T. cruzi* e caracterizou a enfermidade causada por este parasito: a Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas (Chagas, 1909). Em 1921, Chagas e sua equipe já tinham identificado também o vetor, os reservatórios naturais e os aspectos morfológicos e clínicos da infecção aguda e crônica desta nova doença (Coura and Viñas, 2010). Considerada uma doença autóctone favorecida pela miséria e pelo subdesenvolvimento, a doença de Chagas foi negligenciada até os anos 40, quando a zoonose começou a ser reconhecida e controlada por iniciativas políticas no Brasil (Dias *et al.*, 2002).

A doença de Chagas ainda é considerada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) uma enfermidade negligenciada do ponto de vista farmacológico, mesmo com a existência de ações para seu controle em alguns países da América Latina (WHO, 2022). Na América do Norte, na Europa e em outras partes do mundo também há um crescente número de indivíduos soropositivos para o *T. cruzi* devido às migrações populacionais nas últimas décadas (Coura and Carlos Pinto Dias, 2009). Estima-se que hoje, cerca de 6 a 7 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo parasito em todo o mundo, sendo que sua maioria se localiza na América Latina (WHO, 2022).

Dessa forma, mesmo diante de todos os avanços no combate ao vetor e ao *T. cruzi*, permanece evidente a necessidade de novas medidas de controle para a doença de Chagas na América Latina, de conhecimento sobre seu agente etiológico e de novas propostas de manejo clínico para os indivíduos chagásicos. No entanto, os grandes determinantes da transmissão da

enfermidade ao homem ainda estão atrelados à questão socioeconômica da sociedade, às mudanças climáticas e ambientais, à manipulação do alimento (açaí artesanal) e à grande concentração de pessoas em áreas urbanas (Prata, 2001; Dias and Matos, 2013; WHO, 2022; Zapparoli et al., 2022).

A transmissão do *T. cruzi* para o homem pode ser dividida em dois cenários: (i) transmissão primária: sendo o principal modo de transmissão, compreendendo a transmissão vetorial, oral, congênita, transfusional e (ii) transmissão secundária, que compreende acidentes laboratoriais com sangue para testes e análises ou diretamente por acidentes com animais infectados (Coura, 2015). O boletim epidemiológico feito pelo Ministério da Saúde em 2015 mostrou que no período entre 2000 e 2013 a transmissão oral acidental (alimentos contendo macerado do triatomíneo) representava maior porcentagem nos indivíduos infectados superando a transmissão silvestre típica e prevalente no passado. A mudança nos números e porcentagens dos tipos de transmissão do agente etiológico da doença se dá devido às ações contra o vetor no passado, às mudanças ambientais, da condição socioeconômica da população e da sua instalação urbana em ambientes previamente rurais (Prata, 2001; Dias and Matos, 2013; WHO, 2022).

Além das clássicas vias de transmissão que se abordam nos livros e boletins parasitológicos, há também a via de transmissão sexual, ainda pouco estudada e elucidada pela comunidade científica. Martin e colaboradores (2015) mostraram que em estudo experimental utilizando camundongos infectados com a cepa Brasil do *T. cruzi*, a taxa de transmissão sexual (macho-fêmea) é baixa, mas existente, de 1,6% (1 fêmea infectada em 61 pares de camundongos). Já Almeida e colaboradores (2019) trabalharam com humanos e encontraram evidências de formas evolutivas do *T. cruzi* no ejaculado de homens em fase aguda da doença. Dessa forma, ainda há um vasto campo a ser estudado quando trabalhamos com a possibilidade da transmissão sexual da doença de Chagas.

2.2. Biologia testicular

Os testículos possuem dois papéis principais no funcionamento do trato reprodutor masculino: geração de gametas e a produção e liberação de hormônios sexuais. As estruturas responsáveis pela espermatogênese e pela esteroidogênese são, respectivamente, os túbulos seminíferos e as células de Leydig (Kretser *et al.*, 1998; Hess and Franca, 2008).

A espermatogênese se trata de um processo mitótico e meiótico complexo aonde as espermatogônias reduzem o número diploide ($2n$) de cromossomos para formas celulares

haploides (n) que serão responsáveis pela formação do gameta masculino (espermatozoide – n) (Jégou, 1991). Esse processo se inicia quando as espermatogônias do tipo A passam por mitose produzindo duas linhagens de células, sendo uma com espermatogônias do tipo A, que servirá para manter a linhagem de espermatogônias, e a segunda de espermatogônias do tipo B, no qual dará seguimento a produção de gametas. As espermatogônias do tipo B passará para o compartimento adluminal do túbulo seminífero onde passa a ser chamado de espermatócito primário ($2n$) e onde passará pela sua primeira divisão meiótica, se dividindo então em dois espermatócitos secundário (n) (Hedger and Meinhardt, 2003). Esses espermatócitos, por sua vez, passará pela segunda divisão meiótica da espermatogênese, formando as espermátides (n) (Kretser, 1994). Para a formação do gameta masculino ocorre a espermiogênese, que se trata de um processo de alongamento, remoção de grande parte do citoplasma da espermátide e especialização celular, resultando então no espermatozoide (n) (de Kretser *et al.*, 1998; Hess and Franca, 2008; Goossens *et al.*, 2017).

Todas essas etapas são altamente coordenadas por um conjunto de células e hormônios que atuam em cada região do epitélio seminífero (Hedger and Meinhardt, 2003). As células de Sertoli são células presentes no epitélio seminífero, envolvendo as células germinativas. Suas principais funções estão relacionadas no controle da maturação e no movimento dessas células pelo túbulo seminífero em direção ao lúmen (Hess and Franca, 2005). Cada túbulo seminífero é rodeado por células mioídes que, por possuírem proteínas contráteis, realizam a movimentação de todas as células, imóveis, participantes do processo da espermatogênese até o lúmen tubular (Carvalho *et al.*, 2009). Nesse lúmen, após a espermiogênese, os espermatozoides são liberados pela célula de Sertoli para percorrer todo o restante do trato reprodutor masculino (Russel, 1993). Além das células mioídes, a região intertubular possui células mesenquimais, células linfáticas, capilares sanguíneos e células do sistema imune (sendo a maioria desses macrófagos residentes) e células de Leydig (Hedger and Meinhardt, 2003). Esse último grupamento de células possuem um papel crucial na esteroidogênese durante a produção de testosterona, quando estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH) (Zhang *et al.*, 2022).

2.3. Testículos e a inflamação

A inflamação é um processo natural e muito importante para o organismo, que aumenta durante alguns estímulos, como a presença de anticorpos infecciosos, ação microbiana e até durante trauma físico (Decker, 1991). Através da regulação, positiva ou negativa, de diversas

moléculas como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, moléculas de adesão, células do sistema imune entre outras estruturas, o nosso corpo consegue “atacar” invasores e proteger os tecidos e órgãos que o compõe (Moshage, 1997). Assim, durante a infecção do corpo pelo *T. cruzi*, por exemplo, moléculas proinflamatórias estarão reguladas positivamente para agir e tomar medidas contra o patógeno no tecido afetado (Talvani and Teixeira, 2011).

Os processos de espermatogênese, espermiogênese e esteroidogênese, além do controle hormonal, precisam de mediadores para conectar e coordenar os principais tipos celulares durante todo o seu complexo processo. Para isso, moléculas são utilizadas para transmitir os importantes sinais de comunicação, como quimiocinas, moléculas de sinalização, fatores de crescimento e citocinas. Exemplos dessas moléculas seriam a interleucina-6 (IL-6), interleucina-15 (IL-15) e as quimiocinas CCL2 e CXCL10 (Syriou *et al.*, 2018).

No testículo, apesar de sua característica imunoprivilegiada, não é diferente. Além dos macrófagos residentes, mastócitos também podem ser visualizados próximos a capilares sanguíneos (Nistal and Paniagua, 1984; Gaytan *et al.*, 1989). Células T também possuem acesso à região testicular, que possui um sistema linfático eficiente ligado aos linfonodos (Hedger and Meinhardt, 2003). Porém, existem poucos estudos que mostram o perfil inflamatório dessa região, principalmente quando em contato com protozoários, a exemplo do *T. cruzi*.

2.3.1. Imunoprivilégio

O imunoprivilégio testicular foi descoberto há mais de 40 anos quando tecidos transplantados no testículo de ratos foram capazes de sobreviver por tempo indeterminado (Head *et al.*, 1983; Zhao *et al.*, 2014). O tecido testicular possui essa característica de tolerância para ambos os tipos de antígenos: próprios ou aloantígenos (Zhao *et al.*, 2014). Esse imunoprivilégio é mantido por um processo de imunossupressão local que visa proteger as células essenciais para a reprodução dos mamíferos, como as células haploides da linhagem espermatogênicas e as células acessórias a esse processo da ação do próprio sistema imune (Guazzone *et al.*, 2009; Arck *et al.*, 2014). Assim como em machos, o órgão reprodutor das fêmeas (útero) também possui essa característica, que impede o próprio sistema imune de atacar o feto (Arck *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014).

Porém, a região testicular também possui um sistema de defesa que pode sobrepor esse imunoprivilégio em caso de infecção local por algum antígeno patogênico. A presença de macrófagos residentes na região intertubular mostra que apesar do sistema imune estar

suprimido nesse tecido, ele ainda pode vir a ser efetivo contra microrganismos invasores (Arck *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014).

As citocinas, moléculas que controlam o sistema imune, participam ativamente de todo o processo inflamatório, atuando de forma pró-inflamatória, anti-inflamatória ou com caráter regulatório. O perfil inflamatório de uma infecção dependerá diretamente do tipo das citocinas e quimiocinas produzidas durante esse processo, afetando diversas células do sistema imune e as regulando positivamente ou não. No testículo, as citocinas têm um importante papel no desenvolvimento e regulação das suas funções, também conseguindo atuar como moduladores nas células de Leydig e Sertoli, participando da espermatogênese e esteroidogênese (Guazzone *et al.*, 2009).

2.3.2. IL-6

A IL-6 é uma citocina muito importante para o processo regulatório da inflamação e da resposta imune. Agindo pelo receptor gp130, a IL-6 estimula a ativação e proliferação linfocitária, atua na diferenciação de células B, induz respostas de fase aguda e estimula produção de moléculas anti-inflamatórias pelas células T (Kamimura *et al.*, 2004).

No testículo, a IL-6 é produzida por células de Leydig, macrófagos residentes e células de Sertoli, tanto no túbulo seminífero quanto na região intertubular (Boockfor *et al.*, 1994; Kern *et al.*, 1995; Cudicini *et al.*, 1997; Bryniarski *et al.*, 2005). No epitélio seminífero, a IL-6 possui funções como a estimulação da produção de transferrina pelas células de Sertoli (Boockfor *et al.*, 1994) e estudos sugerem que essa citocina possui um importante papel na regulação parácrina/autócrina durante a espermatogênese e na esteroidogênese, indicando um aumento durante a inflamação testicular (Hedger & Meinhardt, 2003; Rival *et al.*, 2006).

2.3.3. IL-15

A IL-15 é uma citocina produzida por diversos tecidos e células, principalmente por macrófagos, monócitos e células dendríticas. Ela é uma citocina que atua em diversas funções durante o controle da inflamação e da resposta imune, conectando a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (Patidar *et al.*, 2016). A IL-15 atua na defesa do corpo contra agentes patogênicos intracelulares, atua como um fator de crescimento e promove a sobrevivência de linfócitos T e B e de células NK, regulando fatores anti-apoptóticos. Essa citocina não só está

envolvida com a manutenção de linfócitos T, mas também na geração e reativação dessas células, sejam elas linfócitos jovens, efetores ou de memória (Patidar *et al.*, 2016).

