

ESTUDO DA NEOFORMAÇÃO DE COLÁGENO NO INTESTINO DELGADO DE RATOS EM RESPOSTA À DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO AGUDA PELO *Toxoplasma gondii*

Mariana Buranelo (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Aline Rosa Trevizan (Participante)
Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo (Coorientador) Débora de Mello
Gonçales Sant'Ana(Orientador), e-mail: dmgsantana@gmail.com

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

Área do conhecimento: Ciências Biológicas
Subárea: Morfologia

Palavras-chave: colágeno, toxoplasmose, trato gastrointestinal.

Resumo

O *Toxoplasma gondii* é o parasito responsável pela toxoplasmose, infecção que pode acarretar modificações na mucosa intestinal. O colágeno faz parte da estrutura das túnicas do tubo digestório. Objetivou-se avaliar o colágeno no duodeno de ratos na infecção aguda por *T. gondii*. Os ratos foram distribuídos em grupo controle (GC) que recebeu solução salina, e grupos infectados por 6 horas (G6), 12 horas (G12), 24 horas (G24), 48 horas (G48), 72 horas (G72), 7 dias (G7d) e 10 dias (G10d), que receberam 5000 oocistos esporulados do parasito (via oral). Os animais foram mortos, os duodenos fixados em bouin e embebidos em parafina, e posteriormente cortados em micrótomo. Foram realizadas as colorações de Azan e Picro Sirius. Capturamos 16 imagens (objetiva 20x) e mensuramos a área dos colágenos (μm^2) no *Image Pro Plus*. A análise estatística foi feita no Bioestat 5.0. Houve aumento significativo nas áreas de colágeno total e no colágeno tipo III no G72h quando comparado com o GC. Conclui-se que após 72 horas de infecção pelo *T. gondii* ocorre aumento na área dos colágenos total e do tipo III no duodeno de ratos.

Introdução

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é o parasito intracelular obrigatório causador da Toxoplasmose, uma das zoonoses mais difundidas pelo mundo (DUBEY, 1995). De forma natural os hospedeiros podem infectar-se pela ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais ou pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos, sendo essa última a sua principal via de infecção (WEISS; KIM, 2007). Ao chegar no trato digestório, os oocistos rapidamente se proliferam, invadindo o intestino e alcançando diversos tecidos, infectando qualquer célula nucleada por

penetração ativa (REY, 2001). A transposição da barreira intestinal gera uma resposta inflamatória local, marcada principalmente pela migração de linfócitos. A doença inflamatória intestinal em humanos tem como complicação a fibrose cística, que é caracterizada pelo acúmulo de colágeno na matriz extracelular (MONTELEONE et al., 2016). O colágeno é o tipo de proteína mais abundante no organismo e está presente entre as túnicas dos diversos segmentos do intestino, variando em graus de rigidez, elasticidade e força de tensão, dependendo dos tipos de fibras que possuem. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição do colágeno no duodeno de ratos submetidos a diferentes tempos de infecção aguda por *T. gondii*.

Materiais e métodos

Delineamento Experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (protocolo 013/2013). Utilizamos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 60 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. A partir dos 45 dias de idade esses ratos foram distribuídos aleatoriamente em grupo controle (GC) e em grupos inoculados por *T. gondii* e mantidos por 6 horas (G6), 12 horas (G12), 24 horas (G24), 48 horas (G48), 72 horas (G72), 7 dias (G7d) e 10 dias (G10) (n=5). Os ratos infectados receberam por via oral 5000 oocistos de *T. gondii* esporulados (cepa ME-49, genótipo II) e ressuspendidos em 1 mL de solução salina estéril, enquanto os animais do GC receberam apenas solução salina.

Coleta de Amostras e Processamento Histológico

Os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano. Foi realizada laparotomia vertical e os duodenos foram abertos pela borda mesentérica, fixados em isopor com auxílio de espinhos e colocados no fixador Bouin (6 horas). Os duodenos foram emblocados em parafina e cortados em micrótomo para obtenção de 4 cortes transversais semi-seriados de 4µm, para coloração de Picro Sirius, e 10 µm, para coloração de Azan.

Análise do Colágeno Estrutural

Esses cortes foram desparafinizados e corados pelas técnicas de Azan e Picro Sirius. Com auxílio de uma câmera digital (Pro series 3CCD câmera) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX50) foram capturadas 4 imagens de cada um dos 4 cortes corados, totalizando 16 imagens capturadas por animal (objetiva de 40x). A análise foi feita no software *Image Pro Plus* (Media Cybernetics), onde foi possível selecionar a área de colágeno total e dos colágenos tipo I e tipo III (µm²).

