



TOXOPLASMOSE AGUDA ALTERA SUBPOPLUAÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES E PROVOCA REMODELAMENTO DAS FIBRAS COLÁGENAS E AUMENTO DA PAREDE E DO ÍLEO DE RATOS

Joquebede Caroline Pessoa do Nascimento (PIBIC/CNPq), Larissa Carla Lauer Schneider, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana, Nilza Cristina Büttow (Orientadora), e-mail: joquebede1893@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Morfológicas / Maringá, PR

Área: Ciências Biológicas | **Subárea:** Histologia

Palavras-chave: toxoplasmose experimental, mucinas, regeneração tecidual

Resumo:

Intestino delgado é um órgão tubular revestido por epitélio contendo células caliciformes secretoras de muco ácido ou neutro. O tecido conjuntivo local é composto principalmente por colágeno tipo I mais resistente, associado ao colágeno tipo III de cicatrização. Esse estado fisiológico pode ser alterado na infecção por *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório adquirido via oral por água e alimentos contaminados. Neste estudo utilizamos 45 *Rattus norvegicus* Wistar machos com 60 dias de idade, distribuídos aleatoriamente em 9 grupos (n=5): controle (não infectado), Gi6h, Gi12h, Gi24h, Gi48h, Gi72h, Gi7d e Gi15d, infectados oralmente com 5000 oocistos de *T. gondii* cepa ME-49 genótipo II e mantidos por 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 7 dias e 15 dias respectivamente. O controle recebeu salina estéril. Os ratos foram eutanasiados, retirou-se o íleo e este passou por técnicas histológicas para estudo de células caliciformes, parede intestinal e fibras colágenas. Foi verificado que a infecção aguda por *T. gondii* altera subpopulações de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas e neutras e provoca remodelamento das fibras colágenas do tipo I e III, além de aumento na espessura da parede do íleo de ratos.

Introdução

O trato digestivo assemelha-se a um tubo oco de parede seletivamente permeável. No segmento delgado, é constituído pelas camadas mucosa,





submucosa, muscular e serosa, permeado por tecido conjuntivo, cujo principal componente é o colágeno. A proteína colágeno tipo I, que forma fibras espessas, está em maior quantidade nos tecidos, geralmente associado ao colágeno tipo III, denominado fibra reticular, abundante na formação do tecido cicatricial. Com a progressão da cicatrização, as fibras do tipo III são substituídas pelas do tipo I, mais resistentes. Dentre os patógenos que provocam alterações intestinais está o *Toxoplasma gondii*, um parasito intracelular obrigatório adquirido via oral, cujo principal sítio de replicação é o íleo, provocando diarreia e atrofia. Estima-se que um terço ou mais da população mundial apresente anticorpos contra o parasito. O epitélio intestinal possui diversos tipos celulares, dentre eles células caliciformes (CCs), produtoras de mucinas ácidas (sulfomucinas e sialomucinas) e neutras, formando uma camada de muco que permite absorção de nutrientes e atua como primeira linha de defesa inata do indivíduo. A secreção rápida e em grande quantidade de muco pelas CCs faz com que os patógenos fiquem presos a esse material, inibindo sua entrada através do epitélio (DA SILVA *et al.*, 2010). O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da infecção aguda por *T. gondii* sobre a parede intestinal, fibras colágenas tipo I e III e células caliciformes do íleo de ratos.

Materiais e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá, protocolo nº 013/2013. Neste estudo, foram utilizados 45 *Rattus norvegicus* Wistar machos, com 60 dias de idade, distribuídos aleatoriamente em 9 grupos (n=5), grupo controle (não infectado), e grupos Gi6h, Gi12h, Gi24h, Gi48h, Gi72h, Gi7d e Gi15d, inoculados oralmente com 5000 oocistos de *T. gondii*, e mantidos em biotério com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e foto-período de 12 horas (6hs – 18hs), recebendo ração padrão para roedores e água *ad libitum*, e eutanasiados após 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 7 dias e 15 dias respectivamente. O grupo controle recebeu solução salina estéril. Foi retirado 2 cm do íleo terminal e corado com Alcian Blue pH 1.0 e 2.5, Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Picro Sirius para evidenciação de sulfomucinas, sialomucinas, mucinas neutras e colágeno tipo I e III, respectivamente. Das lâminas coradas com PAS e Alcian-Blue, foram capturadas 6 imagens de cada corte transversal através de microscopia óptica com objetiva de 40x, digitalizadas e analisadas através dos softwares Q Capture Pro® (5.1, Media Cybernetics, USA) e Image Pro Plus® (4.5, Media Cybernetics, USA), respectivamente. Nas





lâminas coradas por PAS também foram mensuradas as túnicas musculares, mucosa, submucosa, altura de 08 vilos e parede total. As lâminas coradas por Picro Sirius foram analisadas da mesma forma em microscópio óptico de luz polarizada. Os resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas através do programa GraphPad Prism® (5.0, GraphPad Software, Inc.), expressos como média \pm erro padrão. Foi realizada análise de variância One-way ANOVA, seguida de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

