

ANÁLISE DAS CÉLULAS DA GLIA DO INTESTINO DELGADO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 APÓS INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii*

Lucas Antônio da Silva Guerra (PIBIC/CNPq/Uem), Lucas Casagrande (Doutorando), Maria José Pastre (Doutoranda), Aline Rosa Trevizan (Doutoranda), Lainy Leiny de Lima (Doutoranda), Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Coorientadora), Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo (Orientadora), e-mail: ganmelo2@uem.br

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

Área do conhecimento: Farmácia

Subárea: Análise Toxicológica

Palavras-chave: trato gastrointestinal, toxoplasmose, sistema nervoso entérico

Resumo:

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo *T. gondii*. A infecção na maioria dos casos ocorre por via oral e o parasito dissemina-se por todo trato gastrointestinal. O Sistema Nervoso Entérico (SNE), comanda funções intestinais importantes, sendo as células da glia entérica (CGE's) importante componentes deste sistema. O objetivo deste trabalho foi analisar quantitativamente CGE's do SNE de camundongos C57BL/6 submetidos à infecção aguda pelo *T. gondii*. Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos (n=7): grupos controle (GC) e o grupo infectado (GI) que recebeu uma suspensão contendo 1.000 oocistos esporulados de *T. gondii*. Após 5 dias de infecção os animais foram submetidos à eutanásia e o duodeno, jejuno e íleo coletados. O material foi fixado e dissecado para exposição do plexo mientérico e submetido a técnicas de imunohistoquímica pela marcação panglial do anti-S100 e revelados com imunofluorescência para posterior contagem das CGE's. Utilizamos o teste T para análise estatística, $p < 0,05$. O duodeno não marcou, o jejuno não apresentou diferença significativa entre em relação ao GC. Por outro lado, observamos que no íleo ocorreu um aumento significativo de CGE's no GI ($330.7 \pm 11.76/\text{mm}^2$) se comparado ao GC ($388.4 \pm 13.23/\text{mm}^2$). Sendo assim, a preservação das CGE's no jejuno pode estar associada a um mecanismo de defesa, na tentativa de promover a manutenção dos neurônios após o estabelecimento da infecção parasitária.

Introdução:

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo *T. gondii*. Constitui uma das zoonoses mais difundidas no mundo, podendo atingir mais de 80% da população em determinados países. A infecção ocorre principalmente através da ingestão de oocistos presentes em água e verduras contaminadas, ou consumo de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais do parasito. A primeira barreira que o parasito enfrenta é a barreira intestinal (NEVES et al., 2016). O trato gastrointestinal (TGI) é composto por vários tipos celulares, dentre eles, células da glia entérica

(CGE's), presentes nos plexos entéricos, que juntamente com os neurônios intestinais, compõem o sistema nervoso entérico (SNE). O SNE possui dois plexos ganglionados, o submucoso e o mientérico, com funções múltiplas, que contribuem para integridade do epitélio, absorção de nutrientes e motilidade (FURNESS, 2012). O rompimento do epitélio intestinal acarreta danos ao tecido e células adjacentes, incluindo os neurônios mientéricos (TREVIZAN, et al., 2018), essenciais para a homeostase do organismo. Sendo assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar quantitativamente as CGE's presentes no plexo mientérico, já que estas, participam ativamente da resposta inflamatória e exercem proteção neuronal.

Materiais e métodos:

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob nº 4092040517.

Delineamento experimental, eutanásia e coleta de amostras.

Foram utilizados 14 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 28 semanas de vida distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=7) um grupo controle (GC) e infectado (GI). Os pertencentes ao GI receberam por gavagem 1.000 oocistos de *T. gondii* (cepa ME49), enquanto os pertencentes ao GC receberam apenas solução salina estéril. Os camundongos foram anestesiados por meio de aprofundamento anestésico por vapor de halotano, submetidos à eutanásia, e em seguida realizada a laparotomia e coletados o duodeno, jejuno e o íleo para realização da imunohistoquímica das CGE's.

Imunohistoquímica das CGE's

Um segmento de 4 cm do duodeno, jejuno e íleo foi lavado com tampão fosfato salinado (PBS), em seguida preenchido com paraformaldeído 4%, fixado por 3 horas em temperatura ambiente. Após fixação, o segmento foi aberto ao longo da borda mesentérica e lavado 2 vezes de 10 minutos em PBS 0,1M pH 7,4, ficando estocado em PBS com azida 0,08%. Com auxílio de um estereomicroscópio, frações de 1 centímetro dos segmentos intestinais foram dissecados para obtenção dos plexos mientérico. Na túnica muscular evidencia-se o plexo mientérico que foi obtido com a remoção das túnicas mucosa e submucosa. A técnica imunohistoquímica de marcação da proteína S100 em células da glia entérica foi empregada.