Análise Estatística

O teste D'Agostino-Pearson verificou a distribuição dos dados, que apresentaram distribuição normal, e por isso foram apresentados pela média

± desvio padrão. Foi feita a análise de variância Anova e os grupos foram comparados entre si pelo teste Tukey. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A mensuração da área de colágeno total presente nos cortes de duodeno corados pela técnica de Azan demonstrou um aumento significativo apenas no G72h ($131,48 \pm 52,09 \mu\text{m}^2$) comparado com o GC ($94,48 \pm 32,42 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$) (Figura 1). Já na técnica de Picro Sirius, a área do colágeno tipo I não apresentou alteração nos grupos estudados, enquanto a área do colágeno tipo III demonstrou aumento significativo também no G72h ($16,64 \pm 4,21 \mu\text{m}^2$), em relação ao GC ($11,74 \pm 3,46 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$) (Figura 1).

O colágeno é uma proteína que está presente entre as túnicas dos diversos segmentos do intestino, inclusive no duodeno. Quando o *T. gondii* entra no organismo do hospedeiro ocorre uma forte resposta inflamatória, com aumento no fluxo sanguíneo e consequente aumento de células e mediadores inflamatórios para o local da inflamação. Esses fatores desencadeiam um aumento da concentração de fibronectina e de fibras colágenas ao redor do tecido inflamado (FREYRE et al., 2001). Após 72 horas de infecção o parasito já atravessou o epitélio intestinal e começa a se disseminar pelo organismo. A transposição do parasito pelo duodeno pode ter causado um processo inflamatório que explica o aumento do colágeno tipo III, que é formado por fibras novas, corroborando com o aumento do colágeno total após o mesmo período de infecção.

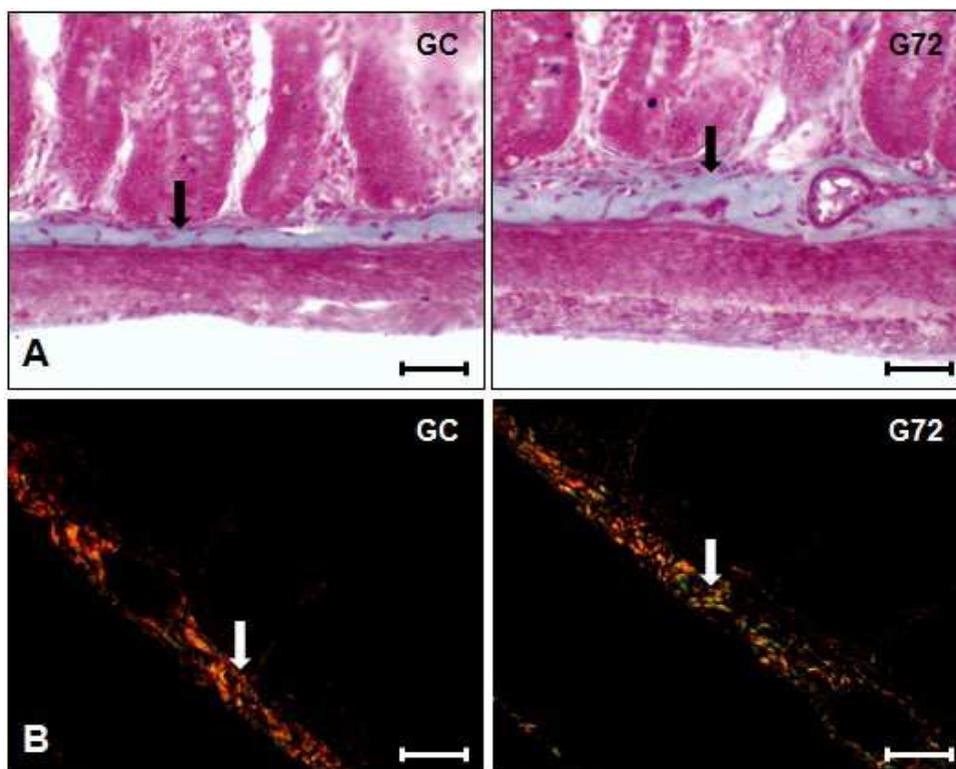


Figura 1. A- Fotomicrografias da coloração de Azan, demonstrando aumento da área corada em azul no G72 em relação ao GC. **B-** Fotomicrografias da coloração de Picro Sirius na luz polarizada, demonstrando aumento na área corada em verde no G72 em relação ao GC. Objetiva 20x. Barra 100µm.

Conclusões

Conclui-se que a infecção aguda pelo *T. gondii* causa aumento na área do colágeno total e do colágeno tipo III no duodeno de ratos Wistar após 72h de infecção.

Agradecimentos

A CNPq pela bolsa de iniciação científica e ao Departamento de Ciências Morfológicas da UEM onde o trabalho foi desenvolvido.

Referências

DUBEY, J.P. Bradyzoite - Induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 592-602, 1995.

FREYRE, A. et al. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. **Parasitology Research**, v. 87, p. 941-4, 2001.

KIM, K.; WEISS, L.; *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. Perspectives and methods. Alterations in Host. **Cell Biology**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

MONTELEONE, G. et al. Impact of patient characteristics on the clinical efficacy of mongersen (GED-0301), an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in active Crohn's disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 43, n.6, p. 717-724, 2016.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.