A atuação da IL-15 nos testículos ainda não é muito aprofundada, mas em experimentos realizados em galos infectados com *Salmonella sp.*, durante períodos de maturação sexual, apresentaram expressão dos genes da IL-15 na região testicular. Essa expressão pode indicar um papel dessa molécula durante a resposta inata e/ou adaptativa e em seus mecanismos na região testicular (Anastasiadou & Michailidis, 2016).

2.3.4. CCL2 e CXCL10

As quimiocinas CCL2 e CXCL10 também são reconhecidas por seu importante papel no contexto imunológico, estimulando a migração de monócitos e células T para tecidos infectados por algum antígeno ou com algum tipo de dano inflamatório (Jiang *et al.*, 2017). Do mesmo jeito que a expressão de CCL2 tende a aumentar durante a inflamação, seu perfil inflamatório mostra que, após o período de infecção/lesão tecidual, a sua expressão tende a diminuir drasticamente (Arck *et al.*, 2014). Uma diversa gama de células podem produzir CCL2, como macrófagos, células mioides e células de Leydig, todas encontradas no tecido testicular (Guazzone *et al.*, 2009; Arck *et al.*, 2014).

Assim como a ligação entre IL-15 e o testículo, a quimiocina CCL2 também não é ligada à inflamação do tecido testicular, mas podemos prever um perfil inflamatório semelhante ao encontrado em outros tecidos (Arck *et al.*, 2014).

Já a molécula CXCL10 é uma quimiocina pleiotrópica que possui diversas funções, como induzir a apoptose celular, participa da regulação de proliferação celular e sinaliza locais de infecção e de lesão tecidual para leucócitos. A CXCL10 está envolvida em diversas infecções até mesmo nos testículos, produzida pelas células de Leydig e de Sertoli, como nos mostra o estudo feito por Jiang e colaboradores (2017) que mostra que sua expressão é maior durante orquite causada pelo Paramyxovírus e induz as células germinativas masculinas à apoptose pela ativação da proteína caspase-3 (Jiang *et al.*, 2017).

2.4. Infecção testicular por *T. cruzi*

A maior incidência da doença de Chagas encontra-se associada a populações de maior vulnerabilidade social e, seu maior índice de mortalidade associado a indivíduos do sexo masculino. Este fato, possivelmente, deve-se a características laborativas e/ou a fatores fisiológicos associados ao gênero masculino (Mady *et al.*, 1994; Lenzi *et al.*, 1998; Simões *et*

al., 2018). Neste contexto, por anos, as pesquisas ficaram centradas na transmissão do *T. cruzi* pela forma congênita e negligenciando, em parte, o papel do homem e de seus órgãos urinários e reprodutores no contexto tanto da manutenção do parasito quanto na transmissibilidade (Lenzi *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2019). Entretanto, demonstrou-se que, durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*, o parasito foi encontrado nos testículos e em seus componentes associados como o ducto deferente, epidídimo, vesículas seminais, próstata e pênis (Lenzi *et al.*, 1998). Além disso, um estudo de Almeida e colaboradores (2019), mostrou que essa infecção testicular levou à infecção e transmissão do protozoário de camundongos machos para a mãe e, respectiva prole. Do mesmo modo, já se descreveu que a transmissão sexual durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, em camundongos, apresenta-se reduzido, mas não nulo (Martin *et al.*, 2015). Assim, esses estudos nos levam a questionar como o protozoário seria capaz de atravessar o epitélio dos órgãos do sistema reprodutor masculino e induzir infecção no organismo feminino.

O *T. cruzi* possui preferência por células que expressam proteínas contráteis (Lenzi *et al.*, 1998). Um estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2009) mostrou que o protozoário é capaz de infectar a lâmina própria e as células mióides do túbulo seminífero do trato genital masculino. Essas células mióides possuem proteínas contráteis e a migração do *T. cruzi* para o líquido seminal poderia ocorrer pela contração destas células e consequente, pela sua ruptura, levando à liberação de parasitos para o túbulo seminífero (Carvalho *et al.*, 2009).

2.5. A Curcumina e a inflamação

A curcumina é um importante componente ativo amarelo-alaranjado da erva *Curcuma longa* ou mais conhecida como açafrão-da-terra. Esse componente possui diversas características farmacológicas e biológicas e ainda é considerada não tóxica, mesmo em altas doses, fato comprovado por Chiu e colaboradores em 2009 em experimentação com diferentes modelos animais. Esse composto possui diversas características atuantes no corpo humano, como: antioxidante, anti-inflamatório, antiapoptótico, antiangiogênico e anticarcinogênico (Souza *et al.*, 2021). Além disso, a curcumina regula genes envolvidos na homeostase cardíaca durante doenças cardiovasculares, prevenindo e revertendo a hipertrofia do miocárdio e a falha cardíaca (Nagajyothi *et al.*, 2013). Apesar disso, esse composto possui baixa biodisponibilidade devido ao seu tamanho sendo consequentemente pouco absorvido pelo organismo e diminuindo suas ações benéficas. Para resolver esse problema, foi criado um composto, diluente em água,

altamente biodisponível: a *Theracurmin*. Em estudos realizados em modelo humano, a absorção da *Theracurmin* foi 27 vezes maior do que a curcumina (Nakagawa *et al.*, 2020).

O *T. cruzi*, durante a sua fase de invasão celular, já é conhecido por utilizar o receptor de LDL do hospedeiro e uma das propriedades da curcumina é ter um efeito inibitório na transcrição desse mesmo receptor em modelo murino, conseguindo reduzir a taxa de invasão celular e modulando as consequências causadas pelo protozoário nos tecidos infectados (Nagajyothi *et al.*, 2013).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Verificar se a *Theracurmin* (curcumina altamente biodisponível) exerce atividade anti-inflamatória ou regulatória durante a infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos Swiss.

3.2. Objetivo específico

Para avaliar as ações do *T. cruzi* e da atividade moduladora do tratamento com a *Theracurmin* no sítio testicular de camundongos Swiss, analisaremos:

- O padrão de parasitemia em camundongos infectados e tratados com *Theracurmin*;
- Avaliar a presença do parasito nas células constituintes do ambiente testicular;
- Avaliar, por meio de análises morfométricas, se houve alterações nos testículos;
- Quantificar a produção de mediadores inflamatórios (IL-6, IL-15, CCL2 e CXCL10) nos macerados teciduais da região testicular.

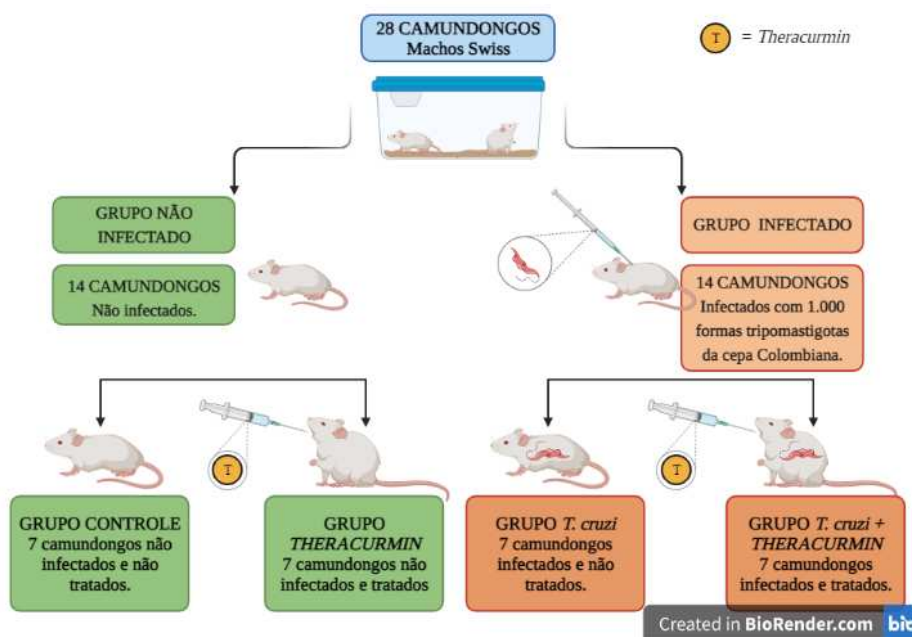
4. Metodologia

4.1. Animais em condições experimentais

Foram utilizados 28 camundongos machos Swiss, com idade de 7 a 9 semanas e peso corporal aproximada de 20 a 40g. Estes animais foram alocados no biotério central da UFOP, em salas climatizadas em condições controladas de luminosidade (12h claro-escuro) e temperatura ($22,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e em gaiolas de polipropileno. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP e receberam água e ração sem restrições ou limites.

Os animais foram agrupados em: não infectados ($n = 14$) e infectados ($n = 14$). Em seguida, os animais foram novamente agrupados entre aqueles animais que receberam a curcumina altamente biodisponível ($n = 7$) e os que não a receberam ($n = 7$), finalizando em quatro grupos: (i) não infectado ($n = 7$); (ii) não infectado + *Theracurmin* ($n = 7$); (iii) *T. cruzi* ($n = 7$); e (iv) *T. cruzi* + *Theracurmin* ($n = 7$) (Fig. 1).

Figura 1: Desenho experimental da pesquisa.



Fonte: Imagem criada pelo autor desse trabalho utilizando o site <https://biorender.com>.

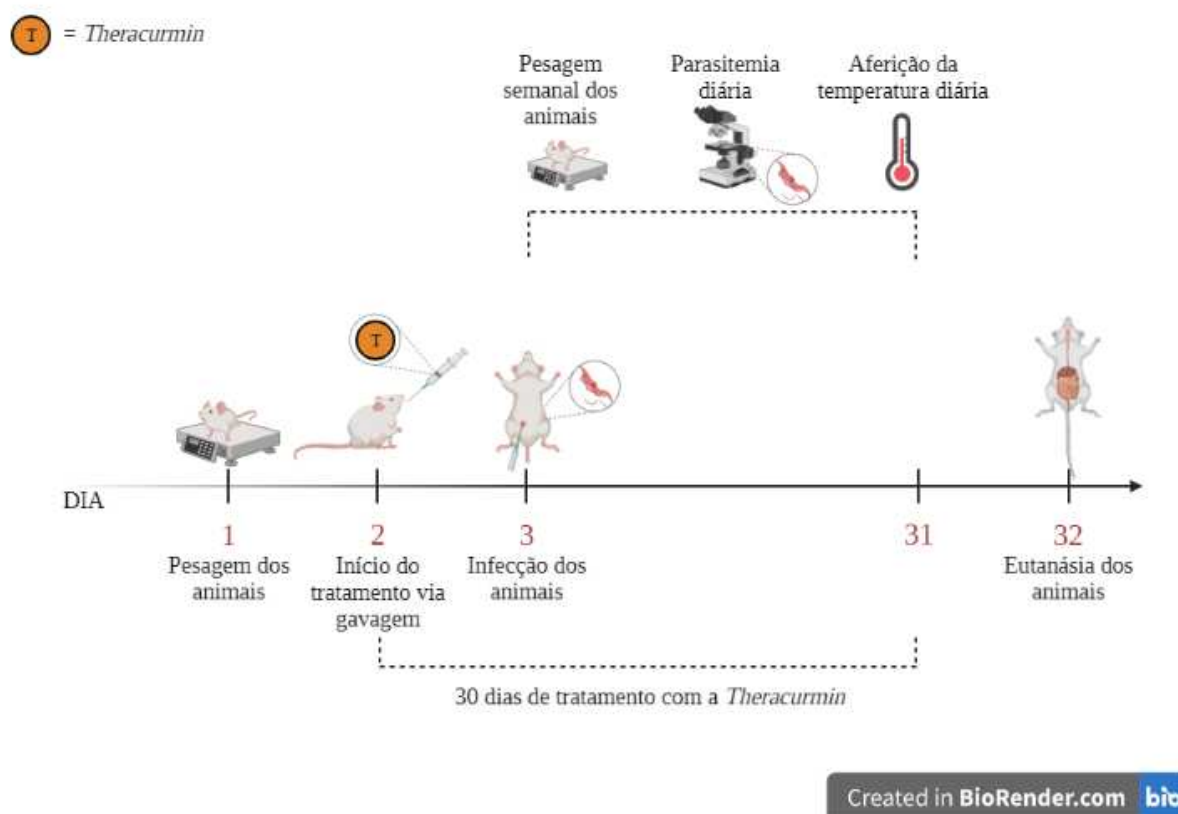
Todos os procedimentos propostos neste estudo estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo 4487110520 (**Anexo 1 e 2**).

