

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E HISTOPATOLÓGICA DO CÓLON DE CAMUNDONGOS C57BL/6 APÓS INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii*

Carolina Naoko Abe Kano (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana, Amanda Gubert Alves dos Santos (Coorientador), Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo (Orientador), e-mail: ganmelo2@uem.br

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

Área: Ciências da Saúde (40000001)
Sub-área: Farmácia (40300005)

Palavras-chave: toxoplasmose, morfometria, intestino grosso.

Resumo:

O protozoário *Toxoplasma gondii* é agente etiológico da toxoplasmose, uma doença distribuída mundialmente que afeta diversas espécies animais, inclusive o homem. O aparecimento de sintomas depende da suscetibilidade do hospedeiro e aspectos relacionados ao parasito. Estudos demonstraram o desenvolvimento de dano tecidual no intestino de camundongos C57BL/6, decorrentes da infecção por este protozoário. Desta forma, este estudo avaliou as possíveis alterações causadas pela infecção aguda pelo *T. gondii* no cólon de camundongos C57BL/6. Utilizou-se 12 camundongos com 28 semanas de vida distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=6), um grupo controle (GC) e grupo infectado (GI). Os animais do GI receberam por gavagem 1.000 oocistos de *T. gondii*, e após 5 dias da infecção foram submetidos a eutanásia por aprofundamento anestésico, seguido pela coleta de aproximadamente 1 cm do cólon para processamento histológico e obtenção de lâminas, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina. Estas, foram utilizadas para mensurar a espessura das camadas musculares, da submucosa e parede intestinal total, além da profundidade e largura de criptas. Nas mesmas lâminas, foram quantificados os linfócitos intraepiteliais e realizada a avaliação histopatológica. Os resultados obtidos demonstraram aumento significativo de linfócitos intraepiteliais e alterações nas camadas muscular longitudinal e submucosa, bem como na profundidade de criptas quando comparado o grupo infectado ao controle, indicando que de fato, a infecção aguda pelo *T. gondii* pode causar alterações no cólon.

Introdução

O protozoário *T. gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença zoonótica que afeta diversas espécies animais, como aves e mamíferos no mundo. A infecção ocorre pela ingestão de água, solo ou alimentos contaminados por oocistos esporulados, carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais ou ainda pela via vertical, ou seja, da mãe para o feto. A toxoplasmose é uma doença que não possui sintomas característicos, mas que pode causar inflamações intestinais

devido a passagem do parasito pelo órgão (SIKORSKI, 2021). O intestino se diferencia nas porções delgado e grosso, sendo o último, dividido anatomicamente em segmentos que possuem, em geral, estrutura histológica semelhante, exceto pelo reto: a camada muscular, que é constituída pelas camadas circular e longitudinal, seguida pela túnica submucosa e mucosa, que possui invaginações, chamadas criptas, estruturas alongadas ricas em células caliciformes em seu epitélio (ORIAÍ; BRITO, 2016), onde também se encontram os linfócitos intraepiteliais (LIEs). A função dos LIEs é proteger e manter a integridade da barreira mucosa, sendo divididos em “naturais” e “induzidos”, sendo os naturais linfócitos CD8⁺ que adquirem o fenótipo para expressão de TCR $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$ durante o desenvolvimento no timo a partir de antígenos próprios, e os induzidos células CD4⁺ ou CD8⁺ ativadas após maturação tímica em resposta à antígenos específicos (ORIAÍ; BRITO, 2016). Estudos como o de Sikorski *et al.* (2021) mostram que a infecção aguda pelo protozoário pode levar a alterações significativas no cólon. Desta forma, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a morfometria da parede intestinal, bem como os LIEs na infecção aguda por *T. gondii*.

Materiais e Métodos

Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob o nº4092040517. Sendo utilizados 12 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 28 semanas de vida, oriundos do Biotério do Laboratório de Inflamação localizado na sala 106 do bloco K68 da Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n= 6), grupo controle (GC) e infectado (GI). Aqueles pertencentes ao GI receberam por gavagem 1.000 oocistos de *T. gondii* (cepa ME49), enquanto os pertencentes ao GC receberam solução salina estéril. Os animais foram mantidos no biotério em temperatura ambiente controlada (24 ± 2°C) e fotoperíodo de 12 horas (6h - 18h), recebendo ração e água *ad libitum*.

Coleta e processamento de amostras

Após 5 dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico. Em seguida, foi realizada laparotomia e coleta de aproximadamente 1 cm do cólon para realizar o processamento histológico para a obtenção dos cortes histológicos de 5 μ m. O material foi cortado transversalmente de forma semi-seriada para confecção de lâminas que foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina.

