

ANÁLISE DE MASTÓCITOS E CÉLULAS ENTEROENDÓCRINAS 5-HT IMUNORREATIVAS NO DUODENO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii*

Mariana Buranelo (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Aline Rosa Trevizan (Participante/Doutoranda), Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo (Coorientador) Débora de Mello Gonçalves 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: serotonina, sistema digestório, toxoplasmose.

Resumo:

O *Toxoplasma gondii* é o parasito causador da Toxoplasmose e sua transmissão ocorre principalmente por via oral. Ao ser ingerido atravessa a barreira intestinal provocando a migração de células inflamatórias para o local. Dentre as células migratórias estão os mastócitos serotoninérgicos que secretam 5-Hidroxitriptamina (5-HT/IR) que, assim como as células enteroendócrinas (5-HT/IR) participam da resposta inflamatória intestinal diante da entrada do parasito. Por isso, objetivou-se quantificar mastócitos (5-HT/IR) e células enteroendócrinas (5-HT/IR) no duodeno de ratos durante a fase aguda da infecção. Os ratos foram distribuídos em grupo controle (GC) que recebeu solução salina, e grupos infectados por diferentes tempos entre 6 horas e 10 dias, que receberam 5000 oocistos esporulados do parasito (via oral). Os animais foram mortos e os duodenos retirados. Foi realizada a técnica imunohistoquímica de 5HT e as contagens das células realizadas com o uso de microscópio óptico. Houve aumento significativo no número de mastócitos no G10d quando comparado com o GC, e de células enteroendócrinas no G72h e no G10d também em relação ao GC. Conclui-se que a infecção aguda por *T. gondii* leva ao aumento no número de células enteroendócrinas e mastócitos serotoninérgicos no duodeno de ratos Wistar, levando possivelmente a maior liberação de serotonina que atua na resposta imune aumentando o número de mastócitos para impedir a entrada do parasito no duodeno.

Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo parasito *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), sendo uma das infecções parasitárias mais difundidas no mundo. Os hospedeiros podem infectar-se pela ingestão de carne crua ou mal-cozida contendo cistos teciduais ou pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos. Ao chegar no trato digestório, os oocistos rapidamente se proliferam, invadindo o intestino e infectando qualquer célula nucleada, alcançando diversos tecidos

(WEISS; KIM, 2007). Todavia, é preciso transpor a barreira intestinal para atingir os demais órgãos, e o intestino possui uma população residente de células inflamatórias, como eosinófilos e mastócitos. Os mastócitos estão expostos ao ambiente, para responder a antígenos estranhos que possam cruzar a barreira epitelial. Os mastócitos possuem grânulos contendo mediadores pré-formados e armazenados, tais como aminas vasoativas e proteases, permitindo uma resposta imediata (BISCHOFF; KRAMER, 2007). Dentre as células epiteliais que constituem a barreira intestinal estão as células enterocromafins (EC), um subtipo de célula enteroendócrina intestinal que produz serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) e pode influenciar na motilidade, secreção e hipersensibilidade gastrointestinal (GI). A 5-HT é um neurotransmissor importante para os neurônios entéricos e um hormônio autócrino, quando liberado de células enterocromafins (EC) na mucosa intestinal (MAWE; HOFFMAN, 2013). Visando entender melhor a resposta inflamatória intestinal e o papel destas células diante da infecção aguda pelo *T. gondii*, realizou-se este estudo em que foram quantificados mastócitos e células enteroendócrinas 5-HT imunorreativas no duodeno de ratos durante 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 esporulados de *T. gondii* (cepa ME-49, genótipo II) ressuspensos em 1 mL de solução salina estéril, enquanto os animais do GC receberam apenas solução salina por via oral.

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 Paraformaldeído a 4% por 6 horas. Os duodenos foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo em 4 cortes transversais semi-seriados de 4 µm.

Imunohistoquímica 5-HT e análise estatística

Os cortes foram desparafinizados, reidratados, sofreram recuperação antigênica e foram expostos ao anticorpo primário anti-5HT *over night*. Após, foi adicionado um polímero conjugado a peroxidase por 30 minutos e revelado pela coloração castanha do cromógeno diamino benzidina (DAB) por 5 minutos. Por fim, foi feita a contra-coloração com hematoxilina e a lâmina foi montada.