4.2. Infecção e parasitemia

Os animais infectados com *T. cruzi* foram inoculados, intraperitonealmente (Hernández *et al.*, 2021), com 1.000 formas tripomastigotas da cepa Colombiana (Fig. 2). A cepa foi cedida pelo Laboratório de Doença de Chagas (LADOC) – Escola de Farmácia – UFOP.

Para confirmação da infecção nos animais e parasitemia, foi utilizada a técnica de Brener (1962), a qual consiste na quantificação dos parasitos circulantes com auxílio de um microscópio óptico (Fig. 2). A coleta de sangue foi realizada diariamente utilizando 5µl do sangue periférico obtido através de um pequeno corte da parte distal da cauda de cada animal.

Figura 2: Linha temporal da pesquisa.



Fonte: Imagem criada pelo autor desse trabalho utilizando o site <https://biorender.com>.

4.3. Terapia com curcumina altamente biodisponível

A partir do dia anterior à infecção, os animais foram submetidos a uma terapia diária, por gavagem, com 30 mg/kg (Sasaki *et al.*, 2011) de curcumina altamente biodisponível (*CurcuminRich®*, *Natural Factors*, Canadá) (Fig. 3) durante 30 dias (Fig. 2). Cada cápsula do produto possuía 30mg de *Theracurmin®* (*Theravalues*, *Tokyo*, *Japan*), além de outros ingredientes (Fig 3). O preparo da dose individual consistiu na diluição da *Theracurmin* em

solução de água destilada contendo 0,5% de carboximetilcelulose sódico. Cada animal recebeu 300µl dessa mistura, sendo que os grupos não tratados com curcumina altamente biodisponível receberam apenas o veículo da solução na mesma quantidade. Houve pesagem semanal de todos os animais para controle e readequação da dose de curcumina (Fig. 2).

Figura 3: Imagem do medicamento contendo o extrato de *Theracurmin* (curcumina altamente biodisponível) de raízes de *Curcuma longa* e sua bula.



Fonte: Imagem adaptada de www.iherb.com.

4.4. Processamento histológico

Após o término do tratamento, os animais foram pesados, eutanasiados e, por meio de incisão, os testículos foram removidos, lavados em PBS e pesados. Para determinar o peso do parênquima testicular a túnica albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular foi calculado o índice gonadossomático (IGS- %) e o peso relativo dos órgãos a partir da divisão do peso corporal e multiplicado por 100 (Amann, 1970).

Os tecidos foram imersos em formalina tamponada a 10% por no mínimo 24 horas. Posteriormente as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto) e em seguida foram blocados em resina histológica de metacrilato de glicol. Os cortes foram feitos em micrótomo rotativo em seções de 3 µm de espessura utilizando lâmina de vidro (*Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha*). Cortes histológicos foram coletados em semi-séries, respeitando-se o intervalo de no mínimo 40 µm entre os cortes, as quais posteriormente foram coradas com azul de toluidina com borato de sódio (1%). Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínula e Entellan® (*Merck, Alemanha*).

4.5. Histomorfometria testicular

Para as análises morfométricas foram utilizadas imagens digitais obtidas em fotomicroscópio de campo claro (*Leica DM5000B*, Alemanha) equipado com câmera digital (*Leica MC170HD*, Alemanha). Todas as imagens foram analisadas utilizando o software Image J® (*National Institute of Health, USA*).

4.5.1. Proporção volumétrica testicular e volume do intertúbulo e seus elementos

A proporção volumétrica de túbulo e intertúbulo foram estimadas a partir da contagem de 266 pontos em 10 campos aleatórios, totalizando 2.660 pontos para cada animal em imagens histológicas capturadas utilizando objetiva de 10x. O volume (ml) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado multiplicado pelo volume do parênquima testicular. Para obter as proporções volumétricas (%) dos componentes intertubulares foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas em objetiva de 40x da região do intertúbulo, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Os elementos quantificados foram: tecido conjuntivo, macrófagos, vasos sanguíneos, espaço linfático e células de Leydig (núcleo e citoplasma). O volume (ml) dos elementos intertubulares foi calculado a partir da porcentagem do elemento no testículo/100, multiplicada pelo peso do parênquima de 2 testículos. Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Costa *et al.*, 2011), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

4.5.2. Parâmetros da célula de Leydig e Índice Leydigossomático

Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal, escolhendo os que apresentavam contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Para se calcular os volumes (μm^3) nuclear (VN), citoplasmático (VC) e de cada célula de Leydig (VL) por testículo, foram utilizadas as seguintes fórmulas: $VN = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio nuclear; $VC = \% \text{ de citoplasma} \times VN / \% \text{ de núcleo}$; $VL = VN + VC$. Os números de células de Leydig por testículo (NLT) e por grama de testículo (NLGT) foram calculados de acordo com as fórmulas: $NLT = \text{volume que as células de Leydig ocupam por testículo} (\mu\text{m}^3) / \text{volume de uma célula de Leydig} (\mu\text{m}^3)$; $NLGT = \text{volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo} (\mu\text{m}^3) / \text{volume de uma célula de Leydig} (\mu\text{m}^3)$. Onde: Volume que a células de Leydig ocupa por testículo = proporção da célula de Leydig no testículo X peso do parênquima de um testículo /

100; Volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo = volume que a célula de Leydig ocupa por testículo / peso bruto de um testículo. Para calcular a relação nucleoplasmática (%) das células de Leydig dividiu-se o percentual ocupado pelo núcleo pelo percentual ocupado por citoplasma. Este percentual foi obtido a partir da contagem de 1000 pontos sobre núcleo e citoplasma. O índice Leydigossomático (ILS) foi calculado utilizando fórmula: $ILS = \text{volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos} / PC \times 100$, onde PC=peso corporal.

4.6. Avaliação dos marcadores inflamatórios teciduais

As concentrações de IL-6, IL-15 CCL2 e CXCL10 foram quantificadas no tecido testicular dos animais pelo método de “ELISA” (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando kits para detecção dos marcadores inflamatórios da fabricante Peprotech, NJ, EUA. Para a sensibilização das microplacas de 96 poços foram adicionados 100µl/poço dos anticorpos monoclonais contra a proteína a ser dosada, diluídos em PBS, sendo estas placas incubadas durante a noite em temperatura ambiente. Anticorpos não absorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-*Tween*. As placas foram bloqueadas com 300µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a 37°C. Em seguida as placas foram novamente lavadas. Após o bloqueio foram adicionados 25µl das amostras e 100µl/poço dos padrões para cada marcador. Após 2 horas de incubação, o processo de lavagem foi realizado novamente e foram adicionados 100µl/poço dos anticorpos de detecção em PBS com 1% de albumina bovina e incubadas 2 horas a temperatura ambiente, seguindo-se da lavagem. Depois, foram adicionados 100µl/poço de conjugado avidina-HRP em diluição de 1:2000 em PBS com 1% de albumina bovina e posterior incubação a temperatura ambiente durante 30 min. As placas foram novamente lavadas e, para revelação, 100µl/poço de 2,2#-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS – *Sigma Aldrich, Missouri, USA*) foram adicionados, seguido de incubação em temperatura ambiente em ausência de luz por tempo previamente determinado para cada mediador dosado. A densidade óptica foi determinada por um leitor de microplacas Biotek *ELx808* (California, USA). A quantificação dos mediadores inflamatórios presentes nas amostras será determinada utilizando a densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas e analisadas pelo software *SOFTmax PRO 4.0*.

4.7. Análise estatística

O *software GraphPad Prism* 8.0.1 foi utilizado para todas as análises. Para averiguar a distribuição dos dados foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste ANOVA One-way foi utilizado para comparar os grupos, de acordo a variável avaliada, e quando necessário utilizou-se o teste de Tukey para detecção de diferenças. Os dados de variação da massa corporal, massa corporal e massa relativa dos órgãos dos animais estão apresentados sobre a forma de média e erro padrão (EP). O nível de significância adotado para as análises foi de $p \leq 0,05$.

5. Resultados e Discussão

Os tópicos de Resultados e Discussão dessa dissertação serão apresentados sob a forma de artigo científico, que foi submetido para publicação no periódico *Journal of Reproductive Biology* na data de 16 de julho de 2022 (**Anexo 3**).

Protective effects of Theracurmin treatment during experimental infection of the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* at the testicular site

Breno Luiz Pimenta dos Santos^{1,5}, Tatiana Prata Menezes^{1,2*}, Vitória Louise Teixeira e Silva^{1,2,5}, Fernanda Carolina Ribeiro Dias^{6,7}, Bianca Alves Almeida Machado^{1,4}, Lais Ribeiro^{1,5}, Kelerson Mauro de Castro Pinto^{1,3}, Andre Talvani^{1,2,5*}

¹Laboratory of Immunobiology of Inflammation, Department of Biological Sciences, ²Health and Nutrition Post-Graduate Program, ³Laboratory of Physiology of Exercise, Physical Education School, ⁴School of Medicine, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil;

⁵Infectious Diseases and Tropical Medicine Post-Graduate Program, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

⁶Department of Structural Biology, Federal University of Triângulo Mineiro, Praça Manoel Terra, 330, Uberaba, MG, Brazil;

⁷Department of Veterinary, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil;

***Corresponding authors:**

Prof. André Talvani – talvani@ufop.edu.br

and

Dr. Tatiana Prata Menezes – tatiana.prata@yahoo.com.br

ABSTRACT

Chagas' disease is a tropical neglected illness caused by *Trypanosoma cruzi* and remains one of the most significant causes of morbidity and mortality in South and Central Americas. The disease is caused by a moderate to intense and persistent inflammatory response characterized by local upregulated expression and production of inflammatory mediators that favors the activation and recruitment of distinct cells of the immune system into different tissues to eliminate the parasites. Theracurmin is a curcumin's derived formulation of nanoparticles. Its anti-inflammatory properties make this bioactive compound a mitigating factor in pathological cases after an overwhelming inflammatory response. Our research focused on the testicular investigation in 28 mice infected by 10^3 trypomastigote forms of Colombian strain of *T. cruzi* and treated with Theracurmin. The mice were treated with 30 mg/Kg of Theracurmin during the period of 30 days. At the 30th day post infection animals were euthanized, and its testicles were collected to morphological and immunological assays. The animals infected and treated with Theracurmin presented a reduction in the testicular levels of IL-15 and IL-6. The volume of the tunica propria are also higher in all infected animals, but Theracurmin decreased this parameter in the treated animals. In the intertubular area, the percentage of some intertubular components was decreased in the infected animals such as the percentage and volume of Leydig cells, connective tissue, and macrophages. Furthermore, our data pointed to the daily use of Theracurmin in the diet as a protective element of the testicular area.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; inflammation; testicles; cytokines; Theracurmin.

