

A INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii* CAUSA MASTOCITOSE NO INTESTINO DELGADO DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Mariana Sacchi Silva (PIBIC/CNPq), Lucas Casagrande, Maria José Pastre, Amanda Gubert Alves dos Santos, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana, Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo (Orientador), e-mail: ganmelo2@uem.br

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

Farmácia / Análise Toxicológica

Palavras-chave: toxoplasmose, mastócito, intestino delgado

Resumo:

O *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose. Esta doença pode causar perturbações no trato gastrointestinal, uma vez que o intestino delgado é a principal porta de entrada para o parasito. Sendo assim, o órgão necessita de defesas contra patógenos, dentre elas, os mastócitos, células do sistema imune que participam dos processos infecciosos. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os mastócitos totais e serotoninérgicos presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 frente à infecção aguda pelo *T. gondii*. Foram utilizados 14 animais, divididos em dois grupos (n=7): grupo controle e o grupo infectado com 1.000 oocistos de *T. gondii*. Com 5 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e após laparotomia, foram coletados o duodeno, jejuno e o íleo. Esses órgãos foram processados histologicamente, sendo desidratados, diafanizados e embebidos em parafina para a realização de cortes histológicos semi-seriados de 4µm. Utilizando a técnica de azul de toluidina, foram avaliados os mastócitos totais e com o uso de imunohistoquímica foi determinada a quantidade de mastócitos produtores de serotonina. Nossos resultados demonstraram um aumento na quantidade dos mastócitos totais apenas no duodeno. Já a quantidade de mastócitos serotoninérgicos aumentou significativamente nos três segmentos quando comparamos o grupo infectado com o controle. Assim, podemos concluir que a infecção aguda por *T. gondii* causa mastocitose no duodeno de camundongos C57BL/6 e promove uma maior produção de serotonina em todos os segmentos do intestino delgado.

Introdução

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (NEVES, 2016). Este parasito é capaz de infectar a maioria dos animais, incluindo os humanos, principalmente por meio da ingestão de oocistos presentes em água e alimentos contaminados e de cistos teciduais em carne crua ou malcozida (NEVES, 2016).

A principal porta de entrada do protozoário é o intestino delgado, que é dividido em três porções distintas: duodeno, jejuno e íleo, que juntas desempenham a função de

secreção, digestão, absorção e excreção. Os três segmentos apresentam uma morfologia bastante semelhante, constituída pela túnica mucosa, tela submucosa, túnica muscular e túnica serosa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

A túnica mucosa é composta pelo epitélio, muscular da mucosa e a lâmina própria, onde encontram-se vasos sanguíneos e linfáticos e células responsáveis pela defesa do hospedeiro, como os mastócitos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). Essas células participam de processos infecciosos (KANNEN, 2018) e produzem citocinas, quimiocinas, e mediadores químicos como a histamina, heparina, sulfato de condroitina e a serotonina (5-HT). Esta última é um importante neurotransmissor que estimula as vias pró-inflamatórias no intestino (KANNEN, 2018).

Apesar de existirem estudos que avaliam a interação da infecção por *T. gondii* com essas células em ratos (PASTRE, 2019), não foram encontrados relatos em camundongos C57BL/6. Sendo assim, nós avaliamos quantitativamente os mastócitos totais e serotoninérgicos frente à infecção aguda por *T. gondii*.

Materiais e métodos

Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá sob nº 4092040517. Foram utilizados 14 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 28 semanas de vida, provenientes do Biotério do Laboratório de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=7), um grupo controle (GC) e infectado (GI). Os camundongos pertencentes ao GC receberam por gavagem solução salina estéril, enquanto os do GI receberam por gavagem 1.000 oocistos de *T. gondii* da cepa ME49. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e foto-período de 12 horas (6h–18h), recebendo ração e água ad libitum.

Coleta de material biológico

Após 5 dias de infecção, os camundongos foram anestesiados por meio de nebulização com vapor de halotano e submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico. Então, foi realizada a laparotomia e seguido da coleta de aproximadamente 1cm do duodeno, jejuno e íleo para realização da técnica histológica.

Processamento e análises histológicas

O material biológico foi fixado em paraformaldeído 4% tamponado, desidratado, diafanizados e embebidos em parafina. Os segmentos intestinais foram então cortados em micrótomo transversalmente de forma semi-seriada em $4\mu\text{m}$ para a realização das análises.

A coloração de azul de toluidina foi utilizada a fim de quantificar o número de mastócitos totais presentes em 100 campos microscópicos por animal (objetiva de 100x) e os resultados expressos em número de mastócios (μm^2).

Para a análise dos mastócitos serotoninérgicos, o material foi submetido à técnica de imunohistoquímica. Após ser desparafinizado e reidratado, ele passou por um processo de recuperação antigênica e foi exposto à anticorpos primários anti-5HT

overnight, a fim de realizar a marcação células imunorreativas. Em seguida, foi adicionado um polímero conjugado com a peroxidase e posteriormente revelado pela coloração castanha do cromógeno diamino benzidina. A análise foi realizada em microscopia óptica, sendo quantificados os mastócitos reativos em 50 campos por animal (objetiva de 40x), os resultados foram expressos em número de mastócitos imunorreativos para 5HT (5-HT-IR) em μm^2 .

Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente à medida que foram sendo obtidos. A distribuição de dados foi considerada normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a análise estatística entre os grupos foi realizada pelo teste T de *Student*. Os dados foram apresentados pela média \pm desvio padrão. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% com 95% de confiança ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A infecção pelo *T. gondii* se dá principalmente por via oral, sendo o intestino delgado a principal porta de entrada para o protozoário, que penetra nas células intestinais e se replica no seu interior (NEVES, 2016). Ao chegar à lâmina própria, o parasito desencadeia um processo inflamatório com o aumento do fluxo sanguíneo, secreção de mediadores inflamatórios e migração de células imunes (REF).

De fato, nos nossos resultados podemos observar um aumento no número de mastócitos totais no duodeno do GI ($497,3 \pm 24,4 \text{ mm}^2$) em relação ao controle ($312,5 \pm 4,2 \text{ mm}^2$), demonstrando uma maior migração dessas células, nesta que é a primeira porção intestinal, portanto o local preferencial para a penetração do *T. gondii* (Figura 1).

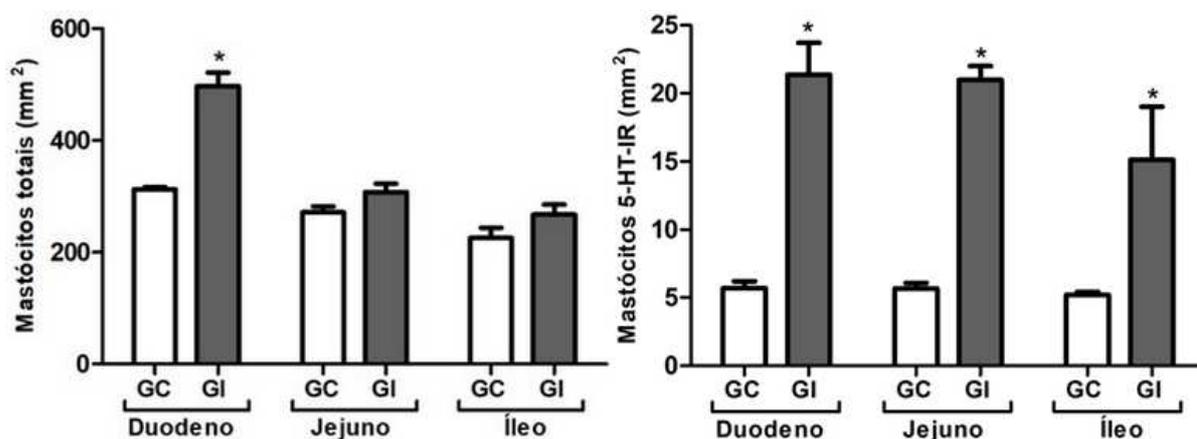


Figura 1 –Número de mastócitos totais e serotoninérgicos em 1 mm^2 no duodeno, jejuno e íleo de camundongos infectados por *T. gondii*. GC: Grupo controle. GI: Grupo infectado. 5-HT-IR: Serotonina imunorreativa. * representa $p < 0,05$.

Dentre os mecanismos que também participam da inflamação intestinal está relacionada a secreção 5-HT, que pode ser produzida pela subpopulação de mastócitos que avaliamos. Essa substância desempenha um importante papel na imunidade mediada por células atuando na ativação e recrutamento de leucócitos

(KANNEN, 2018, ARREOLA, 2015) e estimula a secreção de citocinas (ARREOLA, 2015).

Nossos resultados demonstraram que houve um aumento significativo de 274,9% no duodeno, 271,5% no jejuno e 191,2% no íleo nos mastócitos serotoninérgicos dos camundongos infectados em relação aos controles (Figura 1). Assim, podemos sugerir que há uma maior secreção de 5-HT na mucosa intestinal desses animais. O aumento da secreção poderia levar ao acúmulo desse neurotransmissor nas terminações nervosas, que acabam atuando como fonte da mesma contribuindo para a regulação da imunidade intestinal e inflamação (KANNEN, 2018).

Observamos então, que a infecção aguda pelo *T. gondii* por 5 dias leva ao aumento no número de mastócitos no intestino delgado. Isso significa que ocorre a ampliação da resposta imune contra o parasito no local, que por outro lado, pode gerar uma inflamação intestinal, que pode ser prejudicial se não controlada.

Conclusões

A infecção aguda por *T. gondii* leva ao aumento de mastócitos totais no duodeno e da subpopulação produtora de serotonina nos três segmentos constituintes do intestino delgado de camundongos C57BL/6. Podemos sugerir que infecção leva à ativação da resposta imune intestinal, o que pode acarretar um processo inflamatório no órgão e assim gerar alterações histopatológicas. Outros estudos precisam ser realizados para uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, ao laboratório de inflamação, ao grupo de pesquisa em neurogastroenterologia e aos departamentos de Biomedicina e Análises Clínicas e de Ciências Morfológicas da UEM.

Referências

ARREOLA, R. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 35495, 2015.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2017.

KANNEN, V. Mast Cells and Serotonin Synthesis Modulate Chagas Disease in the Colon: Clinical and Experimental Evidence. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 63, n. 6, p. 1–12, 2018.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana** 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

PASTRE, M. J. *Toxoplasma gondii* causes increased ICAM-1 and serotonin expression in the jejunum of rats 12 h after infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, p. 108797, 2019.