

## ESTUDO QUANTITATIVO DAS CÉLULAS CALICIFORMES PRODUTORAS DE MUCINAS NEUTRAS E SIALOMUCINAS LÁBEIS NO JEJUNO DE RATOS INFECTADOS PELO *T. gondii*

Júlia Estevinho Albiero (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana, Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo (Orientador), e-mail: gessilda.melo@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Ciências da saúde/ Doenças Infecciosas e Parasitárias**

**Palavras-chave:** mucinas, toxoplasmose, intestino delgado.

### Resumo:

O *Toxoplasma gondii*, na maioria dos casos, necessita superar barreiras físicas e imunológicas do intestino delgado de seus hospedeiros afim de exercer seu parasitismo. As células caliciformes produtoras de mucinas neutras e sialomucinas lábeis fazem parte da composição do epitélio intestinal. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar quantitativamente as células caliciformes produtoras de mucinas neutras e sialomucinas lábeis no jejuno de ratos infectados com *T. gondii*. Utilizando ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), que foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n=7) que receberam inóculo por via oral contendo 5000 oocistos de *T. gondii* e mantidos por 6 (GI1), 12 (GI2), 24 (GI3), 72 horas (GI4), além do grupo controle (GC) que recebeu solução salina estéril. Após período experimental e a coleta do jejuno que passou por técnicas histológicas, as lâminas obtidas foram coradas pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS) para determinação de células caliciformes produtoras de mucinas neutras e sialomucinas lábeis. Depois da quantificação pode-se notar diminuição das células caliciformes produtoras de mucinas neutras, sendo estatisticamente significativa no GI1 ( $12,46 \pm 0,81\%$ ) e GI3 ( $12,44 \pm 1,74\%$ ). Dessa forma, houve alteração na composição do epitélio intestinal em diferentes tempos de infecção pelo *T.gondii*, caracterizado pela diminuição das células caliciformes produtoras de mucinas neutras e sialomucinas lábeis.

### Introdução

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, agente causador da toxoplasmose, uma das infecções parasitárias mais comuns do homem e de vários animais domésticos e selvagens. Possui ciclo de vida que se alterna entre hospedeiros intermediários, definidos como hospedeiro de estágios assexuados, e hospedeiro definitivo, aquele que alberga os estágios sexuados do parasito. Os hospedeiros definitivos são os felídeos,

sendo que os gatos domésticos possuem papel fundamental na transmissão do *T. gondii* para o homem e outros hospedeiros (DUBEY, 2009)

Durante seu ciclo de vida o parasito apresenta o estágio de oocisto que é a forma de resistência que possui uma parede dupla bastante resistente às condições ambientais. Além da ingestão do oocisto, a infecção pelo *T. gondii* pode ocorrer por meio da ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos ou por meio de taquizoítos livres encontrados nos líquidos somáticos ou ainda por via congênita (NEVES et al., 2011).

Quando a infecção ocorre por via oral, o *T. gondii* precisa atravessar a barreira intestinal para sua disseminação. Desta forma, causa alterações na mucosa intestinal que são marcados pela migração de leucócitos como parte dos mecanismos de resposta inflamatória local (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006).

Entre as células do epitélio intestinal as células caliciformes são responsáveis pela síntese, armazenamento e liberação de mucinas. As mucinas são classificadas de acordo com a sua composição em neutras, que auxiliam na digestão, além de proteger o epitélio contra microorganismos e que conta em sua estrutura com monossacarídeos de manose, galactose e galactosamina (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). A avaliação das células produtoras dessas mucinas torna-se importante, tendo em vista os eventos desencadeados alterando a homeostasia da parede intestinal frente a infecção pelo *T. gondii*. Esse trabalho teve como objetivo avaliar quantitativamente as células caliciformes produtoras de mucinas neutras e sialomucinas lábeis no epitélio do jejuno de ratos infectados com *T. gondii* (cepa ME-49 genótipo II) em diferentes tempos da infecção aguda.

## **Materiais e métodos**

### *Desenho experimental*

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer n.079/2013). Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 60 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n=7) que foram inoculados por *T. gondii* e mantidos por 6 (GI1), 12 (GI2), 24 (GI3), 72 horas (GI4). Houve um grupo controle (GC). Cada rato dos grupos GI1 a GI4 recebeu por via oral 5000 oocistos de *T. gondii* esporulados (ME-49, genótipo II) e ressuspendidos em 1 mL de solução salina estéril, enquanto os animais dos grupos GC receberam apenas solução salina. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas (6hs – 18hs), recebendo ração padrão para roedores e água *ad libitum*.