Análises histológicas

Para a mensuração da parede intestinal, os cortes foram divididos em 4 quadrantes e foram capturadas 16 imagens do cólon de cada animal (1 imagem/quadrante/corte) com o auxílio de um microscópio ótico trilocular (Olympus CX31) acoplado a uma câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel). Nestas imagens, foram realizadas 64 medidas (4 medidas/imagem; Motic Images Plus, versão 2.0) de cada um dos seguintes parâmetros por animal: espessura das

camadas musculares (longitudinal, circular e total) e da submucosa e a profundidade e largura das criptas. Nestas mesmas lâminas foi realizada a contagem dos LIEs, sendo quantificadas o número dessas células presentes entre 2560 células epiteliais por animal. Foi calculada a proporção de LIEs por 100 células epiteliais. Por fim, também foi analisada a presença de alterações histopatológicas.

Análise estatística

Com o software GraphPad Prism (versão 8.0.1), verificou-se que a distribuição dos dados foi normal e a comparação dos grupos foi realizada pelo teste T. Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão e $p < 0,05$ foi considerado significativo estatisticamente.

Resultados e Discussão

A infecção pelo *T. gondii* tem como local primário de indução de resposta imune o intestino delgado (SIKORSKI, 2021), que é o principal órgão dos estudos com o parasito. Contudo, em nosso estudo, observamos infiltrados inflamatórios no cólon dos animais, demonstrando que a inflamação também atinge o intestino grosso. Sendo, assim, outros parâmetros morfológicos foram analisados. Nossos resultados demonstraram um aumento de 61,7% na espessura da camada muscular longitudinal no GI (Tabela 1), o que pode ser relacionado ao aumento de motilidade intestinal, que é função da camada muscular (RICCI, 2020). Por outro lado, observamos a redução de 31,6% na túnica submucosa do GI (Tabela 1), o que pode estar relacionado ao remodelamento de fibras colágenas. Estas são encontradas abundantemente nesta camada intestinal e já foram encontradas alteradas juntamente com a redução da submucosa no intestino delgado de ratos durante a infecção aguda por *T. gondii* (PASTRE *et al.* 2019).

Tabela 1 – Morfometria da parede intestinal e proporção de LIEs no cólon de camundongos C57BL/6 na infecção aguda por *T. gondii*

	GC	GI
Muscular longitudinal	19,43 \pm 2,27	31,43 \pm 4,14 *
Muscular circular	106,60 \pm 9,04	105,80 \pm 10,17
Muscular Total	124,40 \pm 12,18	139,7 \pm 13,40
Túnica submucosa	50,57 \pm 15,37	34,64 \pm 5,76 *
Profundidade de cripta	170,80 \pm 20,56	86,52 \pm 5,29 *
Largura de cripta	26,07 \pm 1,64	25,16 \pm 1,555
Proporção de LIEs	4,12 \pm 2,66	8,38 \pm 1,75 *

Dados apresentados em média \pm desvio padrão. * indica valor $p < 0,05$, ao comparar o grupo infectado (GI) ao controle (GC).

A profundidade das criptas também sofreu redução de aproximadamente 50% (Tabela 1), o que pode levar a diminuição da proliferação celular no órgão (GÓIS *et al.* 2016), que pode estar prejudicada devido à resposta inflamatória contra o parasito. A inflamação também foi observada na proporção de LIEs, que dobrou após a infecção (Tabela 1). Esse aumento de LIEs no cólon foi observado também na infecção crônica pela mesma cepa de *T. gondii* em ratos, sendo relacionado ao aumento da resposta inflamatória e proteção contra o parasito (GÓIS *et al.* 2016).

Conclusões

A infecção aguda pelo *T. gondii* em camundongos C57BL/6 resultou em alterações na histoarquitetura do órgão o que poderia levar a alterações funcionais, além das alterações sugestivas de um processo inflamatório no cólon. Sendo assim, outros estudos são necessários para uma melhor compreensão das alterações no órgão na toxoplasmose aguda.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Dra. Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo e coorientadora Dra. Amanda Gubert Alves dos Santos pelo apoio e incentivo no decorrer no projeto, ao CNPq pela bolsa concedida e a todo o laboratório de Neurogastroenterologia pelo auxílio.

Referências

GÓIS, M. B. et al. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats. **Experimental Parasitology**, v. 164, p. 56–63, 2016.

PASTRE, M. J. et al. *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.

ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica. São Paulo: **Blucher**, 2016. Bibliografia: p. 273-384. ISBN: 978-85-8039-189-3.

RICCI, M. F. **Megacólon chagásico: contribuições à compreensão da patogênese a partir de estudos experimentais em modelo murino *in vivo* e *in vitro* do sistema nervoso entérico**. 2020. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

SIKORSKI, P. M.; COMMODARO, A. G.; GRIGG, M. E. A Protective and Pathogenic Role for Complement During Acute *Toxoplasma gondii* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, fev. 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.634610.