Introduction

Chagas disease is caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects 6 to 7 million people around the world (WHO, 2022), being endemic from the south of Argentina and Chile though the north of Mexico (Pérez-Molina and Molina, 2018). This parasite has several routes of infection, and its main routes are oral and vectorial (during the repast of the triatomine insect while feeding), beyond another ways of transmission such as blood transfusion (mainly in non-endemic countries), laboratory accidents, congenital and sexual transmission, which is supported by experimental studies (Pérez-Molina and Molina, 2018; Almeida *et al.*, 2019; Zapparoli *et al.*, 2022).

In the rodents, *T. cruzi* has a different tissue tropism after its infection depending on factors such as the load and genetic background of the parasites and the genetic/immune response related to the mammalian host (Andrade *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2018). The *T. cruzi* tissue tropism is described as heart, skeletal muscle, and tissues from the gastric system (Esper *et al.*, 2015; Weaver *et al.*, 2019; Hossain *et al.*, 2020). However, this parasite infects a diverse range of tissues, including those from reproductive tract (Almeida *et al.*, 2019). In the reproductive tissue, *T. cruzi* infects cells and cause an inflammation responsible for damages on the reproductive condition and/or the ease of dissemination of the protozoan among infected individuals. Potential natural/chemical compounds have been investigated to control parasite and the immune response in different infected tissues (De Paula Costa *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2020).

Curcumin is a polyphenol compound of saffron and it has antioxidant, anti-inflammatory, antiangiogenic, anticarcinogenic and apoptosis regulative properties (Arbiser *et al.*, 1998; Aggarwal *et al.*, 2006; Kuttan *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2009; Kang and Chen., 2009; Nagajyothi *et al.*, 2013). Curcumin regulates different biological and molecular routes, modulating the synthesis of cytokines, chemokines, enzymes, genes, and transcription factors in distinct inflammatory conditions (Gupta *et al.*, 2012, 2013; Nakagawa *et al.*, 2020). The use of curcumin as a therapeutic compound in the experimental infection of *T. cruzi* in murine model demonstrated to be effective inhibiting the cellular invasion regulating the LDL receptors in those cells and decreasing the parasitic load in the heart and liver (Yuan *et al.*, 2008; Kang and Chen 2009; Nagajyothi *et al.*, 2013). Whereas curcumin has a low bioavailability, a new formulation was developed (Theracurmin) whose absorption was 27 higher than curcumin in humans (Nakagawa *et al.*, 2020).

So, this present study aims to investigate the parasitological and inflammatory patterns in the testicular site of mice infected by the Colombian strain of the *T. cruzi* under treatment with the new formulation of the Theracurmin.

Materials and methods

Ethical Approval

All the methodologies performed in this study were in accordance with the standards of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and previously approved by the Animal Research Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, under the protocol number 4487110520.

T. cruzi infection

For these experiments, we used the Colombian strains of *T. cruzi*, classified as *T. cruzi* I (Zingales, 2009). These strains were maintained by successive passages in Swiss mice at the Center of Animal Science, UFOP.

Animals, T. cruzi infection and study design

Swiss male mice aged 7-9 weeks weighing approximately 20-40 g were used in this study. Animals (n = 7) were grouped as (i) uninfected, (ii) uninfected + Theracurmin, (iii) *T. cruzi*, and (iv) *T. cruzi* + Theracurmin. Animals were infected by an intraperitoneal injection of the Colombian strain of the parasite (1000 trypomastigotes/ animal). Blood parasites were daily evaluated in infected mice according to Brener's method (Brener, 1962). On day 30 of infection, the animals were euthanized, their testicles were collected for the immune assay and histopathology analysis. The mice were housed and maintained at the Center of Animal Science at UFOP.

Theracurmin treatment

One day before the infection, animals were submitted with a daily therapy, via gavage, with 30 mg/kg (Sasaki *et al.*, 2011) of Theracurmin (CurcuminRich®, Natural Factors, Canada)

during 30 days. Each capsule of the product had 30 mg of Theracurmin® (Theravalues, Tokyo, Japan). The individual dose preparation consisted in Theracurmin's dilution in distilled water with 0.5% of carboxymethyl cellulose. Each animal received 300 µL of this mix and the non-treated groups received the solution vehicle at the same amount.

Testicle processing and histological analysis

Testicular samples of all animals were fixed in tamponed formalin for 24 h, dehydrated in ethanol, embedded in glycol methacrylate resin, and cut into 3 mm thick sections using glass knives (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Histological slides collected in a semi-series were obtained using one out of every 40 sections to avoid evaluating the same histological area. The sections were stained with toluidine blue.

Digital images obtain with the photomicroscope of light field (Leica DM5000B, Germany) equipped with a digital camera (Leica MC170HD, Germany) were used for morphometric analysis. All images were analyzed using the Image J® software (National Institute of Health, USA).

Parameters of the tubules seminiferous and of the intertubular area

The volumetric proportions (%) of the tubular and intertubular area were estimated with the count of 266 dots in 10 aleatory fields, totaling 2660 dots for each animal in histological images captured with the 10x objective. The volume (mL) of each testicular component were estimated considering the percentage obtained multiplied by the testicular parenchyma volume. The volumetric proportions (%) of the intertubular components were estimated with the count of 1000 dots projected in captures images of the intertubular area with the 40x objective in different histological slides of each animal. The quantified elements were connective tissue, macrophages, blood vessels, lymphatic space and Leydig cells (nucleus and cytoplasm). Their volume was calculated multiplying its obtained percentage with the parenchyma weight of both testicles.

Leydig cell parameters

The diameters of 30 Leydig cells nuclei were measured in each animal, choosing those with circular outline, perinuclear chromatin, and evident nucleoli. To calculate nuclear volume

(NV), cytoplasmic volume (CV) and each Leydig cell volume (LCV, the following formulas were used: $NV = \frac{4}{3} \pi R^3$ (R = nuclear radius); $CV = \% \text{ of cytoplasm} \times NV / \% \text{ of nucleus}$; $LCV = NV + CV$.

The calculation of the volume that Leydig cells occupy in the testis was performed from the proportion of Leydig cells in the testicular parenchyma $\times$ parenchyma weight of one testicle/100. The volume that the Leydig cells occupy per gram of testis was obtained using the gross weight of the testicles. The total number of Leydig cells in the testes was calculated from the volume that the Leydig cells occupy in the testes (μm^3)/volume of one Leydig cell (μm^3). To calculate the total number of Leydig cells per gram of testis the following formula was used: volume that the Leydig cell occupies per gram of testis (μm^3)/volume of one Leydig cell (μm^3). The Leydigosomatic Index (LSI) was calculated by the formula: $LSI = \text{total volume of Leydig cell in the testicular parenchyma} / BW \times 100$ (BW = body weight).

Immunoassay

Levels of CCL2, CXCL10, IL-6 and IL-15 were detected in the supernatant of the homogenized testicular tissues. For sample preparation, 30 mg of testicular tissues were macerated in 300 mL of phosphate buffered saline (PBS) and, after centrifugation at 13000 rpm, for 10 min at 4°C, the supernatant was collected. Inflammatory mediators were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a specific kit (Peprotech, NJ, USA) and were performed according to the manufacturer's information. The absorbance values were measured using the Biotek *ELx808* (California, USA) ELISA reader at 450 nm.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard error of means. Multiple groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer post-test. All analyses were performed using the Prism 8 software (GraphPad Software). Groups were considered statistically different at $p < 0.05$.

Results

Animals infected with *T. cruzi* and treated with Theracurmin showed a significant reduction in the parasitic load of the circulating blood at the final of the treatment (data not shown).

Biometric and testicular parameters obtained from uninfected and *T. cruzi*-infected animals under treatment with Theracurmin is shown in **Table 1**. There was no difference at the corporal weight of the mice, such as at the albuginea's weight and the parenchyma's weight between the groups. In contrast, the testicular weight, gonadosomatic index, and the parenchyosomatic index increased in uninfected animals under Theracurmin treatment when compared to those infected animals that received Theracurmin.

Table 1: Biometric and testicular parameters of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with Theracurmin.

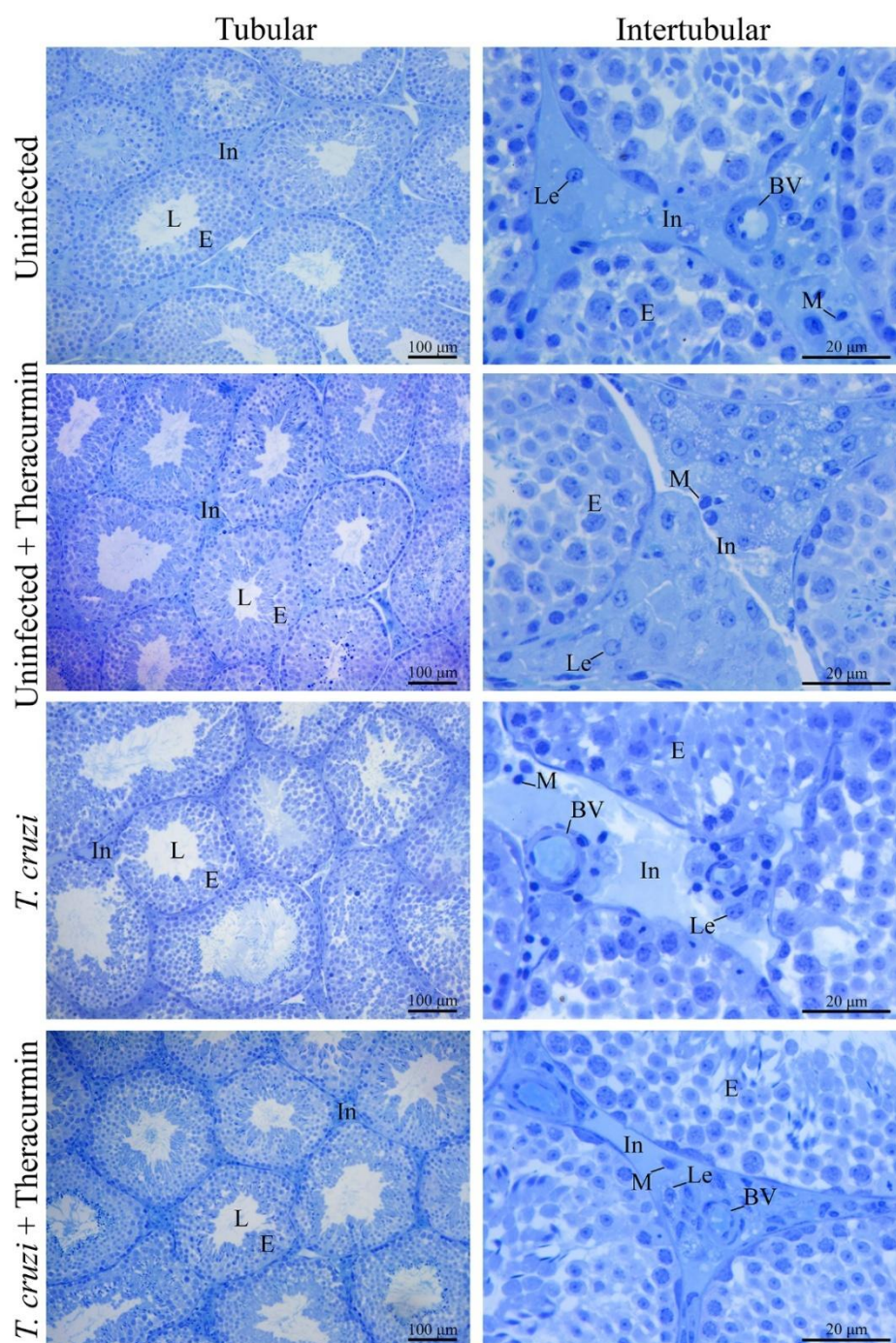
	Uninfected	Uninfected + Theracurmin	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Theracurmin
CW (g)	42,64±0,39	44,27±2,27	46,19±1,94	45,79±3,38
TW (g)	0,46±0,02 ^{ab}	0,55±0,04 ^b	0,53±0,03 ^{ab}	0,42±0,05 ^a
AW (g)	0,022±0,01	0,025±0,01	0,023±0,01	0,019±0,01
PW (g)	0,43±0,02	0,52±0,04	0,50±0,03	0,40±0,05
GSI (%)	1,07±0,06 ^{ab}	1,23±0,06 ^b	1,14±0,05 ^{ab}	0,91±0,10 ^a
PSI (%)	1,02±0,06 ^{ab}	1,18±0,06 ^b	1,09±0,0 ^{ab}	0,87±0,10 ^a

CW – Corporal weight; TW – Testicular weight; AW – Albuginea's weight; PW – Parenchyma's weight; GSI – Gonadosomatic index; PSI – Parenchyosomatic index. Data expressed as mean ± standard error (SE). Different letters between groups shows significant differences ($p \leq 0,05$).