A análise foi feita em microscópio óptico, realizando separadamente a contagem de células enteroendócrinas e de mastócitos 5HT-IR presentes em 50 campos

microscópicos na objetiva de 40X presentes na túnica mucosa e tela submucosa do duodeno. Os resultados foram expressos como número de células enteroendócrinas e mastócitos 5HT-IR por mm^2 . Os dados apresentaram distribuição normal e foram expressos como média \pm desvio padrão. Foi feita a análise de variância Anova-um critério e os grupos foram comparados entre si pelo teste Tukey. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A contagem de mastócitos 5HT-IR presentes no duodeno demonstrou um aumento significativo no G10d ($99,74 \pm 11,65$ mastócitos/ mm^2) em comparação com o GC ($67,19 \pm 6,94$ mastócitos/ mm^2) ($p < 0,05$). Os demais grupos infectados (G6h: $59,93 \pm 5,52$ mastócitos/ mm^2 ; G12h: $84,63 \pm 11,56$ mastócitos/ mm^2 ; G24h: $60,31 \pm 7,32$ mastócitos/ mm^2 ; G48h: $72,92 \pm 8,42$ mastócitos/ mm^2 ; G72h: $82,01 \pm 8,86$ mastócitos/ mm^2 ; G7d: $84,20 \pm 8,85$ mastócitos/ mm^2) não demonstraram alteração na quantidade de mastócitos quando comparados com o GC. (Figura 1). Os mastócitos são células inflamatórias da mucosa intestinal que são ativadas durante a infecção oral por *T. gondii*. Secretam triptases, histamina e serotonina (5-HT), para combater o parasito (TURNER et al., 2014), o que foi detectável após 10 dias de infecção aguda por *T. gondii*.

Quanto as células enteroendócrinas 5HT-IR, houve um aumento significativo no G72h ($31,2 \pm 0,91$ células enteroendócrinas/ mm^2) e no G10d ($50,6 \pm 1,21$ células enteroendócrinas/ mm^2) em relação ao GC ($3,4 \pm 0,23$ células enteroendócrinas/ mm^2) ($p < 0,05$). Os demais grupos infectados (G6: $10,8 \pm 0,45$ células enteroendócrinas/ mm^2 ; G12: $19,2 \pm 0,71$ células enteroendócrinas/ mm^2 ; G24: $9,8 \pm 0,48$ células enteroendócrinas/ mm^2 ; G48: $14,8 \pm 0,58$ células enteroendócrinas/ mm^2 ; G7d: $16 \pm 0,63$ células enteroendócrinas/ mm^2) não tiveram diferença significativa com o GC (Figura 1). Estas células produzem 95% da serotonina do organismo, e anormalidades na regulação desta produção estão diretamente ligadas à patogênese da inflamação intestinal. A produção e liberação de serotonina pode ser induzida por contrações de túnicas musculares ligadas à função nervosa do intestino, em resposta a um fator que causa distúrbios ou inflamações intestinais (LINAN-RICO et al., 2016). Portanto, o aumento expressivo dos dois tipos celulares estudados indicam uma resposta inflamatória local causada pela entrada do *T. gondii* no duodeno.

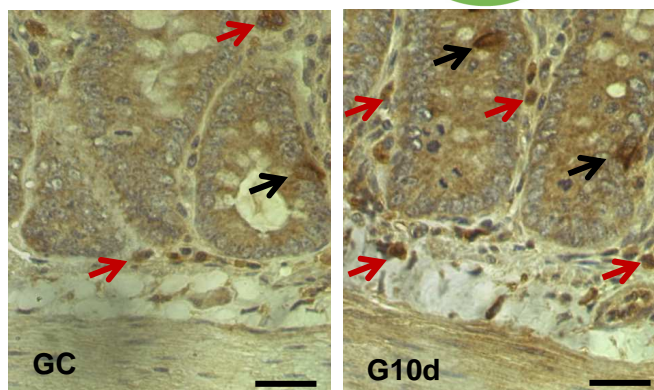


Figura 1. Fotomicrografias da imunomarcação de 5-HT no duodeno de ratos Wistar, demonstrando aumento no número de mastócitos e células enteroendócrinas 5-HT-IR no G10d em compara o ao GC. As setas vermelhas indicam mastócitos e as setas pretas indicam células enteroendócrinas na tela submucosa e t nica mucosa do duodeno. Objetiva 40x. Barra 50  m.

Conclusões

Conclui-se que a infec o aguda por *T. gondii* aumenta o número de células enteroendócrinas e de mastócitos (5-HT/IR) no duodeno de ratos Wistar. Portanto, o aumento na produ o e libera o de serotonina pelas células enteroendócrinas pode atuar na resposta imune aumentando o número de mastócitos e influenciando na motilidade intestinal para combater a entrada do parasito no duodeno.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de inicia o científica e ao Departamento de Ciências Morfológicas da UEM onde o trabalho foi desenvolvido.

Referências

BISCHOFF, S.C.; KRAMER, S. Human mast cells, bactéria, and intestinal immunity. **Immunological Reviews**, v. 217, p. 329-337, 2007.

LINAN-RICO, A. et al. Mechanosensory Signaling in Enterochromaffin Cells and 5-HT Release: Potential Implications for Gut Inflammation. **Front Neurosci**, v. 10, p. 1-19, 2016.

MAWE, G.M.; HOFFMAN, J.M. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, p. 473-486, 2013.

TURNER, et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research**, v. 1843, p.2563-2582, 2014.

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