### *Coleta e processamento histológico das Amostras*

Após os períodos específicos de infecção de cada grupo experimental os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano (Vivas et al. 2007). Após laparotomia anéis de dois centímetros do jejuno foram retirados, fixados em paraformaldeído 4% durante 6 horas. Os segmentos foram desidratado em série ascendente de

álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina para posterior obtenção dos cortes transversais semi-seriados de 5  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, procedeu-se a coloração das lâminas pela técnica de PAS (ácido periódico de Schiff).

#### *Contagem de células caliciformes*

Quatro seções de cada rato foram coradas com PAS. Foram capturadas seis imagens de cada seção com uma câmera digital (câmera Pro Series 3CCD) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX50) com uma objetiva de 20X. O número de células caliciformes que estavam presentes em 0,96 mm<sup>2</sup> na mucosa de cada animal foi quantificado usando o software ImagePro Plus® (Media Cybernetics).

#### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada com o software Bioestat 5.0® e Graph Pad Prism versão 5.0®. A distribuição de dados foi verificada com os testes de normalidade de D'Agostino-Pearson. Todos os dados foram normalmente distribuídos e, portanto, foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados usando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

## Resultados e Discussão

Em todos os tempos de infecção foi observada uma redução na quantidade de células caliciformes produtoras de mucinas neutras coradas com PAS, porém essa redução só foi significativa nos tempos de 6 horas (12,46  $\pm$  0,81%) ( $p < 0,01$ ) e 24 horas (12,44  $\pm$  1,74%) ( $p < 0,05$ ) (figura 1).

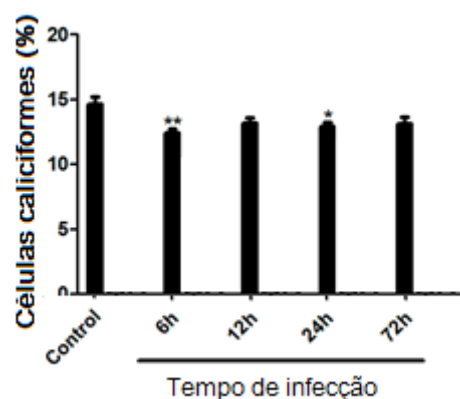


Figura 1. Células caliciformes coradas com PAS durante as primeiras horas de infecção oral. Contagens de células caliciformes produtoras de mucinas neutras coradas com PAS dos grupos controle e infectados. Asteriscos sobre as barras representam significância estatística quando comparados ao grupo controle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

As células caliciformes produzem e secretam no lúmen as mucinas constituintes do muco, durante infecções a composição do muco pode ser alterada para maior proteção intestinal. Seis e 24 horas após a infecção houve diminuição das células marcadas com PAS, ou seja, isso aconteceu provavelmente como um mecanismo de defesa contra organismos capazes de produzir doenças infecciosas aos hospedeiros podendo ainda

compreender o processo inflamatório da parede intestinal causada pela infecção. As mucinas neutras que compõe o muco foram reduzidas, o que acontece em algumas infecções por parasitos onde ocorre a diminuição de mucinas neutras e um aumento nas ácidas para auxiliar na eliminação do parasito.

Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores, realizados com ratos Wistar infectados pelo *T. gondii* da cepa ME-49 (genetipo II), que obtiveram como consequência a diminuição da secreção de mucinas neutras (SANT'ANA et al., 2012). Há também estudos em que ocorreram o aumento das células coradas com PAS, como é no caso dos gatos domésticos infectados por *T. gondii* da cepa ME49 (tipo II) (SILVA et al., 2010). Esta divergência entre diminuição e o aumento de células produtoras de mucinas neutras e sialomucinas, é compatível com a resposta de diferentes hospedeiros quando infectados pelo *T. gondii*.

### Conclusões

Houve alteração na composição epitelial do intestino delgado dos ratos infectados com *T. gondii*, onde observamos uma redução nas células caliciformes produtoras de mucinas neutras em diferentes tempos de infecção.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) e ao Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina (DAB).

### Referências

- BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. Toxoplasma gondii and subversion of the immune system. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 448–452, out. 2006.
- DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1131S–1141S, jun. 2001.
- DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of Toxoplasma gondii. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009.
- NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. **Atheneu**, p. 498, 2011.
- SANT'ANA, D. M. G. et al. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with Toxoplasma gondii. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 4, p. 279–286, 2012.
- SILVA, J. M. DA et al. Efeitos da infecção crônica por Toxoplasma gondii sobre a parede intestinal de gatos domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 57–63, 2010.