In the histological analysis, there was no observed the presence of the amastigote nests in testicles, in the tubular, neither in the intertubular areas (**Figure 4**). In the morphometric analysis, there was an increase in the percentage of the tubules seminiferous and of the tunica propria in *T. cruzi*-infected animals when compared to those without infection, independent of the treatment with Theracurmin. However, in the infected groups under Theracurmin treatment, we observed a decrease in the percentage of the tunica propria when compared to the animals without the treatment. In addition, the volume of the tunica propria was higher in those infected animals while the tubulosomatic index raised in the uninfected animals under treatment.

Finally, the Theracurmin was able to decrease the epitheliumsomatic index in the animals infected by *T. cruzi* (Table 2).

Figure 4: Histological images of testicles of Swiss mice infected with *T. cruzi* and treated with Theracurmin. At the second day after the beginning of the treatment, mice were intraperitoneally infected with 1000 trypomastigote forms of Colombian strain of *T. cruzi*. After 30 dpi testicles were fixed, embedded in glycol methacrylate resin, and cut into 3 mm thick sections. The sections were stained with toluidine blue.



In – Intertubular area; L – Lumen; E – Epithelium; Lc – Leydig cell; BV – Blood vessel; M – Macrophage.

Table 2: Parameters of the tubules seminiferous of Swiss mice infected with *T. cruzi* and treated with Theracurmin.

	Uninfected	Uninfected + Theracurmin	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Theracurmin
TS (%)	87,17±0,85 ^a	89,40±0,85 ^{ab}	93,29±0,36 ^b	90,43±1,66 ^b
EP (%)	78,01±1,16	79,04±1,35	80,73±1,22	76,49±1,97
TP (%)	1,50±0,08 ^a	1,88±0,11 ^a	3,04±0,07 ^b	2,45±0,23 ^c
L (%)	7,66±0,67	8,47±0,77	9,52±1,35	11,48±1,74
Vol. TS (mL)	0,38±0,02	0,47±0,04	0,47±0,03	0,36±0,05
Vol. EP (mL)	0,34±0,02	0,41±0,04	0,41±0,03	0,31±0,04
Vol. TP (mL)	0,0066±0,00 ^a	0,0098±0,00 ^a	0,0152±0,00 ^b	0,0098±0,00 ^a
Vol. L (mL)	0,0328±0,00	0,0442±0,01	0,0478±0,01	0,0448±0,01
TSI (%)	0,89±0,05 ^{ab}	1,05±0,06 ^c	1,01±0,04 ^{ac}	0,79±0,10 ^b
ESI (%)	0,80±0,05 ^{ab}	0,93±0,06 ^a	0,88±0,04 ^a	0,67±0,09 ^b

TS – Tubules seminiferous; EP – Epithelium; TP – Tunica propria; L – Lumen; Vol. – volume; TSI – Tubulosomatic index; ESI – Epitheliumsomatic index. Data expressed as mean ± SE. Different letters between groups shows significant differences (p≤0,05).

The stereological analysis of the tubules seminiferous demonstrated an increase at the luminal diameter and luminal area in the animals infected by *T. cruzi*. Therefore, the tubules/epithelium ratio was higher in the presence of the parasite (**Table 3**).

Table 3 – Stereological analysis of the tubules seminiferous of Swiss mice infected with *T. cruzi* and treated with Theracurmin.

	Uninfected	Uninfected + Theracurmin	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Theracurmin
EH (µm)	96,86±5,59	93,06±3,42	89,45±4,29	83,65±8,30
TD (µm)	265,98±8,28	274,47±12,69	278,19±12,18	253,18±17,67
LD (µm)	72,25±5,04 ^a	88,35±6,56 ^{ab}	99,30±8,20 ^b	85,88±5,45 ^{ab}
TLT (m)	6,91±0,61	8,04±0,81	7,83±0,66	7,04±0,29
TLT/g	15,11±0,99	14,81±1,38	14,98±1,15	18,31±2,78
Tubular area	55765,93±3490,96	59676,77±5629,25	61248,95±5504,20	51367,71±6674,58
Luminal area	4183,18±550,10 ^a	6272,12±945,39 ^{ab}	7965,69±1206,71 ^b	5889,90±774,06 ^{ab}
Epithelial area	51582,76±3707,49	53404,65±4740,44	53283,26±4746,24	45477,81±6411,40
TER	1,08±0,01 ^a	1,12±0,01 ^{ab}	1,15±0,02 ^b	1,14±0,03 ^{ab}

EH – Epithelium height; TD – Tubular diameter; LD – Luminal diameter; TLT –Total length of the tubules seminiferous; TLT/g – Total length of the tubules seminiferous per grama of testicle; TER – Tubules/epithelium ratio. Data expressed as mean ± SE. Different letters between groups shows significant differences (p≤0,05).

At the intertubular area, its percentual reduced significantly in the presence of *T. cruzi* and *T. cruzi* + Theracurmin when compared to the non-infected animals, while the Leydig nucleus percentage reduced only at the infected animals in comparison those uninfected. The Leydig cytoplasm and de Leydig cell percentages were decreased in the presence of *T. cruzi*, while the percentage of connective tissue was decreased in the presence of *T. cruzi* plus treatment with Theracurmin. The macrophages percentage were also smaller in the presence of *T. cruzi* when compared to the uninfected and untreated group (**Table 4**).

The intertubular volume (mL) reduced in those animals infected by *T. cruzi*. These animals also had a smaller volume of Leydig nucleus and cytoplasm when compared to the non-infected animals. According to its percentage, the connective tissue volume was decreased in the presence of the parasite plus Theracurmin treatment (**Table 4**).

Table 4: Percentage and volume of the intertubular components in mice infected with *T. cruzi* and treated with Theracurmin.

	Uninfected	Uninfected + Theracurmin	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Theracurmin
IT (%)	12,83±0,85 ^a	10,60±0,85 ^{ab}	6,71±0,36 ^b	9,57±1,66 ^b
BV (%)	0,88±0,24	0,59±0,10	0,50±0,18	0,52±0,15
LS (%)	0,78±0,19	1,29±0,43	1,43±0,32	1,93±0,41
LN (%)	1,36±0,13 ^a	0,94±0,09 ^{ab}	0,66±0,06 ^b	1,08±0,19 ^{ab}
Lcit (%)	8,23±1,30 ^a	7,31±0,85 ^a	3,89±0,37 ^b	5,53±0,94 ^{ab}
LC (%)	9,58±1,41 ^a	8,26±0,91 ^a	4,54±0,41 ^b	6,61±1,12 ^{ab}
CT (%)	1,29±0,48 ^a	0,29±0,08 ^b	0,12±0,02 ^b	0,28±0,09 ^b
MAC (%)	0,31±0,09 ^a	0,18±0,05 ^{ab}	0,12±0,01 ^b	0,24±0,04 ^{ab}
IT (mL)	0,0558±0,01 ^{ac}	0,0543±0,01 ^c	0,0336±0,01 ^b	0,0359±0,01 ^{ab}
BV (mL)	0,0039±0,0012	0,0030±0,0004	0,0026±0,0010	0,0019±0,0005
LS (mL)	0,0035±0,0009	0,0071±0,0026	0,0073±0,0018	0,0072±0,0014
LN (mL)	0,0058±0,0,0005 ^a	0,0048±0,0004 ^{ab}	0,0033±0,0004 ^b	0,0040±0,0006 ^b
Lcit (mL)	0,0354±0,0062 ^a	0,0370±0,0024 ^a	0,0192±0,0014 ^b	0,0209±0,0030 ^b
LC (mL)	0,0412±0,0066	0,0418±0,0025	0,0225±0,0017	0,0249±0,0035
CT (mL)	0,0058±0,0024 ^a	0,0014±0,0003 ^b	0,0006±0,0001 ^b	0,0010±0,0002 ^b
MAC (mL)	0,0014±0,0005	0,0009±0,0003	0,0006±0,0001	0,0009±0,0001

IT – Intertubule; BV – Blood vessel; LS – Lymphatic space; LN –Leydig nucleus; Lcit – Leydig cytoplasm; LC – Leydig cell; CT – connective tissue; MAC – Macrophage. Data expressed as mean ± SE. Different letters between groups shows significant differences (p≤0,05).

According to the morphometric and stereological parameters of the Leydig cells, its cytoplasmatic and cellular volumes were reduced in the presence of *T. cruzi* + Theracurmin when compared to the uninfected animals + Theracurmin. Furthermore, the Leydig cellular volume per testicle was reduced in the animals infected by the protozoan, while the Leydig cellular volume per gram of testicle were smaller only at the *T. cruzi* group, when compared to the non-infected animals. The number of Leydig cells per testicle also reduced in the infected animals when compared to the uninfected one. Even though the number of Leydig cells per

testicle did not show difference between the infected groups, the Theracurmin treatment inhibit the decrease of the number of Leydig cells per gram of testicle. The leydigosomatic index were also reduced in the infected animals, when compared to those uninfected (**Table 5**).