Análise Quantitativa das CGE's

No plexo mientérico foram contadas todas as CGE's S100 (marcador panglial) presentes em 32 imagens de campos microscópicos, capturados na objetiva de 20x de forma aleatória em todas as áreas da circunferência de todos os segmentos do intestino delgado, por meio de imagens FSX100 Olympus integrado a um microscópio de luz com filtros para imunofluorescência. As imagens foram então transmitidas para um microcomputador e a contagem de células foi realizada no

software de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). A densidade glial foi expressa como o número de células por mm^2 .

Análise estatística

Para verificar a distribuição de dados utilizamos o software BioEstat 5.3 e para a comparações entre grupos o GraphPad Prism 5 (San Diego, Ca, EUA). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para isso, utilizamos o teste T e os dados foram apresentados por média \pm erro padrão.

Resultados e Discussão:

As CGE's são numerosas e essenciais para a integridade e funções intestinais, exercendo diversas funções na plasticidade e motilidade do sistema digestório, realizando um importante papel na regulação da neurotransmissão, e na resposta imune (ORÍÁ, BRITO, 2016). Essas células têm uma ação neuronal anti-apoptótica e participam da modulação da atividade neuronal (GRUBIŠIĆ, et al., 2017).

Trevizan e colaboradores (2018) observaram diminuição significativa no número de neurônios do plexo mientérico do duodeno de ratos infectados com 5000 oocistos de *T. gondii* nos tempos de 24h, 48h, 72h, 7, 10 e 15 dias.

Em nossos estudos, não foi possível marcar o duodeno e o jejuno não apresentou diferença significativa entre os grupos GI ($286.0 \pm 24.58/\text{mm}^2$) e GC ($335.4 \pm 13.62/\text{mm}^2$) (Figura 1A). A preservação das CGE's no jejuno pode ser atribuída à resistência das CGE's, como um mecanismo de defesa, na tentativa de promover a manutenção dos neurônios após o estabelecimento da infecção parasitária (TREVIZAN et al., 2018). Por outro lado, observamos aumento das CGE's no íleo do GI ($388,4 \pm 13,23/\text{mm}^2$), quando comparado ao controle ($330.7 \pm 11.76/\text{mm}^2$) (Figura 1B, 1C e 1D). O aumento na expressão de CGE's, estão associadas a perda neuronal, geralmente causadas por infecções bacterianas ou doenças inflamatórias intestinais (GRUBIŠIĆ, et al., 2017).

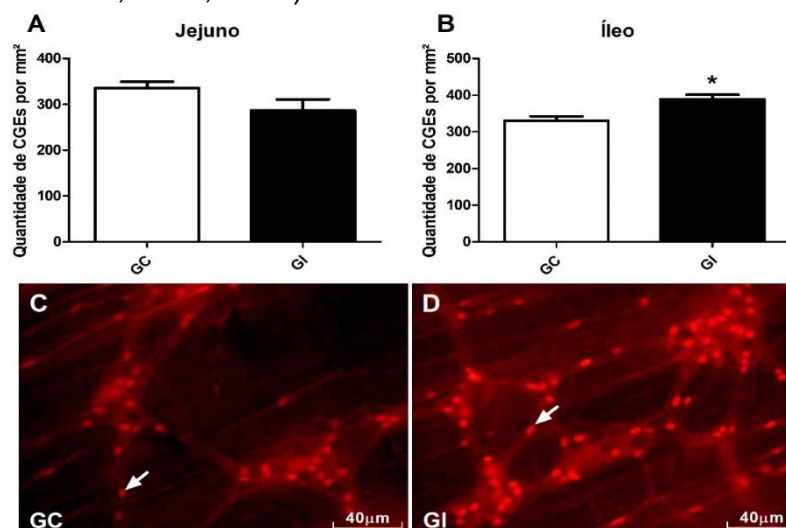


Figura 1 – Células da glia entérica (CGE's) por mm^2 do jejuno (A) e íleo (B), marcadas por imunohistoquímica da proteína S100. * indica diferença do grupo infectado (GI) em relação ao grupo

controle (GC). Fotomicrografia do íleo, evidenciando CGE's (seta) do grupo controle (C) e do grupo infectado (D).Objetiva de 20x, Barra 40 µm

Conclusões:

A infecção aguda por *T. gondii* promoveu aumento de CGE's no íleo de camundongos C57BL/6.

Agradecimentos:

Os autores agradecem ao CNPq, a CAPES e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro e ao Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina e Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá (PBF– UEM), pela infraestrutura e apoio.

Referências:

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

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), 286–294, 2012.

TREVIZAN, A. R., et al. Acute *Toxoplasma gondii* infection alters the number of neurons and the proportion of enteric glial cells in the duodenum in Wistar rats. *Neurogastroenterology & Motility*, e13523, 2018.

ORIÁ, R.B.,BRITO, G.A.C. **Sistema Digestório: Integração Básico-clínica**. 1. Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2016

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