

## ANÁLISE DAS CÉLULAS DA GLIA ENTÉRICA DO PLEXO SUBMUCOSO DO DUODENO DE RATOS SUBMETIDOS À INFECÇÃO AGUDA POR

*Toxoplasma gondii*

Jackeline Joyce da Silva Moreira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Aline Rosa Trevizan (Participante), Lainy Leiny de Lima (Participante), Débora de Mello Gonçalves Santa'ana (Orientador), e-mail: dmgsantana@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Morfológicas/Maringá, PR.

**Área do conhecimento:** Ciências Biológicas

**Subárea:** Morfologia

**Palavras-chave:** Duodeno, Sistema Nervoso Entérico, Toxoplasmose.

**Resumo:** O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é o parasito intracelular obrigatório causador da Toxoplasmose. A infecção se dá pela ingestão de alimentos e água contaminada. O objetivo do presente estudo foi avaliar a quantidade de Células Gliais Entéricas (CGE), presente em 1 mm<sup>2</sup> do plexo submucoso do duodeno de ratos submetidos a diferentes tempos de infecção aguda por *T. gondii*. Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com 60 dias de idade (n=5), foram distribuídos em três grupos: controle não infectado (GC); grupo infectado por 6 (G6) e 12 horas (G12), os quais receberam por via oral suspensão contendo 5000 oocistos esporulados do parasito (cepa ME-49). Os animais foram submetidos a eutanásia, e o duodeno coletado, fixado e submetido a técnica de imunomarcagem da proteína S100, para evidenciação da população total de CGE. Foram contados as CGE presentes em 50 campos microscópicos. Os dados foram apresentados pela média  $\pm$  desvio padrão e comparados entre os grupos pelo teste de variância Anova-um critério e comparados entre os grupos pelo teste de Tukey. O nível de significância é o de 5%. Não foi observado diferença significativa quanto ao número total de CGE dos grupos infectados (G6 e G12), quando comparado ao GC (p<0,05). Conclui-se que a infecção aguda por *T. gondii* não causou alteração no número das Células Gliais Entéricas no plexo submucoso do duodeno de ratos.

## Introdução

A toxoplasmose, causada pelo *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é uma das infecções parasitárias mais comuns em animais homeotérmicos. Estima-se que cerca de um terço dos seres humanos já foi exposto a esse parasito em algum momento da vida (HILL; DUBEY, 2013).

A infecção ocorre por ingestão de oocisto e ao chegar no trato digestório, transpõe barreira intestinal, migrando para diversos tecidos e infectando qualquer célula nucleada (REY, 2001). O parasito forma cistos teciduais, nos quais se reproduz lentamente em diversos órgãos do hospedeiro como cérebro, músculos e intestino. A presença de cistos induz à inflamação local e pode resultar em lesões teciduais (MONTELEONE et al., 2016). As alterações teciduais causadas pelo parasito podem afetar as células epiteliais, imunológicas e outras como as células da glia entérica (EGCs) comprometendo também o funcionamento do Sistema Nervoso Entérico (SNE). As células da glia entérica (CGEs) exercem papel importante na regulação da homeostase intestinal. Dentre suas funções estão: manutenção neuronal, regulação da motilidade intestinal e participação na neurotransmissão e processos inflamatórios (GRUBIŠIĆ et al., 2018).

O objetivo deste estudo foi avaliar a quantidade de EGCs presente em 1 mm<sup>2</sup> do plexo submucoso do duodeno de ratos submetidos a diferentes tempos de infecção aguda por *T. gondii*.

## Materiais e métodos

### *Delineamento Experimental*

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá sob número de registro 013/2013.

Para esta pesquisa foram utilizados 15 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 60 dias de idade. E estes distribuídos aleatoriamente em grupo controle (GC) e em grupos inoculados por *T. gondii* e mantidos infectados por 6 horas (G6) e 12 horas (G12).

Os animais dos grupos infectados receberam por via oral 5000 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa ME-49, genótipo II) ressuspendidos em 1 mL de solução salina estéril, enquanto os animais do GC receberam apenas solução salina.

### *Coleta e processamento das Amostras*

Após os períodos experimentais, todos os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano.

Após laparotomia vertical o duodeno foi retirado, lavado, fixado em paraformoldeido 4% e estocado em PBS com azida sódica na concentração de 0,08% a 4°C. Posteriormente um fragmento do intestino de cada animal foi dissecado para obtenção do plexo submucoso. Em seguida, foram incubados em solução contendo anticorpo primário anti-S-100 (marcador

pan-glial), depois de 48h foram incubados anticorpo secundário (anti-primário, conjugado com fluoresceína).

#### *Análise quantitativa da glia entérica*

Foram contadas todas as células da glia entérica S100 imunorreativos (IR) presentes em 50 campos microscópicos de cada animal em imagens capturadas por câmera de alta resolução acoplada a microscópio de luz com filtros para imunofluorescência e lente objetiva de 20x. Então, foi somado a área destes campos e calculada a proporção de CGE em 1mm<sup>2</sup>. As imagens foram transferidas para microcomputador e analisadas com o software para análise de imagens ImagePro-Plus.

#### *Análise estatística*

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

Não foi observado diferença significativa quanto ao número total de CGE dos grupos infectados (G6 e G12), quando comparado ao GC ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Densidade de Células da Glia Entérica imunorreativas (S100-IR) do plexo submucoso de ratos do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*, por 6 e 12 horas (G6 e G12) em 1 mm<sup>2</sup>.

GRUPOS	Células da Glia entérica S-100-IR (mm <sup>2</sup> )
GC	266.14 $\pm$ 29.03
G6	292.17 $\pm$ 20.52
G12	293.11 $\pm$ 15.71

Média  $\pm$  desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Análise de Variância ANOVA, teste Tukey.

Estudos descreveram aumento da expressão de CGEs em processos inflamatórios com perda neuronal, normalmente em infecções por bactérias ou em doenças inflamatórias intestinais (GRUBIŠIĆ; GULBRANSEN, 2017). Sabe-se que as CGEs expressam fatores neurotróficos que atuam sobre os neurônios e sobre elas mesmas (LIU et al., 2010), além disso, auxiliam na síntese da glutatona, que é um antioxidante importante na proteção dos neurônios (VINCENT et al., 2004). Portanto, a manutenção do número destas células observada em nosso estudo, sugere que a infecção aguda

por *T. gondii* por 6 e 12 horas não foi suficiente para depredação das Células Glia Entéricas presentes no plexo submucoso do duodeno de ratos.

### Conclusões

A infecção aguda por *T. gondii* não causou alteração no número das Células da Glia Entérica do plexo submucoso de duodeno de ratos.

### Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária, a Universidade Estadual de Maringá e a Universidade Estadual de Londrina, aos Laboratórios de Neurogastroenterologia e Parasitologia Clínica da UEM.

### 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.

GRUBIŠIĆ, V.; GULBRANSEN B.D. Enteric glia: the most alimentary of all glia. **J Physiol**. 2017; 595:557–570.

LIU W, YUE W, WU R. Effects of diabetes on expression of glial fibrillary acidic protein and neurotrophins in rat colon. **Auton Neurosci**. 2010;154:79–83.

MONTELEONE, G.; DI SABATINO, A.; ARDIZZONE, S.; PALLONE, F.; USISKIN, K.; ZHAN, X.; ROSSITER, G.; NEURATH, M.F. 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.