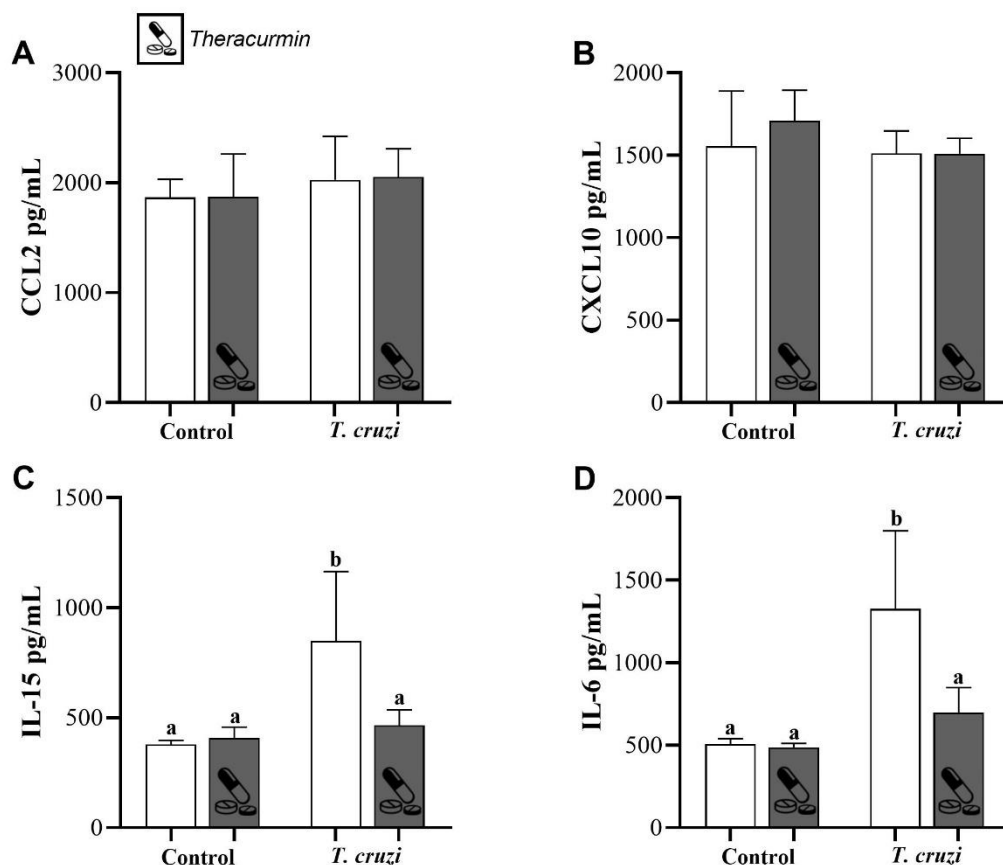
Table 5: Morphometric and stereological parameters of Leydig cells in mice infected with *T. cruzi* and treated with Theracurmin.

	Uninfected	Uninfected + Theracurmin	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i> + Theracurmin
LeydigD (μm)	7,16 $\pm$ 0,21	7,07 $\pm$ 0,16	6,92 $\pm$ 0,19	6,70 $\pm$ 0,15
Vol. LN (μm^3)	194,35 $\pm$ 16,92	186,39 $\pm$ 12,89	175,30 $\pm$ 15,20	158,21 $\pm$ 10,81
Vol. Lcit (μm^3)	1179,97 $\pm$ 213,51 ^{ab}	1473,83 $\pm$ 200,47 ^b	1035,37 $\pm$ 83,88 ^{ab}	822,62 $\pm$ 77,49 ^a
Vol. LC(μm^3)	1374,32 $\pm$ 227,61 ^{ab}	1660,22 $\pm$ 209,05 ^b	1210,67 $\pm$ 92,21 ^{ab}	980,83 $\pm$ 85,95 ^a
Vol. LC/t (mL)	0,041 $\pm$ 0,01 ^a	0,042 $\pm$ 0,00 ^a	0,022 $\pm$ 0,00 ^b	0,025 $\pm$ 0,00 ^b
Vol. LC/t (μm^3)	4,1x10 ¹⁰ $\pm$ 6,6x10 ^{9a}	4,2x10 ¹⁰ $\pm$ 2,5x10 ^{9a}	2,2x10 ¹⁰ $\pm$ 1,7x10 ^{9b}	2,5x10 ¹⁰ $\pm$ 3,5x10 ^{9b}
Vol. LC/gt (mL)	0,091 $\pm$ 0,01 ^a	0,078 $\pm$ 0,01 ^a	0,043 $\pm$ 0,00 ^b	0,063 $\pm$ 0,01 ^{ab}
Vol. LC/gt (μm^3)	9,1x10 ¹⁰ $\pm$ 1,3x10 ^{10a}	7,8x10 ¹⁰ $\pm$ 8,0x10 ^{9a}	4,3x10 ¹⁰ $\pm$ 3,7x10 ^{9b}	6,3x10 ¹⁰ $\pm$ 1,1x10 ^{10ab}
LCn/t	3,0x10 ⁷ $\pm$ 2,6x10 ^{6a}	2,7x10 ⁷ $\pm$ 3,3x10 ^{6ab}	1,9x10 ⁷ $\pm$ 1,5x10 ^{6b}	2,5x10 ⁷ $\pm$ 2,9x10 ^{6ab}
LCn/gt	6,7x10 ⁷ $\pm$ 5,6x10 ^{6a}	4,9x10 ⁷ $\pm$ 6,0x10 ^{6ab}	3,6x10 ⁷ $\pm$ 3,4x10 ^{6b}	6,4x10 ⁷ $\pm$ 8,2x10 ^{6a}
LSI (%)	0,097 $\pm$ 0,02 ^a	0,095 $\pm$ 0,01 ^a	0,049 $\pm$ 0,01 ^b	0,054 $\pm$ 0,01 ^b

LeydigD – Leydig diameter; LN – Leydig nucleus; Lcit – Leydig cytoplasm; LC – Leydig cell; LCn – Leydig cell number; t – testicle; g – gram; LSI – Leydigosomatic index. Data expressed as mean $\pm$ SE. Different letters between groups shows significant differences ($p \leq 0,05$).

Finally, the concentration of CCL2, CXCL10 did not suffer any alterations in the animals infected with *T. cruzi* and/or treated with Theracurmin with in the testicular site (**Figure 5A, 5B**). Despite of that, the concentration of IL-15 and IL-6 shows that the *T. cruzi* have increased the production of those inflammatory markers, but the animals treated with Theracurmin were capable of reduce these cytokine levels in testicular area (**Figure 5C, 5D**).

Figure 5: Production of CCL2 (A), CXCL10 (B), IL-15 (C), and IL-6 (D) at testicles of Swiss mice infected with *T. cruzi* and treated with Theracurmin. At the second day after the beginning of the treatment, mice were intraperitoneally infected with 1000 trypomastigote forms of Colombian strain of *T. cruzi*. After 30 dpi the concentration of these cytokines was evaluated by the enzymatic immunoassay method at the testicular macerated.



Data expressed as mean $\pm$ SE. Different letters between groups shows significant differences ($p \leq 0.05$).

Discussion

This present study aimed to verify if the treatment with Theracurmin (highly bioavailable curcumin) was able to regulate the morphological and/or inflammatory parameters caused by the infection of *T. cruzi* in experimental model. Previously, curcumin was able to reduce the parasitemia in *T. cruzi* infected animals (Nagajyothi *et al.*, 2013) which is explained by the inhibitory effect of curcumin at the transcription of low-density lipoprotein receptor (LDLr) (Yuan *et al.* 2008; Kang and Chen 2009; Nagajyothi *et al.*, 2013) as it is known that the *T. cruzi* utilizes these LDLr during its cellular invasion process (Nagajyothi *et al.*, 2011).

The Colombian strain of *T. cruzi* has a positive tropism for muscular tissues, infecting myoid cells frequently (Melo and Brener, 1978; Camandaroba *et al.*, 2001; Andrade *et al.*,

2010). Research conducted by Carvalho *et al.*, (2009) showed that the protozoan can infect the tunica propria cells of the tubule seminiferous and may have that preference because of contractile proteins responsible for the movement of non-motile sperm cells throughout the tubules (Lenzi *et al.*, 1998). At this present study, we found a higher volumetric percentage and volume of the tunica propria cells in the presence of the *T. cruzi*, even though we did not find amastigotes of the parasite in the testicular site. Theracurmin may have a protective role in muscular tissues (Hernández *et al.*, 2021), resulting in a reduced cellular hyperplasia at the testicular tunica propria. The infection by *T. cruzi* also induced a significant raise in the luminal diameter and area of the tubules seminiferous resulting in a higher tubule-epithelial ratio. The tubules seminiferous are composed of three main components: tunica propria, epithelium and lumen, this last structure is where the spermatozoa are released after spermatogenesis (Ross, 1974). This difference at the lumen may be the result of a compensatory effect due to the inflammatory stress caused by *T. cruzi* infection.

At this present study we found significant decrease in components of the intertubular area, such as the percentage of resident macrophages and the percentage and volume of the connective tissue during *T. cruzi* infection, corroborating with the data in Mendis-Handagama *et al.*, (1990), suggesting an alteration of the intertubular site caused by the *T. cruzi* infection. The treatment with Theracurmin also led to a decrease in the percentage and volume of connective tissue probably because of the inhibition generated by the treatment in the genic expression of growth factors at the connective tissue causing a reduction at the extracellular matrix including type I collagen and fibronectin (Xu *et al.*, 2003; Chen and Zheng, 2008). At testicular site, the extracellular matrix connects different cell types such as Sertoli and germ cells at different stages into its basement membrane and plays a significant role during spermatogenesis (Siu and Cheng, 2008).

The Leydig cells and resident macrophages of the intertubular area of the testicles has an intimate relation as these macrophages are responsible for the release of biomarkers that affect directly at the diametric growth and development of the testosterone producers' cells (Hales, 2007). In this context, the reduced presence of resident macrophages, as observed in the present study, may result in a subdevelopment of the Leydig cells. The *T. cruzi* is a crucial element to potentialize the local inflammatory response with its immunogenic molecules and, even in environment without inflammation, macrophages release important factors that contribute to the development of Leydig cells (Hales *et al.*, 1999; Hales, 2002). The decreased in Leydig cell population may be due to an intense inflammation generated by the *T. cruzi*,

reducing progressively the genic expression and function of these cells, as showed by Aldahhan *et al.* (2021) in rats with cryptorchids.

The infection caused by the protozoan *T. cruzi* is well known to cause an intense inflammatory response in a diverse range of tissues in the mammal host body with the release of inflammatory markers, such as cytokines and chemokines (Talvani and Teixeira, 2011). The curcumin has an anti-inflammatory and protective effects in tissues such as the heart and liver during the stress associated with chronic diseases, preserving their function, and regulating the release of inflammatory markers (Nagajyothi *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2021). At the macerated of the testicles, Theracurmin treatment was able to reduce the concentration of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-15. Produced by the Sertoli cells, IL-6 has an important role at paracrine/autocrine regulation during spermatogenesis and steroidogenesis and presenting in higher concentrations during exacerbated inflammation (Hedger and Meinhardt, 2003; Rival *et al.*, 2006). IL-15 has also presented higher concentration during microorganisms' infection and may have an important role in innate and adaptative response at testicular site (Anastasiadou and Michailidis, 2016). Even though the concentrations of CCL2 and CXCL10 are normally higher in heart and blood during *T. cruzi* infection (De Araújo *et al.*, 2020), our data did not show difference at testicular site. This fact reinforce that the inflammatory response conducted by the *T. cruzi* is compartmentalized and, in parts, defined by the genetic aspects of the parasite and its studied host.

In conclusion, our study demonstrated that the Colombian strain of the *T. cruzi* may cause immunological and structural alterations at the testicular site in mice infected, mainly at the tunica propria, muscle layer that recovers the tubules seminiferous, and at the Leydig cells. Moreover, the treatment with Theracurmin presented protective effects, regulating the synthesis of IL-6 and IL-15, but not CCL2 and CXCL10, in the testicular area. The relation between the *T. cruzi* infection and the testosterone production at the Leydig cells still needs to be researched for a bigger understanding of the damage caused by the protozoan at the testicular site and the relation with the spermatogenesis.

Acknowledgment

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Protocol # 405946/2021-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG - #APQ-02326-17), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP, Brazil) and

PEPROTECH US/Brazil. AT (Process # 305634/2017-8) express their gratitude to the CNPq for the research productivity fellowship.

The authors would like to acknowledge the Laboratório Multiusuários de Microscopia Avançada e Microanálise, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, for providing the equipment and technical support for experiments involving brightfield microscopy.