Resultados e Discussão

Durante o período de infecção não houve diferença significativa na quantidade de caliciformes secretoras de sulfomucinas, enquanto as de mucinas neutras e sialomucinas tiveram sua quantidade reduzida no grupo Gi24h (Tabela 1). Uma possível causa dessa perda é a lise celular devido à saída do parasito, através de ruptura mecânica da membrana celular ante a tensão exercida pelo aumento do vacúolo parasitóforo, ou indução da perda de potássio pela célula hospedeira, resultando em sinalização por íons cálcio no parasito, ativando sua motilidade. Outra causa seria mudança na composição do muco, explicando a diferença entre as subpopulações de CCs. A alteração de mucinas poderia ocasionar uma mudança na viscosidade, deixando o parasito menos móvel e com dificuldade de se alimentar, levando à sua morte e expulsão por peristaltismo, além de proteger melhor a barreira intestinal contra a entrada de taquizoítos (DA SILVA *et al.*, 2010). CCs produtoras de mucinas neutras recuperaram sua quantidade em relação ao controle em 15 dias de infecção, podendo ser consequência da regeneração do epitélio intestinal. Durante a infecção, os macrófagos das camadas musculares intestinais são os primeiros a responder à invasão tecidual, liberando citocinas e fatores de crescimento. Ocorreria migração de macrófagos e células imunes das placas de Peyer (agregados linfóides presentes principalmente no íleo) em grande quantidade, resultando em hipertrofia muscular, contribuindo para a expulsão do parasito por hipercontratibilidade. A resposta imunológica contra o parasito provoca aumento na proliferação de células-tronco nas glândulas intestinais, resultando em aumento no tamanho dos vilos. Verificou-se um remodelamento na camada submucosa após 12 horas de infecção, com aumento de colágeno tipo I, e de 72 horas em diante, houve substituição por colágeno tipo III, indicando processo de regeneração tecidual frente à invasão parasitária.





Tabela 1 – Morfometria da parede intestinal e fibras colágenas do tipo I e III em ratos controle e infectados por *T. gondii* nos respectivos tempos experimentais. Dados expressos em média \pm erro padrão.

	GC	Gi6h	Gi12h	Gi24h	Gi48h	Gi72h	Gi7d	Gi15d
Parede total	450 \pm 2.6	443 \pm 33	419 \pm 35	485 \pm 37	648 \pm 5.5	445 \pm 1.2	471 \pm 11.6	493 \pm 2.6
Mucosa	379 \pm 1.2	369 \pm 27	369 \pm 33	414 \pm 34	537 \pm 7.7	398 \pm 2.5	407 \pm 8.4	§419 \pm 1.8
Vilo	195 \pm 2	228 \pm 14	217 \pm 13	246 \pm 37	289 \pm 7.2	§247 \pm 2.1	238 \pm 3.4	†216 \pm 1.3
Submucosa	26 \pm 1.5	20 \pm 0.9	18 \pm 0.6	18 \pm 0.9	27 \pm 1.3	15.3 \pm 0.7	17 \pm 1.2	29 \pm 1.3
Muscular	45 \pm 1.5	53 \pm 6.6	32 \pm 2.9	53 \pm 4.1	84 \pm 5.9	†31 \pm 1.4	47 \pm 3.4	45 \pm 0.6
Col 1	1 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	5 \pm 1.3	6 \pm 0.7	5 \pm 0.3	4 \pm 1.2	4 \pm 1.2	†3.4 \pm 0.2
Col 3	0.9 \pm 0.1	§1.3 \pm 0.4	3 \pm 0.4	6 \pm 0.5	5 \pm 1.4	9 \pm 1.8	11 \pm 2.8	3.7 \pm 0.6
Sulfomucina	1038 \pm 117	1024 \pm 114	868 \pm 59	769 \pm 54	931 \pm 73.6	784 \pm 85.4	1025 \pm 119	1043 \pm 101
Sialomucina	997 \pm 71	672 \pm 54	771 \pm 49	§487 \pm 62	669 \pm 42.5	541 \pm 44.8	707 \pm 56.1	678 \pm 102
Neutra	689 \pm 14	631 \pm 54	538 \pm 40	§351 \pm 48	535 \pm 24.2	498 \pm 48.6	569 \pm 38.9	797 \pm 134

† p < 0.005; § p < 0.08; Col 1 e Col 3: colágenos tipo 1 e 3.

Conclusões

A infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* altera as subpopulações de células caliciformes intestinais e conseqüentemente a composição do muco. A inflamação provocada pelo parasito promove hipertrofia muscular, proliferação celular nas glândulas intestinais e remodelamento nas fibras colágenas tipo I e III na camada submucosa, evidenciando regeneração ante a infecção.

Agradecimentos

À Capes pelo financiamento deste projeto de pesquisa científica.

Referências

DA SILVA, J.M.; DA SILVA, A.V.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT'ANA, D.M.G. Efeitos da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal de gatos domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 55-61, 2010.