Disclosures

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication.

References

- Aggarwal S, Kim SW, Cheon K, Tabassam FH, Yoon JH, Koo JS. Nonclassical Action of Retinoic Acid on the Activation of the cAMP Response Element-binding Protein in Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 2006; 17, 566–575. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0519>
- Aldahhan RA, Stanton PG, Ludlow H, de Kretser DM, Hedger MP. Experimental Cryptorchidism Causes Chronic Inflammation and a Progressive Decline in Sertoli Cell and Leydig Cell Function in the Adult Rat Testis. *Reprod. Sci.* 2021; 28, 2916–2928. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00616-0>
- Almeida AB, Araújo PF, Bernal FM, Rosa AC, Valente SA, Teixeira ARL. Sexual Transmission of American Trypanosomes from Males and Females to Naive Mates. *J. Vis.* 2019; 143, 1–12. <https://doi.org/doi:10.3791/57985>
- Anastasiadou M, Michailidis G. Transcriptional changes of cytokines in rooster testis and epididymis during sexual maturation stages and *Salmonella* infection. *Anim. Reprod. Sci.* 2016; 171, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.05.012>
- Andrade LO, Galvão LMC, de Nazareth SLM, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: An *in vitro* study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2010; 105, 834–837. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000600018>
- Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, Van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR. Curcumin is an *in vivo* inhibitor of angiogenesis. *Mol. Med.* 1998; 4, 376–383. <https://doi.org/10.1007/bf03401744>
- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with

- Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. 1962; 4, 389–396.
- Camandaroba EL, Campos RF, Magalhães JB, Andrade SG. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2001; 34, 151–157. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000200001>
- Carvalho LOP, Abreu-Silva AL, Hardoim DJ, Tedesco RC, Mendes VG, da Costa SCG, Calabrese KS. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. Int. J. Exp. Pathol. 2009; 90, 52–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00592.x>
- Chen A, Zheng S. Curcumin inhibits connective tissue growth factor gene expression in activated hepatic stellate cells *in vitro* by blocking NF- κ B and ERK signalling. Br. J. Pharmacol. 2008; 153, 557–567. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707542>
- Chiu J, Khan ZA, Farhangkhoei H, Chakrabarti S. Curcumin prevents diabetes-associated abnormalities in the kidneys by inhibiting p300 and nuclear factor- κ B. Nutrition 2009; 25, 964–972. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.12.007>
- De Araújo FF, Lima Torres KC, Viana Peixoto S, Pinho Ribeiro AL, Mambrini J, Bortolo, RV, Lima MLS, Loyola Filho, AI, Teixeira-Carvalho A, Lima-Costa MF, Martins-Filho OA. CXCL9 and CXCL10 display an age-dependent profile in Chagas patients: A cohort study of aging in Bambui, Brazil. Infect. Dis. Poverty 2020; 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00663-w>
- De Paula Costa G, Lopes LR, Da Silva MC, Horta AL, Pontes WM, Milanezi CM, Guedes PMDM, De Lima WG, Schulz R, Da Silva JS, Talvani A. Doxycycline and Benznidazole Reduce the Profile of Th1, Th2, and Th17 Chemokines and Chemokine Receptors in Cardiac Tissue from Chronic *Trypanosoma cruzi*-Infected Dogs. Mediators Inflamm. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3694714>
- Esper L, Talvani A, Pimentel P, Teixeira MM, Machado FS. Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. Curr. Opin. Infect. Dis. 2015; 28:3.
- Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. AAPS J. 2013; 15, 195–218. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9432-8>
- Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2012; 39, 283–299. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x>
- Hales DB. Regulation of Leydig Cell Function as it Pertains to the Inflammatory Response.

- Humana Press, Totowa, NJ, 2007 pp. 305–321. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-453-7_21
- Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 2002; 57, 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(02\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(02)00020-7)
- Hales DB, Diemer T, Held Hales K. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 1999; 10, 201–217. <https://doi.org/10.1007/bf02738619>
- Hedger MP, Meinhardt A. Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.* 2003; 58, 1–26.
- Hernández M, Wicz S, Pérez Caballero E, Santamaría MH, Corral RS. Dual chemotherapy with benznidazole at suboptimal dose plus curcumin nanoparticles mitigates *Trypanosoma cruzi*-elicited chronic cardiomyopathy. *Parasitol. Int.* 2001; 81, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102248>
- Hossain E, Khanam S, Dean DA, Wu C, Lostracco-Johnson S, Thomas D, Kane SS, Parab AR, Flores K, Katemauswa M, Gosmanov C, Hayes SE, Zhang Y, Li D, Woelfel-Monsivais C, Sankaranarayanan K, McCall LI. Mapping of host-parasite-microbiome interactions reveals metabolic determinants of tropism and tolerance in Chagas disease. *Sci. Adv.* 2020; 6, 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2015>
- Kang Q, Chen A. Curcumin Inhibits srebp-2 Expression in Activated Hepatic Stellate Cells *in vitro* by Reducing the Activity of Specificity Protein-1. *Endocrinology* 2009; 150, 5384–5394. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0517>
- Kuttan G, Hari Kumar KB, Guruvayoorappan C, Kuttan R. Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595:173-184. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_6
- Lenzi HL, Castelo-Branco MTL, Pelajo-Machado M, Oliveira DN, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. *Acta Trop.* 1998; 71, 117–129.
- Medina L, Castillo C, Liempi A, Herbach M, Cabrera G, Valenzuela L, Galanti N, de los Angeles Curto M, Schijman AG, Kemmerling U. Differential infectivity of two *Trypanosoma cruzi* strains in placental cells and tissue. *Acta Trop.* 2018; 186, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.07.001>
- Melo RC, Brener Z. Tissue Tropism of Different *Trypanosoma cruzi* Strains. *J. Parasitol.* 1978; 64, 475–482. <https://doi.org/10.2307/3279787>
- Mendis-Handagama C, Kerr J, Kretser D. Experimental Cryptorchidism in the Adult Mouse: Qualitative and Quantitative Light Microscopy Morphology. *J. Androl.* 1990; 11, 539–

547.

- Menezes AP de J, Silva ML, Pereira WL, Costa GP, Horta AL, Mendonça AAS, Carneiro ACA, Souza DMS, Novaes RD, Teixeira RR, Talvani A. *In vitro* tripanocidal effect of 1,8-dioxooctahydroxanthenes (xanthenodiones) and tetraketones and improvement of cardiac parameters *in vivo*. J. Glob. Antimicrob. Resist. 2020; 22, 466–476. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.04.005>
- Nagajyothi F, Tanowitz HB, Zhao D, Weiss LM. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitol. Res. 2013; 110, 2491–2499. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2790-9>
- Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, Tanowitz HB. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low Density Lipoprotein receptor in invasion. PLoS Negl. Trop. Dis. 2011; 5:2. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000953>
- Nakagawa Y, Mukai S, Yamada S, Murata S, Yabumoto H, Maeda T, Akamatsu S. The Efficacy and Safety of Highly-Bioavailable Curcumin for Treating Knee Osteoarthritis: A 6-Month Open-Labeled Prospective Study. Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord. 2020; 13, 1–8. <https://doi.org/10.1177/1179544120948471>
- Pérez-molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet 2018; 391, 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Rival C, Theas S, Guazzone VA, Lustig L. Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. J. Reprod. Immunol. 2006; 70, 43–58. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.10.006>
- Ross MH. The organization of the seminiferous epithelium in the mouse testis following ligation of the efferent ductules. A light microscopic study. Anat. Rec. 1974; 180, 565–579. <https://doi.org/10.1002/ar.1091800403>
- Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, Wada H, Katanasaka Y, Kakeya H, Fujita M, Hasegawa K, Morimoto T. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. Biol. Pharm. Bull. 2011; 34, 660–665.
- Siu MKY, Yan Cheng C. Extracellular matrix and its role in spermatogenesis. Adv. Exp. Med. Biol. 2008; 636, 74–91. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_5
- Talvani A, Teixeira MM. Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. Adv. Parasitol. 2011; 76, 171–194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00008-6>
- Weaver JD, Hoffman VJ, Roffe E, Murphy PM, Herbert DR. Low-Level Parasite Persistence Drives Vasculitis and Myositis in Skeletal Muscle of Mice Chronically Infected with

- Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 2019; 87, e00081-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00081-19>
- World Health Organization (WHO), Chagas disease (American trypanosomiasis). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) , 2022. (accessed 14 march 2022)
- Xu J, Fu Y, Chen A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth. Am. J. Physiol. Liver Physiol. 2003; 285, G20–G30. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00474.2002>
- Yuan H, Kuang S, Zheng X, Ling H, Yang YB, Yan P-K, Li K, Liao D-F. Curcumin inhibits cellular cholesterol accumulation by regulating SREBP-1/caveolin-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells¹. Acta Pharmacol. Sin. 2008; 29, 555–563. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00783.x>
- Zapparoli D, Bertozzo TV, Alexandrino M, Sanches DF, Aires IN, Manzini S, de Medeiros MIM, Kurokawa CS, dos Santos RM, Lucheis SB. Commercially acquired açai pulps contamination by *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Food Microbiol. 2022; 363, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109508>
- Zingales B. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2009; 104, 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>

6. Perspectivas

- Avaliar a infecção epididimal do *T. cruzi* em camundongos;
- Avaliar os efeitos protetivos da *Theracurmin* nos epidídimos de camundongos infectados com o *T. cruzi*;
- Avaliar a produção de testosterona em animais infectados pelo *T. cruzi* e tratados com a *Theracurmin*.

7. Referências

- Almeida A B, Araújo PF, Bernal FM, Rosa AC, Valente SA, Teixeira ARL. Sexual Transmission of American Trypanosomes from Males and Females to Naive Mates. *Journal of Visualized Experiments*, 2019; 143, 1–12. <https://doi.org/doi:10.3791/57985>
- Alvarenga NJ, Bronfen E. Metaciclogênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1997; 30(3), 247–250.
- Amann RP. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertility and Sterility*, 1970; 21(9), 662–672.
- Anastasiadou M, Michailidis G. Transcriptional changes of cytokines in rooster testis and epididymis during sexual maturation stages and *Salmonella* infection. *Animal Reproduction Science*, 2016; 171, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.05.012>
- Arck P, Solano ME, Walecki M, Meinhardt A. The immune privilege of testis and gravid uterus: Same difference? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014; 382(1), 509–520. doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.022
- Boockfor FR, Wang D, Lin T, Nagpal ML, Spangelo BL. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. *Endocrinology*, 1994; 134(5), 2150–2155. <https://doi.org/10.1210/endo.134.5.8156916>
- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1962; 4, 389–396.
- Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. The influence of collagenase treatment on the production of TNF- α , IL-6 and IL-10 by testicular macrophages. *Journal of Immunological Methods*, 2005; 301(1), 186–189. doi.org/10.1016/j.jim.2005.04.002
- Carvalho LOP, Abreu-Silva AL, Hardoim DJ, Tedesco RC, Mendes VG, da Costa SCG, Calabrese KS. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 2009; 90(1), 52–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00592.x>
- Chagas C. Neue Trypanosomen. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 1909; 13, 120–122.
- Costa RR, Reis RI, Aguiar JF, Varanda WA. Luteinizing hormone (LH) acts through PKA and

- PKC to modulate T-type calcium currents and intracellular calcium transients in mice Leydig cells. *Cell Calcium*, 2011; 49(3), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.02.003>
- Coura JR. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2015; 110(3), 277–282. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>
- Coura JR, Carlos Pinto Dias J. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009; 104(i), 32–40.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 2010; 465(7301), S6–S7. <https://doi.org/10.1038/nature09221>
- Cudicini C, Lejeune H, Gomez E, Bosmans E, Ballet F, Saez J, Jégou B. Human leydig cells and sertoli cells are producers of interleukins-1 and-6. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1997; 82(5), 1426–1433.
- Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. *Mediators of Inflammation*, 2014; 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/683230>
- De Souza W, Grytberg N, Nery-Guimarães F. Aspectos Ultra-Estruturais Da Forma Epimastigota Do *Trypanosoma Cruzi* Em Meio Lit. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1975; 9(3), 143–156.
- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002; 97(5), 603–612.
- Dias JCP, Matos CS. Seventy years of the Chagas disease Bambuí Project: Celebration and perspectives. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2013; 46(5), 533–535. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0175-2013>
- Gaytan F, Carrera G, Pinilla L, Aguilar R, Bellido C. Mast Cells in the Testis, Epididymis and Accessory Glands of the Rat: Effects of Neonatal Steroid Treatment. *Journal of Andrology*, 1989; 10(5), 351–358.
- Goossens E, Tournaye H, Yanagimachi R. Spermatogenesis: Clinical and Experimental Considerations. *The Sperm Cell* 2017; 1–20. <https://doi.org/10.1017/9781316411124.003>
- Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microscopy Research and Technique*, 2009; 72(8), 620–628. <https://doi.org/10.1002/jemt.20704>
- Head J, Neaves W, Billingham R. Immune privilege in testis - Basic parameters of allograft survival. *Transplantation*, 1983; 36(4), 423–431.
- Hedger MP, Meinhardt A. Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of Reproductive*

- Immunology, 2003; 58(1), 1–26.
- Hess RA, de Franca LR. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1
- Hess R, França L. Structure of the Sertoli cell. *Sertoli Cell Biology*. 2005; 19–40.
- Jégou B. Spermatids Are Regulators of Sertoli Cell Function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991; 637(1), 340–353. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb27321.x>
- Jiang Q, Wang F, Shi L, Zhao X, Gong M, Liu W, Song C, Li Q, Chen Y, Wu H, Han D. C-x-c motif chemokine ligand 10 produced by mouse sertoli cells in response to mumps virus infection induces male germ cell apoptosis. *Cell Death and Disease*, 2017; 8(10), 1–13. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.560>
- Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 2004; 1–38. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0012-2>
- Kern S, Robertson SA, Mau VJ, Maddocks S. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biology of Reproduction*, 1995; 53(6), 1407–1416.
- Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 1998; 13(1), 1–8.
- Lenzi H, Castelo-Branco MTL, Pelajo-Machado M, Oliveira DN, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. *Acta Tropica*, 1998; 71(2), 117–129.
- Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation*, 1994; 90(6), 3098–3102. doi.org/10.1161/01.CIR.90.6.3098
- Martin DL, Lowe KR, McNeill T, Thiele EA, Roellig DM, Zajdowicz J, Hunter SA, Brubaker SA. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Tropica*, 2015; 149, 15–18. doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.002
- Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2015; 13(8), 995–1029. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1056158>
- Nagajyothi F, Tanowitz HB, Zhao D, Weiss LM. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, 2013; 110(6), 2491–2499. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2790-9>
- Nakagawa Y, Mukai S, Yamada S, Murata S, Yabumoto H, Maeda T, Akamatsu S. The

- Efficacy and Safety of Highly-Bioavailable Curcumin for Treating Knee Osteoarthritis: A 6-Month Open-Labeled Prospective Study. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 2020; 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1177/1179544120948471>
- Nistal M, Paniagua R. Infertility in adult males with retractile testes. *Fertility and Sterility*, 1984; 41(3), 395–403. [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)47718-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)47718-6)
- Patidar M, Yadav N, Dalai SK. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.06.001>
- Pérez-molina JA, Molina I. Chagas disease. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 2018; 391, 82–94.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet*, 2001; 1(September), 92–100.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet*, 2010; 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rival C, Theas S, Guazzone VA, Lustig L. Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology*, 2006; 70, 43–58. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.10.006>
- Russel L. The Sertoli cell. In *Molecular Reproduction and Development*. 1993.
- Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, Wada H, Katanasaka Y, Kakeya H, Fujita M, Hasegawa K, Morimoto T. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2011; 34(5), 660–665.
- Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas. 2021.
- Simões T, Borges L, Assis A, Silva MV, dos Santos J, Meira K. Chagas disease mortality in Brazil: A Bayesian analysis of age-period-cohort effects and forecasts for two decades. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2018; 12(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006798>
- Souza JM, Vieira TM, Candido ACB, Tezuka DY, Rao GS, de Albuquerque S, Crotti AEM, Siqueira-Neto JL, Magalhães LG. In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhancement of curcumin by its monoketone tetramethoxy analog diveratralacetone. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 2021; 1, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100031>
- Syriou V, Papanikolaou D, Kozyraki A, Goulis DG. Cytokines and male infertility. *European Cytokine Network*, 2018; 29(3), 73–82. <https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0412>
- Talvani A, Teixeira MM. Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and

- Relevance. *Advances in Parasitology*, 2011; 76, 171–194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00008-6>
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 2001; 31(5), 472–481. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- World Health Organization (WHO), Chagas disease (American trypanosomiasis). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) , 2022. (acessed 14 march 2022)
- Zapparoli D, Bertozzo TV, Alexandrino M, Sanches DF, Aires IN, Manzini S, de Medeiros M IM, Kurokawa CS, dos Santos RM, Lucheis SB. Commercially acquired açaí pulps contamination by *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Food Microbiology*, 2022; 363, 109508. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109508
- Zhang J, Ye R, Grunberger JW, Jin J, Zhang Q, Mohammadpour R, Khurana N, Xu X, Ghandehari H. Activation of Autophagy by Low-Dose Silica Nanoparticles Enhances Testosterone Secretion in Leydig Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23(3104), 1–17.
- Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems : immune privilege and innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 2014; 11, 428–437. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.38>

8. Anexos

8.1. Anexo 1: Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFOP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da curcumina (Curcuma longa) sob a resposta inflamatória do músculo estriado cardíaco e esquelético em animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao treinamento físico aeróbico", protocolada sob o CEUA nº 4487110520 (ID 000412), sob a responsabilidade de **André Talvani Pedrosa da Silva e equipe; Vitória Louise Teixeira e Silva; Kelerson Mauro de Castro Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 10/07/2020.

We certify that the proposal "Effects of curcumin (long curcumin) on an inflammatory response of cardiac and skeletal muscle in animals infected with *Trypanosoma Cruzii* and use in aerobic physical training.", utilizing 120 Heterogenics mice (120 males), protocol number CEUA 4487110520 (ID 000412), under the responsibility of **André Talvani Pedrosa da Silva and team; Vitória Louise Teixeira e Silva; Kelerson Mauro de Castro Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 07/10/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2020](#) a [02/2021](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [7 a 9 semanas](#)

N: [120](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [20 a 40 g](#)

Local do experimento: O experimento será realizado nas instalações do CCA-UFOP em sala previamente equipada para realização dos tratamentos e análise de parasitemia. Eutanásia e necrópsia serão realizadas também no CCA-UFOP em sala específica para este fim.

Ouro Preto, 16 de julho de 2020

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

8.2. Anexo 2: Atualização do Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFOP



UNIVERSIDADE
FEDERAL DE
OURO PRETO



PROPP - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética no Uso de Animais

Ouro Preto, 16 de julho de 2021
CEUA N 4487110520

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: André Talvani Pedrosa Da Silva

Área: Ciências Biológicas

Título da proposta: "Efeitos da curcumina (*Curcuma longa*) sob a resposta inflamatória do músculo estriado cardíaco e esquelético em animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao treinamento físico aeróbico".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFOP (ID 000273)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 08/julho/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "- SOLICITAÇÃO Para realizar posteriores análises teciduais, além dos órgãos já citados neste projeto (coração e gastrocnêmio, como tecido muscular cardíaco e esquelético, respectivamente) solicitamos autorização para utilização dos seguintes órgãos também retirados: fígado, baço, tecido adiposo epididimal, pênis, testículo, epidídimo, próstata e vesícula seminal."

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

8.3. Anexo 3: Comprovação de submissão do artigo científico.

Journal of Reproductive Immunology

Protective effects of Theracurmin treatment during experimental infection of the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* at the testicular site

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Section/Category:	Basic Immunology
Keywords:	Trypanosoma cruzi; inflammation; testicles; cytokines; Theracurmin
Corresponding Author:	Andre Talvani, PhD Universidade Federal de Ouro Preto Ouro Preto, MG BRAZIL
First Author:	Breno Luiz Pimenta, MSc
Order of Authors:	Breno Luiz Pimenta, MSc Tatiana Prata Menezes, PHD Vitória Louise Teixeira e Silva, MSc Fernanda carolina Ribeiro Dias, PHD Bianca Alves Almeida Machado, MSc Lais Ribeiro, MSc Kelerson Mauro de Castro Pinto, PHD Andre Talvani, PhD
Abstract:	Chagas' disease is a tropical neglected illness caused by <i>Trypanosoma cruzi</i> and remains one of the most significant causes of morbidity and mortality in South and Central Americas. The disease is caused by a moderate to intense and persistent inflammatory response characterized by local upregulated expression and production of inflammatory mediators that favors the activation and recruitment of distinct cells of the immune system into different tissues to eliminate the parasites. Theracurmin is a curcumin's derived formulation of nanoparticles. Its anti-inflammatory properties make this bioactive compound a mitigating factor in pathological cases after an overwhelming inflammatory response. Our research focused on the testicular investigation in 28 mice infected by 10 ³ trypomastigote forms of Colombian strain of <i>T. cruzi</i> and treated with Theracurmin. The mice were treated with 30 mg/Kg of Theracurmin during the period of 30 days. At the 30 th day post infection animals were euthanized, and its testicles were collected to morphological and immunological assays. The animals infected and treated with Theracurmin presented a reduction in the testicular levels of IL-15 and IL-6. The volume of the tunica propria are also higher in all infected animals, but Theracurmin decreased this parameter in the treated animals. In the intertubular area, the percentage of some intertubular components was decreased in the infected animals such as the percentage and volume of Leydig cells, connective tissue, and macrophages. Furthermore, our data pointed to the daily use of Theracurmin in the diet as a protective element of the testicular area.
Suggested Reviewers:	Mariana Hecht, PhD Professor, University of Brasilia marianahecht@gmail.com Based on the PubMed articles, Dr Hecht presents expertise in <i>T. cruzi</i> and in sexual transmission in experimental models. So, we believe she can contribute with technical analysis of this manuscript. Antonio R L Teixeira, MD, PHD University of Brasilia antonio Teixeira RL@gmail.com Based on his articles (PubMed), Dr Teixeira has expertise in <i>T. cruzi</i> investigations in the context of sexual transmission. So, we also believe his knowledge could be valuable in this manuscript analysis. Mária L Cafferata, PhD Professor, Institute for Clinical Effectiveness and Health Policy mcafferata@iecs.org.ar
	Christopher Chee Kong Ho, MD, PHD Professor, Universiti Kebangsaan Malaysia Faculty of Health Sciences chriskho2002@yahoo.com Dr Kong Ho is a professor of urology and, based on the online consult (PubMed and google scholar), he has experience in human investigations involving reproductive organs related to different infections. Eduardo Medeiros Damasceno, PhD Professor, Federal University of Rio Grande edumdamasceno@hotmail.com Dr Damasceno has experience in morphology/spermatogenesis and ecotoxicology in experimental models.

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation
Professor, Institute for Clinical Effectiveness and Health Policy
mcafferata@iecs.org.ar